

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

301 427

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-1791**
(22) Přihlášeno: **29.11.2001**
(30) Právo přednosti: **29.11.2000 GB 0029134**
01.12.2000 GB 0029404
15.06.2001 GB 0114695
(40) Zveřejněno: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)
(47) Uděleno: **15.01.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.02.2010**
(Věstník č. 8/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/GB2001/005299**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/044396**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5876989; WO 00/54802.

Prasmickaite L. et al.: „Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI)“, J. Gene Med. 2(6):477-88, Nov-Dec 2000; Rosenkranz, A.A. et al.: „Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency“, Immunol. Cell Biol. 78(4):452-64, 2000.

(73) Majitel patentu:

PCI BIOTECH AS, Oslo, NO

(72) Původce:

Berg Kristian, Heggedal, NO
Prasmickaite Lina, Oslo, NO
Hogset Anders, Oslo, NO
Selbo Pal Kristian, Oslo, NO

(74) Zástupce:

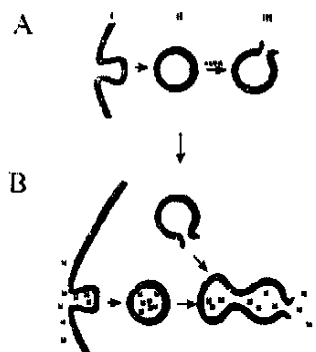
KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Zdeňka
Korejzová, advokátka, Korunní 104/E, Praha 10, 10100

(54) Název vynálezu:

Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky

(57) Anotace:

Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky in vitro nebo ex vivo tak, že tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, buňka se uvede do styku s molekulou jež má být zavedena, tedy s přenášenou molekulou a buňka se ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího činidla, uvedené ozáření se provádí před buněčným pochlacením zmíněné molekuly do kteréhokoliv intracelulárního oddílu, přičemž přenášená molekula není snadno uvolněna z oddílu, vymezeného intracelulární membránou, do cytosolu, a/nebo se jedna složka nebo obě složky, sestávající z fotosenzitizačního činidla a přenášené molekuly, spojí s nebo připojí na jednu nebo více z nosičových molekul, zaciňujících molekul nebo vektorů.



CZ 301427 B6

Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká zlepšeného způsobu zavádění molekul do cytosolu buněk, při němž se používá fotosenzitizační činidlo a ozáření buněk světlem o takové vlnové délce, která je účinná pro aktivaci fotosenzitizačního činidla.

Dosavadní stav techniky

Většina buněk neproniká buněčnou membránou snadno. Způsoby zavedení molekul do cytosolu živých buněk jsou vhodnými nástroji pro manipulační a studijní biologické postupy. Mezi nej-
běžněji používané současné způsoby patří mikroinjekce, permeabilizovanými červenými krvinkami zprostředkovaná fúze (red blood cell ghost-mediated fusion) a fúze liposomů, osmotická lyze pinosomů, vnášení poškrábáním (scrape loading), elektroporace, fosforečnanem vápenatým a virem zprostředkovaná transfekce. Tyto techniky jsou vhodné pro zkoumání buněk v kultuře, i když v mnoha případech mohou být nepraktické, časově náročné, neúčinné nebo mohou induk-
vat významné usmrcení buněk. Takové techniky tedy nejsou optimální pro použití v biologickém nebo lékařském výzkumu, nebo při léčbách, vyžadujících, aby buňky zůstaly živé a/nebo funkční.

Je dobře známo, že porfyriny a mnoho dalších fotosenzitizujících sloučenin může indukovat cytotoxické účinky na buňky a tkáně. Tyto účinky se zakládají na skutečnosti, že během vystave-
ní světlu se může fotosenzitizující sloučenina stát toxickou nebo může uvolnit toxické látky, jako je singletní kyslík nebo jiné oxidační radikály, které poškozují buněčný materiál či biomolekuly, včetně buněčných membrán a buněčných struktur a takové buněčné nebo membránové poškození může nakonec buňky usmrtit.

Tyto účinky již byly používány při léčbě různých abnormalit nebo poruch, včetně zejména nádorových onemocnění. Tato léčba se nazývá fotodynamická léčba (PDT, photodynamic therapy) a zahrnuje podání fotosenzitizujících (fotochemoterapeutických) činidel do zasažené oblasti těla, následné vystavení aktivačnímu světlu k aktivaci fotosenzitizujících činidel a jejich přeměně na cytotoxické formy tak, aby zasažené buňky byly usmrceny, nebo byla oslabena jejich prolifera-
tivní schopnost. Jsou známa taková fotosenzitizující činidla, která budou přednostně nebo výběrově lokalizovat požadované cílové místo, například nádor nebo jinou lezi.

Známa je široká škála fotosenzitizujících činidel, kam patří zejména psoraleny, porfyriny, chlori-
ny a ftalocyaniny. Taková léčiva se po vystavení světlu stávají toxickými.

Tato senzitivizující léčiva mohou uplatňovat své účinky mnoha různými mechanismy, přímo nebo nepřímou. Některé fotosenzitizery se tedy například stávají toxickými po aktivaci světlem, zatímco jiné vyvolávají tvorbu toxických látek, například oxidačních činidel jako je singletní kyslík a jiné volné radikály odvozené od kyslíku, které jsou extrémně destruktivní vůči buněčnému materiálu a vůči biomolekulám, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny.

Porfyrinové fotosenzitizery působí nepřímou, prostřednictvím tvorby toxických kyslíkových látek a jsou považovány za zvláště výhodné kandidáty k PDT. Porfyriny jsou přírodně se vyskytujícími prekurzory při syntéze hemu. Konkrétně je hem produkován tak, že se železo (Fe^{3+}) začlení do protoporfyrinu (Pp IX) účinkem enzymu ferrochelatázy. Protoporfyrin IX je extrémně účinným fotosenzitizerem, zatímco hem nemá žádný fotosenzitizační účinek. V oboru je známo velké množství senzitizerů na bázi porfyrinu nebo odvozených od porfyrinu, které jsou rovněž popsány v literatuře.

Cytotoxický účinek většiny senzitizerů užitých v PDT je zprostředkován zejména vytvářením singletního kyslíku, $^1\text{O}_2$, který vzniká během vystavení fotosenzitizerů světlu. Tento reaktivní meziprodukt má v buňkách velmi krátký poločas rozpadu ($< 0,04 \mu\text{s}$). Primární cytotoxický účinek PDT je tedy vytvářen během vystavení světlu a v místech velmi blízkých oblastem vytváření $^1\text{O}_2$. $^1\text{O}_2$ reaguje s proteiny (aminokyseliny histidin, tryptofan, methionin, cystein, tyrosin) DNA (guanin), nenasycenými mastnými kyselinami a cholesterolem, přičemž je oxiduje. Jednou z výhod PDT je to, že tkáň nevystavené světlu zůstane neovlivněná, což znamená, že lze získat selektivní účinek PDT. Pokud se týká použití PDT ke zničení nežádoucích buněčných populací, například nádorových buněk, existuje k tomu rozsáhlá dokumentace. Patentová literatura popisuje množství fotodynamických sloučenin, ať už samotných nebo spojených s činidly umožňujícími jejich zacílení, například s imunoglobuliny namířeny vůči receptorovým determinantám nádorových buněk, které činí komplex buněčně specifitějším. Určité fotochemické sloučeniny, jako jsou hematoporfyrinové deriváty, mají nadto vrozenou schopnost koncentrovat se v maligních buňkách. Takové způsoby a sloučeniny jsou popsány v norském patentu 173 319 a v norských patentových přihláškách 900 731, 176 645, 176 947, 180 742, 176 786, 301 981, 300 499 a 891 491.

Ve WO 93/14142 je popsán systém k uvolňování léčiv, který obsahuje protirakovinné činidlo a fotoaktivační činidlo (tj. fotosenzitizer) připojené na kopolymerní nosiče. Během podávání vstupuje tento komplex do nitra buňky pinocytózou nebo fagocytózou a objevuje se uvnitř endozomů a lysozomů. V lysozomech se vazba mezi protinádorovým činidlem a polymerem hydrolyzuje, první jmenované pak může pasivně difundovat lysozomální membránou do cytosolu. Použitelnost tohoto způsobu je tedy omezena na malé molekulární sloučeniny, které jsou schopné difundovat přes lysozomální membrány. Po určité časové prodlevě pro difuzi se použije zdroj světla o příhodné vlnové délce a energii k aktivaci fotoaktivovatelné sloučeniny. Spojený účinek protinádorového činidla a fotoaktivovatelného činidla ničí buňku. Takové metody PDT, jaké byly popsány výše, jsou tedy zacíleny k destrukci buněčných struktur, vedoucí až k odumření buňky.

WO 96/074 32 a WO 00/54 802 se na druhé straně týkají způsobů, které používají fotodynamický účinek jako mechanismus k zavedení membránou jinak neprostupných molekul do cytosolu buňky takovým způsobem, který nemá nezbytně za důsledek široké buněčné poškození nebo odumření buňky. Při tomto způsobu se molekula, která má být internalizována a fotosenzitizující sloučenina aplikují souběžně nebo následně do buněk tak, že jsou jak molekula, tak fotosenzitizující sloučenina endocytovány nebo přeneseny jinými způsoby do endosomů, lysozomů nebo do jiných, intracelulární membránou vymezených oddílů.

Molekula, která má být přenesena do intracelulárních oddílů buňky a fotosenzitizující sloučenina jsou do buňky aplikovány společně nebo následně a jsou buňkou zachyceny, pohlceny společně, do stejných intracelulárních (nitrobuněčných) oddílů (tj. jsou společně translokovány). Molekula, která má být internalizována do buňky, je potom uvolněna vystavením buňky světlu o vhodných vlnových délkách k aktivaci fotosenzitizující sloučeniny, což obratem vede k protržení membrán intracelulárního oddílu a následnému uvolnění molekuly, která se nachází ve stejném oddílu jako fotosenzitizující činidlo, do cytosolu. Tato metoda byla nazvána „fotochemická internalizace“, PCI. V těchto metodách je tedy výsledkem konečného kroku vystavení buněk světlu uvolnění příslušné molekuly ze stejného intracelulárního oddílu jako fotosenzitizující činidlo a její další přítomnost v cytosolu.

Předpokládalo se, že pro účinnost takové metody je nezbytné, aby jak fotosenzitizující sloučenina, tak i molekula, jež má být uvolněna do cytosolu, byly během ozáření světlem přítomné ve stejných intracelulárních oddílech.

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že molekuly mohou být zavedeny do cytosolu buněk podobnými metodami PCI, u nichž však vystavení světlu není nezbytně konečným krokem a tyto metody nejsou závislé na tom, aby molekula a fotosenzitizující činidlo byly v době vystavení světlu přítomné ve stejných intracelulárních oddílech. V takových metodách může být fotosenzitizující

čínidlo uvedeno do styku s buňkami, a aktivováno ozářením před tím, než je molekula, která má být internalizována a tedy uvolněna do cytosolu, uvedena do styku s buňkami. Navzdory skutečností, že molekula k internalizaci a fotosenzitizující čínidlo nejsou nezbytně umístěny ve stejných intracelulárních oddílech v době vystavení světlu, molekula stále vstupuje do buňky a je uvolňována do cytosolu. Tyto výsledky jsou extrémně překvapující a takové metody vykazují významné
 5 výhody oproti metodám, v nichž je ozáření světlem konečným krokem.

Podstata vynálezu

10 Předkládaný vynález tedy nejobecněji poskytuje způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky, přičemž tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím čínidlem, zmíněná buňka se uvede do styku s molekulou jež má být zavedena a zmíněná buňka se ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího čínidla, přičemž
 15 uvedené ozáření se provádí před buněčným pohlcením zmíněné molekuly do intracelulárního oddílu obsahujícího uvedené fotosenzitizující čínidlo, s výhodou před buněčným pohlcením zmíněné molekuly do kteréhokoliv intracelulárního oddílu.

Podstatu vynálezu tvoří způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky in vitro nebo ex vivo, tento
 20 způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím čínidlem, buňka se uvede do styku s molekulou jež má být zavedena, tedy s přenášenou molekulou a buňka se ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího čínidla, uvedené ozáření se provádí před buněčným pohlcením zmíněné molekuly do kteréhokoliv intracelulárního oddílu, přičemž přenášená molekula není snadno uvolněna z oddílu, vymezeného intracelulární membránou, do cytosolu, a/nebo se jedna složka nebo obě složky, sestávající z fotosenzitizujícího čínidla
 25 a přenášené molekuly, spojí s nebo připojí na jednu nebo více z nosičových molekul, zacilujících molekul nebo vektorů.

Tak, jak je zde použit, týká se výraz „buněčné pohlcení“ nebo „translokace“ jednoho z kroků
 30 internalizace, při níž jsou molekuly vně buněčné membrány přijmuty do buňky tak, že se ocitnou na vnitřní straně vnější buněčné membrány, například v oddílech vymezených intracelulární membránou nebo ve spojení s těmito oddíly, například v endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu, lysosomech, endosomech a podobně, k čemuž dochází například endocytózou nebo jiným vhodným pohlcovacím mechanismem.

35 Konkrétně jako upřednostňovaný aspekt poskytuje předkládaný vynález způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky, přičemž zmíněný způsob zahrnuje kroky, v nichž se uvedená buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím čínidlem, poté se tato buňka ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího čínidla a v podstatě ve stejný časový okamžik nebo v době
 40 po ozáření se zmíněná buňka uvede do styku s molekulou, jež má být zaváděna.

S výhodou se buňky do styku s molekulami, jež mají být zaváděny nebo internalizovány (zde dále označovanými jako přenášené molekuly), uvádějí v době po ozáření, nebo jinými slovy, fotochemické ovlivnění buněk jejich stykem s fotosenzitizujícím čínidlem a poté ozářením se
 45 provádí předtím, než jsou molekuly přidány k buňkám. V tomto ztělesnění mohou být molekuly, jež mají být zaváděny do cytosolu, uvedeny do styku s buňkami, které již byly podrobeny fotochemickému ovlivnění, v jakémkoliv časovém období po takovém ovlivnění za předpokladu, že přenášené molekuly jsou stále schopné být přijmuty do buněk. Časové okno, v němž mohou být molekuly uvedeny do styku s buňkami a stále být do nich přijaty, může záviset na množství
 50 faktorů jako například na buněčném typu, konkrétní přijímané molekule, na konkrétním použitém fotosenzitizujícím čínidle a na délce trvání světelného ovlivnění. V případě potřeby může být takové časové okno stanoveno pro konkrétní sadu podmínek. Ovšem s výhodou je molekula, jež má být převedena do cytosolu, vystavena buňkám poměrně brzo po fotochemickém ovlivnění, například během 24 hodin po fotochemickém ovlivnění a ještě lépe během prvních 10 hodin po
 55 fotochemickém ovlivnění, například během prvních 5 hodin nebo ještě lépe během první hodiny.

Například molekula přenášená *in vitro* nebo *ex vivo* může být podávána po určité časové období, například od 30 minut do 24 hodin lépe od 1 do 2 hodin, přičemž podávání začíná bezprostředně po ozáření nebo krátce po něm, tedy pokud je konec ozařování považován za výchozí bod, může
 5 být přenášená molekula aplikována od doby nulté minuty do 24 hodin, například od 0 do 4 hodin.

Bylo zjištěno, že dokonce i pokud je přenášená molekula uvedena do styku s buňkou značnou dobu po ozáření, je internalizace do této buňky stále možná. Přenášená molekula může být například aplikována více než 4 hodiny po ozáření, například více než 2, 4, 8, 10 nebo dokonce
 10 12 hodin po ozáření.

V upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu je tedy zmíněná buňka uvedena do styku se zmíněnou přenášenou molekulou 0 až 4 hodiny po ozáření na dobu 1 až 2 nebo 3 hodin či déle, například alespoň na dobu 0,5 až 3 hodin. Tato doba, po kterou je přenášená molekula podávána, se bude lišit v závislosti na tom, zda jsou způsoby prováděny *in vitro* nebo *in vivo*. Pro způsoby
 15 *in vitro* mohou být přenášené molekuly obecně uváděny do styku se všemi cílovými buňkami souběžně, například pokud jsou buňky pěstovány v kultuře *in vitro* a je tedy poměrně snadné přivést molekuly do styku s buňkami ve vhodný časový okamžik. Uspořádání *in vivo* je ovšem krok uvedení cílových buněk do styku s přenášenými molekulami jasně komplikovanější a bude
 20 záviset na způsobu podávání a na umístění cílových buněk.

Pokud například může být přenášená molekula podávána přímo do cílových buněk, například lokální injikací, potom bude přenášená molekula do styku s cílovými buňkami (nebo alespoň s jejich částí) uvedena poměrně rychle, například během minut nebo hodin po podání. Na druhou stranu pokud jsou přenášené molekuly podávány intravenózní injikací pro dosažení vzdáleného cíle, pak může trvat déle než se dostanou do styku s cílovými buňkami. Například může trvat
 25 24 až 96 hodin, než se po podání dostanou do cílových buněk. Tato „doba vyjádřená ve dnech“ musí být brána v úvahu při plánování vhodné doby, během níž mají být přenášené molekuly podávány vzhledem k aplikaci fotosenzitizujícího činidla a doby ozáření.

V alternativním uspořádání předkládaného vynálezu mohou být přenášené molekuly spíše než po ozáření uvedeny do styku s buňkami v podstatě ve stejnou dobu, v jakou se ozáření provádí. Výraz „v podstatě ve stejnou dobu“, tak jak je zde použit, zahrnuje „přesně ve stejnou dobu“, tj. současně, ale rovněž zahrnuje přidání molekul k buňkám krátce před ozářením, například až do
 35 jedné nebo dvou hodin před ozářením, a to za předpokladu, že buněčné pohlcení přenášené molekuly nenastalo v době ozáření a může stále nastat, třeba po ozáření nebo za předpokladu, že pokud buněčné pohlcení přenášené molekuly již proběhlo, potom přenášená molekula a fotosenzitizační činidlo nejsou v době vystavení světlu soustředěny ve stejných intracelulárních oddílech.

Jak bylo zmíněno výše, přesné načasování přídatku přenášené molekuly a fotosenzitizujícího činidla a načasování ozáření k dosažení výše popsaných účinků musí brát v potaz různé faktory, zahrnující ovlivňované buňky, používaná činidla a používané molekuly a prostředí, v němž se buňky nacházejí, zvláště s ohledem na to, zda je používán systém *in vitro* nebo *in vivo*. Pokud
 45 jsou tyto otázky zohledňovány mohou být příslušná načasování snadno určena.

Jako obecný princip jsou vhodné podmínky stanoveny tak, že krok ozáření by měl být prováděn buď před buněčným pohlcením přenášené molekuly (za předpokladu, že fotosenzitizující činidlo bylo samo již přijmuto do intracelulárních oddílů), nebo po buněčném pohlcení přenášené molekuly za předpokladu, že přenášená molekula a fotosenzitizující činidlo nejsou v době vystavení světlu soustředěny ve stejných intracelulárních oddílech. Při této druhé možnosti bude přenášená molekula samozřejmě uvedena do styku s buňkami v časový okamžik před uskutečněním ozáření. To představuje jedno z upřednostňovaných ztělesnění tohoto vynálezu.

Dříve předkládané způsoby fotochemické internalizace, při nichž byly přenášeny molekuly a fotosenzitizující činidlo přidávány k buňkám před ozáření, závisely na tom, zda příslušné molekuly byly soustředěny ve stejných intracelulárních oddílech před vystavením světlu tak, aby lyze těchto oddílů světelnou aktivací fotosenzitizujícího činidla vyvolala uvolnění jak molekuly, tak i fotosenzitizujícího činidla do cytosolu. Schématické vyjádření takového děje je na Obr. 7 A.

V předkládaných způsobech zjevně fotosenzitizující činidlo a přenášená molekula, jež má být zavedena do cytosolu, nejsou v době vystavení světlu ve stejných intracelulárních oddílech, neboť přenášená molekula se k buňkám přidává pouze krátce před vystavením buněk světlu nebo po něm.

Mechanismus působení podle předkládaného způsobu je stále neznámý a skutečnost, že tento způsob vůbec funguje, je zjevně překvapující. Aniž by bylo žádoucí vázat se teorii, může být důvodem těchto překvapivých nálezů to, že dochází k fúzi fotochemicky poškozených měchýřků s nově vytvořenými endocytotoxickými měchýřky, po níž následuje uvolnění nově endocytovaných molekul do cytosolu. Schématický diagram ozřejmující tento děj je znázorněn na Obr. 7B.

Alternativně může fotochemické poškození lysosomálních enzymů nebo měchýřků obsahujících lysosomální enzymy, jako pozdních endosomů, snížit rychlost intracelulární degradace molekul, jež mají být internalizovány. To může být způsobeno sníženým transportem do měchýřků obsahujících lysosomální enzymy, nebo transportem do endocytálních měchýřků obsahujících menší hydrolytickou aktivitu. V takovém případě budou mít tyto molekuly více času uniknout endocytické kompartmentalizaci, než když je cesta lysosomální degradace aktivní. Dalším alternativním vysvětlením by mohlo být to, že fotochemické ovlivnění buněk vede k menšímu poškození plasmatické membrány buněk, vedoucímu ke zvýšenému pronikání makromolekul přes buněčnou membránu. Ovšem prováděné pokusy (viz Příklad 7) naznačují, že toto vysvětlení se pravděpodobně neuplatňuje.

Předkládaná vynález se tedy týká způsobu přenosu nebo transfekce jakýchkoliv molekul do cytosolu živých buněk buď *in vitro* (tj. v buněčné kultuře) nebo *in vivo*, po němž by molekuly měly být dostupné v cytosolu.

Takové způsoby mohou být použity nejen k přenosu molekul (nebo jejich částí či fragmentů) do nitra buňky, ale za určitých podmínek také k jejich předložení nebo expresi na buněčný povrch. Tedy po přenesení a uvolnění přenášené molekuly do cytosolu způsobem podle předkládaného vynálezu, za předpokladu specializace příslušné buňky nebo buněk, jak je tomu například u buněk předkládající antigen, mohou být molekula nebo její fragment přeneseny na povrch buňky, kde mohou být předkládány, tedy prezentovány na vnější straně buňky, tj. na buněčném povrchu. Takové způsoby mají konkrétní využití v oblasti očkování, kde mohou být složky vakcín, tj. antigeny nebo imunogeny, zavedeny do buňky k předložení na povrch takové buňky a to k indukování, usnadnění nebo zvýšení imunitní odpovědi. Další podrobnosti, týkající se využitelnosti takové schopnosti exprese molekuly na buněčném povrchu, jsou popsány ve WO 00/54 802.

Přenášené molekuly, které mohou být zavedeny do cytosolu buněk způsobem podle předkládaného vynálezu, zahrnují molekuly, které nesnadno procházejí buněčnými membránami. Nadto může předkládaný vynález zvýšit uvolnění do cytosolu a cytosolární aktivitu molekul, které jsou pouze částečně schopné průstupu přes membránu buňky nebo membrány intracelulárních měchýřků. Přenášenými molekulami mohou být organické sloučeniny, proteiny nebo fragmenty proteinů, jako jsou například peptidy, protilátky či antigeny nebo jejich fragmenty. Jinou třídou přenášených molekul pro použití podle tohoto vynálezu jsou cytotoxická léčiva jako proteinové toxiny, nebo cytotoxické organické sloučeniny, například bleomycin. Ještě další třídou vhodných přenášených molekul jsou nukleové kyseliny.

Nukleové kyseliny mohou být použity ve formě genů, kódujících například léčebné proteiny, antikódující, negativní (antisense) RNA molekuly, ribozymy, RNA aptamery nebo triplex vytvářející oligonukleotidy. Alternativně mohou být nukleové kyseliny použity ve formě nekódujících molekul, jako například syntetických DNA anebo RNA negativních molekul, ribozymů, aptamerů, triplex vytvářejících oligonukleotidů, peptidových nukleových kyselin (PNAs), transkripčního faktoru „lákajícího“ DNA (transcription factor „deocy“ DNA) nebo chimerických oligonukleotidů k opravám specifických mutací u pacienta. Pokud je to příhodné, mohou být molekuly nukleové kyseliny ve formě celých genů nebo fragmentů nukleových kyselin, volitelně začleněných do vektorové molekuly nebo entity, například do plasmidového vektoru nebo virové částice či do bakteriofága. Posledně zmíněná forma je zvláště využitelná v případech, kdy má být přenášená molekula použita v metodách genové léčby.

Fotosenzitizujícím činidlem, které má být použito podle předkládaného vynálezu, je výhodně jakékoliv takové činidlo, soustřeďující se do intracelulárních oddílů a zvláště do endosomu nebo lysosomu. V oboru je známa celá škála takových fotosenzitizujících činidel a jsou také popsána v literatuře, včetně WO 96/07 432. V tomto ohledu je třeba zmínit di- a tetrasulfonovaný hlinitý ftalocyanin (například AlPcS_{2a}), sulfonované tetraphenylporfíny (TPPS_n), nilskou modř, deriváty chlorinu e_6 , uroporfyrin I, fyloerythrin, hematoporfyrin a methylenovou modř, u nichž bylo prokázáno, že se soustřeďují v endosomech a lysosomech buněk v kultuře. Ve většině případů je to způsobeno endocytickým pohlcením fotosenzitizeru.

Fotosenzitizujícím činidlem je tedy s výhodou takové činidlo, které je přijímáno do vnitřních oddílů (kompartmentů) lysosomů nebo endosomů. Použita však mohou být i další fotosenzitizující činidla, která se soustřeďují do jiných intracelulárních oddílů, jako například do endoplasmatického retikula nebo do Golgiho aparátu. Je také možné, že se může uplatňovat takový mechanismus, při němž účinky fotochemického ovlivnění působí na další složky buňky (tj. na složky odlišné od membránou vymezených oddílů). Jednou z možností může tedy být například destrukce molekul důležitých pro intracelulární transport nebo fúzi měchýřků fotochemickým ovlivněním. Takové molekuly nemusí být nezbytně soustředěny v membránou vymezených oddílech, ovšem fotochemické poškození takových molekul může přesto vést k fotochemické internalizaci přenášených molekul. Uplatnit se může například mechanismus, při němž fotochemické účinky na takové molekuly vedou ke sníženému přenosu molekuly, jež má být internalizována (tj. přenášené molekuly) do degradačních měchýřků, jako jsou lysosomy, takže molekula, jež má být internalizována, může uniknout do cytosolu dříve, než je degradována. Příkladem takových molekul, nikoliv nezbytně soustředěných do membránou vymezených oddílů, jsou některé molekuly mikrotubulárního transportu jako dynein a složky dynactinu; a například rab5, rab7, vůči N-ethylmaleinimidu citlivý faktor (NSF), rozpustný protein zachycující NSF (soluble NSF attachment protein, SNAP) a podobně.

Třídy vhodných fotosenzitizujících činidel, které lze zmínit, tedy zahrnují porfyriny, ftalocyaniny, purpuriny, chloriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationtová barviva, tetracykliny a lysomotropní slabé báze nebo jejich deriváty (Berg se spoluautory, J. Photochemistry and Photobiology 65, 403–409, 1997). Další vhodná fotosenzitizující činidla zahrnují texafyriny, theoforbidy, porfyceny, bakteriochloriny, ketochloriny, hematoporfyrinové deriváty a deriváty takových látek, endogenní fotosenzitizery indukované kyselinou 5-aminolevulinovou a jejich deriváty, dimery nebo jiné konjugáty fotosyntetizerů.

Fotosenzitizery jsou s výhodou ve volné formě, tj. nejsou konjugované s žádnou další makromolekulou. Ovšem fotosenzitizer může být alternativně spojen s nosičem či připojen nebo konjugován k nosiči nebo jiné molekule, jak bude popsáno dále, například může být připojen na zácílenou protilátku nebo být spojen s nosičem jako je polylysin.

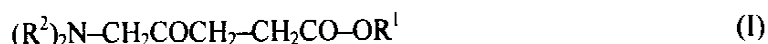
Upřednostňovaná fotosenzitizující činidla zahrnují TPPS_4 , TPPS_{2a} , AlPcS_{2a} a jiné amfifilní fotosenzitizery.

V upřednostňovaném aspektu poskytuje předkládaný vynález způsob, při němž jsou fotosenzitizujícími činidly, která lze použít, kyselina 5-aminolevulinová, estery 5-aminolevulinové kyseliny nebo farmaceuticky přijatelné sole takových sloučenin.

- 5 U zmíněných esterů může být 5-aminová skupina substituovaná nebo nesubstituovaná, ve druhém případě se pak jedná o estery ALA, kyseliny 5-aminolevulinové.

ALA estery pro použití v předkládaném vynálezu jsou konkrétněji estery kyseliny 5-aminolevulinové s volitelně substituovanými alkanoly, tj. alkylové estery nebo substituované alkylové estery.

Estery ALA, které mohou být použity, jsou výhodně sloučeniny o vzorci I,



15 (kde R^1 může představovat alkyl volitelně substituovaný hydroxylovými, alkoxylovými, aminovými, arylovými skupinami, acyloxy skupinami, alkoxykarbonyloxy skupinami, oxoskupinami nebo fluorovými skupinami a volitelně přerušeny kyslíkovými, dusíkovými, sírovými nebo fosforovými atomy; a skupina R^2 , buď shodná nebo odlišná, představuje vodíkový atom nebo skupinu R^1),

nebo sole takových sloučenin.

25 Substituované alkylové R^1 skupiny mohou být mono- nebo polysubstituované. Vhodné R^1 skupiny tedy zahrnují například nesubstituovaný alkyl, alkoxyalkyl, hydroxyalkoxyalkyl, polyhydroxyalkyl, hydroxypolyalkylenoxyalkyl a podobně. Výraz „acyl“, jak je zde používán, zahrnuje jak karboxylátové, tak karbonátové skupiny a tedy acyloxy skupinou substituované alkylové skupiny zahrnují například alkylkarbonyloxyalkyl. V takových skupinách mají kterékoliv alkylonové částice s výhodou takový obsah uhlíkových atomů, jaký je definován níže pro alkylové skupiny. Upřednostňované arylové skupiny zahrnují fenyl a monocyklické, 5 až 7 členné hetero-

30 aromáty, zvláště pak fenyl a takové skupiny mohou být opět samy volitelně substituovány. Reprezentativní substituované alkylové skupiny R^1 zahrnují alkoxyethyl, alkoxyethyl, alkoxypropyl a alkoxypropyl skupiny nebo acyloxyethyl, acyloxyethyl a acyloxypropyl skupiny, například pivaloyloxymethyl.

Upřednostňované estery ALA pro použití jako fotosenzitizující činidla podle tohoto vynálezu zahrnují takové estery ALA, kde R^1 představuje nesubstituovanou alkylovou skupinu a/nebo každá skupina R^2 představuje vodíkový atom.

40 Tak, jak je zde používán, zahrnuje výraz „alkyl“ jakoukoliv alifatickou nasycenou nebo nenasyčenou uhlovodíkovou skupinu s krátkým nebo dlouhým řetězcem, rovným nebo rozvětveným. Nenasyčené alkylové skupiny mohou být mono-nenasycené nebo poly-nenasycené a zahrnují jak alkenylové, tak alkynylové skupiny. Takové skupiny mohou obsahovat až 40 uhlíkových atomů. Přednost se však dává alkylovým skupinám obsahujícím nejvýše 10, například 8, lépe nejvýše 6 a zvláště pak nejvýše 4 uhlíkové atomy.

50 Zejména je potřeba zmínit ALA-methylester, ALA-ethylester, ALA-propylester, ALA-hexylester, ALA-heptylester a ALA-oktylester a jejich sole, které představují upřednostňovaná fotosenzitizující činidla pro použití podle předkládaného vynálezu.

55 Fotosenzitizující činidlo je do styku s buňkou nezbytně uvedeno před ozářením buňky. Na rozdíl od přenášené molekuly by však toto činidlo mělo být podáváno dostatečně před ozářením, tak, aby při ozáření bylo zmíněné činidlo přijmuto do intracelulárního oddílu. Zmíněné činidlo je proto výhodně aplikováno 1 až 72 hodin před ozářením, například 4 až 48 hodin, tedy například

4 až 24 hodin před ozáření. Opět, jak již bylo uvedeno výše ve spojení s krokem uvedení přenášené molekuly do styku s buňkami, načasování podávání fotosenzitizujícího činidla k dosažení styku s cílovou buňkou ve vztahu k okamžiku ozáření bude záviset na době, za kterou se fotosenzitizující činidlo dostane do cílových buněk a bude do nich přijato. Tato doba se může lišit v závislosti na tom, zda je způsob prováděn *in vitro* nebo *in vivo* a na tom, zda jde o podávání přímé do cílové tkáně nebo nepřímé, na vzdáleném místě. Ve všech případech je důležité, aby fotosenzitizující činidlo bylo přijato cílovými buňkami před prováděním ozáření. Zmíněné činidlo může být udržováno ve styku s uvedenými buňkami bezprostředně až do ozáření, například od 1 či 4 do 72 hodin, s výhodou od 4 do 24 hodin, například od 12 do 20 hodin, nebo může být od buněk odstraněno bezprostředně před ozáření, takže buňky jsou například více než 5 minut, například 10 minut až 8 hodin, například 1 hodinu až 4 hodiny v médiu bez přítomnosti činidla.

Volitelně mohou být buď fotosenzitizující činidlo nebo přenášená molekula, nebo obě tyto složky, které mají být zavedeny do buněk, asociovány, spojeny či konjugovány s jednou nebo více molekulami nosiče, cílovými molekulami nebo vektory, které mohou usnadnit nebo zvýšit pohlcení fotosenzitizujícího činidla nebo přenášené molekuly, nebo mohou zacílit či uvolnit tyto entity do zvláštního buněčného typu, tkáně nebo intracelulárního oddílu. Příklady nosičových systémů zahrnují polylysin nebo jiné polykationty, dextranulfát, různé kationtové lipidy, liposomy, rekonstituované LDL-částice, stericky stabilizované liposomy nebo částice adenovirů.

Tyto nosičové systémy mohou obecně zlepšit farmakokinetiky a zvýšit buněčné pohlcování přenášené molekuly a/nebo fotosenzitizujícího činidla a mohou také nasměrovat přenášenou molekulu a/nebo fotosenzitizující činidlo do intracelulárních oddílů, které jsou zvláště výhodné pro dosažení fotochemické internalizace, ale obecně nejsou schopné zacílit přenášenou molekulu a/nebo fotosenzitizující činidlo do specifických buněk (například rakovinných buněk) nebo tkání. Ovšem k získání takto specifických nebo selektivně směřujících nosičových molekul mohou být přenášená molekula nebo fotosenzitizující činidlo spojeny nebo konjugovány se specifickými směrovacími molekulami, které napomůžou specifickému buněčnému pohlcení přenášené molekuly do požadovaných buněk nebo tkání. Takové směrovací molekuly mohou rovněž namířit přenášenou molekulu do intracelulárních oddílů, které jsou zvláště výhodné k dosažení fotochemické internalizace.

Použito může být mnoho různých směrovacích molekul, například jak popisují D. T. Curiel v Ann. New York Acad. Sci. 886, 158–171, 1999; G. Bilbao se spoluautory v Gene Therapy of Cancer (vydavatelé Walden a spol., Plenum Press, New York, 1998); K. W. Peng a S. J. Russell v Curr. Opin. Biotechnol. 10, 454–457, 1999; a T. J. Wickham v Gene Ther. 7, 110–114, 2000.

Nosičová molekula a/nebo směrovací molekula může být spojena, navázána nebo konjugována s přenášenou molekulou, s fotosenzitizujícím činidlem nebo s oběma a použity mohou být stejné nebo odlišné nosiče či směrovací molekuly. Pokud jsou například jako nosič použity částice adenoviru, pak mohou být přenášené molekuly začleněny do adenovirových částic. Například pokud je přenášenou molekulou molekula DNA kódující protein nebo molekula RNA, potom je DNA začleněna do virového vektoru a po fotochemické internalizaci bude molekula DNA přítomna na správném intracelulárním místě tak, aby mohla nastat exprese kódované molekuly.

Expres takových molekul může být řízena vytvořením vektoru, způsoby dobře známými a popsány v oboru. Například k získání tkáňové specifické nebo vzhledem k onemocnění specifické či regulovatelné exprese lze použít regulační prvky, jako jsou například tkáňové specifické nebo regulovatelné promotory. Použit je možné například tkáňový specifický promotor, promotor vůči melanomu specifické tyrosinázy. Dobře známé jsou regulovatelné promotory, jako tetracyklinem regulované promotory. Více příkladů specifických nebo regulovatelných promotorů, které lze použít v předkládaném vynálezu, je možné najít v pracích I. R. Harta v Semin. Oncol. 23, 154–158, 1996; D. E. Hallahana a spoluautorů, Nature Med. 1, 786–791, 1995; M. C. Luny a spoluautorů, Cancer Res. 60, 1637–1644, 2000; N. Millera a J. Whelana, Hum. Gene

Ther., 1997; T. J. Wickhama v Gene Ther. 7, 110–114, 2000; D. M. Nettelbecka a J. V. Mullera v Trends Genet. 16, 174–181, 2000; T. Clacksona v Gene Therp. 7, 120–125, 2000; S. Freundlieba se spoluautory v J. Gene Med. 1, 4–12, 1999; M. A. Speara v Anticancer Res. 18, 3223–3231, 1998; D. M. Harveye a C. T. Caskeye v Curr. Opin. Chem. Biol. 2, 512–518, 1998; B. M. Claryho a H. K. Lysterlyho v Surg. Oncol. Clin. North Am. 7, 565–574, 1998; M. C. Luny se spoluautory v Cancer Res. 60, 1637–1644, 2000 a ve zde uvedených odkazech.

Jak bylo uvedeno výše, je možné souběžně použít více než jeden nosič a/nebo vektor či směrovací molekulu. Vektory mohou být například poskytnut v nosiči, například virové vektory, jako je adenovirus, mohou být nesený například v liposomu nebo v polykationtové struktuře. Upřednostňované nosiče a vektory pro použití v předkládaném vynálezu, zvláště pro použití ve spojení s přenášenou molekulou, zahrnují adenoviry, polykationty jako polylysin (například poly-L-lysin nebo poly-D-lysin), polyethylenimin či dendrimery (například kationtové dendrimery jako SuperFect®); kationtové lipidy jako DOTAP nebo Lipofectin; peptidy a směrovací vektory jako například transferin polylysin nebo zacílené adenovirové vektory. V zvláště upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu je potom nosičem adenovirus.

Takové směrující molekuly nebo nosiče, jaké byly popsány výše, mohou být také použity k namíření přenášené molekuly do konkrétních intracelulárních oddílů, které jsou zvláště příhodné pro využití PCI, například do lysosomů nebo endosomů.

Intracelulárním, membránou vymezeným oddílem může být kterýkoliv takový oddíl, který je přítomný v buňce. S výhodou bude takovým oddílem membránový měchýřek, zvláště endosom nebo lysosom, ovšem intracelulární oddíl může také zahrnovat Golgiho aparát nebo endoplasmatické retikulum.

Krok ozáření světlem pro aktivování fotosenzitizujícího činidla může být prováděn technikami a postupy dobře známými v oboru. Vlnová délka a intenzita světla mohou být například zvoleny podle použitého fotosenzitizujícího činidla. Vhodné světelné zdroje jsou v oboru dobře známé. Doba, po kterou jsou buňky vystaveny světlu v metodách podle předkládaného vynálezu, se může lišit. Účinnost internalizace přenášené molekuly do cytosolu se zdá zvyšovat s rostoucím vystavením světlu. Upřednostňovaná doba v kroku ozáření závisí na fotosenzitizeru, na množství fotosenzitizeru shromážděném v cílových buňkách nebo v tkáni a na překryvu mezi absorpčním spektrem fotosenzitizeru a emisním spektrem světelného zdroje.

Obecně bude trvání kroku ozáření v řádu od minut do několika hodin, například s výhodou do 60 minut, například od 0,5 nebo 1 minuty do 30 minut, například od 0,5 minuty do 3 minut nebo od 1 minuty do 5 minut nebo od 1 minuty do 10 minut, například od 3 do 7 minut a s výhodou přibližně 3 minuty, například od 2,5 do 3,5 minuty.

Vhodné dávky světla mohou být zvoleny odborníkem v oboru a opět budou záviset na typu fotosenzitizeru a na množství fotosenzitizeru nashromážděného v cílových buňkách nebo tkáních. Dávky světla, typicky používané k fotodynamické léčbě rakoviny za přítomnosti fotosenzitizeru Photofrinu a protoporfyrinového prekurzoru kyseliny 5-aminolevulinové jsou například v rozmezí od 50 do 150 J/cm² a v rozmezí světelného toku menším než 200 mW/cm² k zabránění hypertermie. Dávky světla jsou obvykle nižší, pokud jsou použity fotosenzitizery s vyššími extinkčními koeficienty v červené oblasti viditelného spektra. Ovšem k léčbě nerakovinných tkání, v nichž se shromažďuje menší množství fotosenzitizeru, musí být celkové množství světla podstatně vyšší než u léčby rakoviny.

Stanovení vhodných dávek zacílených molekul pro použití ve způsobech podle tohoto vynálezu by mělo být pro odborníka v oboru rutinní praxí. Pokud je přenášenou molekulou bílkovina nebo peptid, měly by být přenášené molekuly pro aplikaci *in vitro* obecně použity v dávkách menších než 5 mg/ml (například 0,1 až 5 mg/ml) a pro aplikace *in vivo* by přenášené molekuly měly být obecně používány v dávkách menších než 5 mg/kg (například 0,1 až 5 mg/kg). Pokud je přenáše-

nou molekulou nukleová kyselina, měla by příkladná dávka přenášených molekul pro aplikace *in vitro* být přibližně 0,1 až 50 μg nukleové kyseliny na 10^4 buněk a pro aplikace *in vivo* přibližně 10^{-6} až 1 g nukleové kyseliny na 1 injekci u člověka. Pokud je přenášená molekula spojena s adenovirovým nosičem, měla by příkladná dávka pro aplikace *in vitro* představovat 1 až 1×10^5 fyzických virových částic, například 1×10^3 až 1×10^5 částic na buňku a pro aplikace *in vivo* může být molekula, zaváděná ve spojení s adenovirovým nosičem, přítomna v koncentraci 1×10^{-9} až 50 %, jako 3×10^{-6} až 50 %, například 0,003 až 30 %, například 0,2 až 10 % (hmotnost/hmotnost) virových částic v konečném prostředí pro použití *in vivo*, přičemž údaj hmotnost/hmotnost se týká hmotnosti virového nosiče přidávaného k molekule, jež má být zaváděna, vzhledem k hmotnosti celkového prostředí. Pokud se používá injekce o objemu 1 ml, bude odpovídat dávce přibližně 10^5 až 10^{15} fyzických virových částic.

Způsoby podle tohoto vynálezu budou nevyhnutelně vyvolávat určitou úmrtnost buněk vzhledem k fotochemické léčbě, tj. působení fotosenzitizujícího činidla. Tato smrt buněk nebude na závalu a dokonce může být výhodná u mnoha aplikací (například u léčby rakoviny) a způsoby podle tohoto vynálezu mohou být upraveny tak, že podíl přežívajících buněk je řízen volbou světelné dávky vzhledem ke koncentraci fotosenzitizačního činidla. Takové techniky jsou v oboru známy. Bez ohledu na množství buněk, usmrčených čistým fotochemickým působením, je důležité, že světelná dávka je řízena tak, že některé z jednotlivých buněk u nichž se projeví PCI účinek, nejsou usmrčeny pouhým fotochemickým ovlivněním (ačkoliv mohou být následně usmrčeny působením PCI účinku).

U některých aplikací může být výhodné zachovat po působení PCI větší množství živých buněk. Například při vakcinaci a u některých způsobů genové léčby je důležité zachovat živé buňky, které umožní například prezentaci antigenu nebo expresi proteinu. U takových aplikací je výhodné, aby u celé populace nebo prostě většiny buněk, v podstatě u veškerých buněk nebo u jejich významné většiny (například alespoň u 50 %, lépe alespoň o 60, 70, 80 nebo 90 % buněk) nedošlo k usmrcení. To ovšem není vždycky žádoucí, zvláště pokud se PCI používá k zavedení cytotoxických přenášených molekul a následné buněčné usmrcení pak není nevýhodné. Cytotoxické účinky mohou ovšem být dosaženy také za použití například genové léčby, při níž je léčebný gen internalizován do nádorových buněk způsobem podle tohoto vynálezu, například tak, že tyto buňky budou produkovat imunologicky aktivní sloučeniny, které budou indukovat místní imunologické zahubení zbývajících rakovinných buněk nebo budou indukovat systémovou imunitní odpověď vůči nádorovým buňkám. V takových případech je po PCI léčbě vyžadován pouze podíl živoucích buněk.

Výhodami předkládaných způsobů a sekvencí (posloupností) léčebných kroků a zvláště takových ztělesnění, v nichž se přenášená molekula přidává k buňkám po kroku ozáření světlem, je ve srovnání s dříve popsány metodami to, že

- a) se sníží fotochemické poškození přenášené molekuly;
- b) se zjednoduší PCI působení na vnitřní leze v kombinaci s chirurgickým zákrokem, neboť po takovém zákroku může být uplatněno fotochemické působení, například nitronádorová injekce nebo jiné místní podání přenášené molekuly;
- c) způsoby jsou více nezávislé na přesném načasování léčby, tj. na načasování přidavku molekuly, která má být pohlcena buňkami, vzhledem k okamžiku ozáření. To znamená, že zde existuje větší „časové okno“ pro léčbu. Je to důležité z toho důvodu, že pohlcení léčebné molekuly se může široce lišit za různých klinických situací a nadto je obtížné odhadnout pohlcení u jednotlivých lezí v klinické situaci; z toho důvodu je větší časové okno extrémně výhodné;
- d) dochází k rychlému přemístění přenášené molekuly do cytosolu, čímž se podstatně snižuje možnost lysosomální degradace přenášené molekuly.

Tyto výhody se uplatňují navíc, kromě výhod spojených se samotnými PCI metodami internalizace molekul, kterými je to, že

- 1) neexistuje žádné omezení velikosti molekuly, která má být internalizována a přenesena do cytosolu, pokud může být tato molekula endocytována cílovou buňkou;
- 2) uváděné způsoby nejsou závislé na buněčné proliferaci;
- 3) uváděné způsoby jsou místně specifické v tom, že ovlivněny budou pouze plochy vystavené světlu;
- 4) metoda není onkogenní.

Kroky „uvádění do styku“ buněk s fotosenzitizujícím činidlem a s přenášenou molekulou mohou být prováděny jakýmkoliv běžným nebo požadovaným způsobem. Pokud má být krok uvádění do styku prováděn *in vitro*, mohou být buňky výhodně udržovány ve vodném médiu, jako je například vhodné buněčné kultivační médium a fotosenzitizující činidlo nebo přenášovaná molekula mohou být ve vhodném časovém okamžiku jednoduše přidány do média za vhodných podmínek, například ve vhodné koncentraci a na vhodné časové období.

Fotosenzitizující činidlo se uvádí do styku s buňkami ve vhodné koncentraci a po vhodné časové období, což může být snadno stanoveno odborníkem za použití rutinních postupů a bude záviset na konkrétním použitém fotosenzitizujícím činidle a na typu buněk. Koncentrace fotosenzitizujícího činidla musí být taková, že jakmile je toto činidlo jednou přijato do buněk, například do jednoho nebo více z intracelulárních oddílů těchto buněk nebo je s takovými oddíly spojeno, a je aktivováno ozářením, jedna nebo více z buněčných struktur je rozrušena, například jeden nebo více z intracelulárních oddílů je lyzován nebo rozrušen. Například fotosenzitizující činidla, používaná ve zde uváděných příkladech, mohou být použita v koncentraci 10 až 50 µg/ml. Pro použití *in vitro* může být toto rozmezí ještě širší, například od 0,05 do 500 µg/ml. Pro humánní léčbu *in vivo* může být fotosenzitizující činidlo použito v rozmezí od 0,05 do 20 mg/kg tělesné hmotnosti při systematickém podávání, nebo v rozmezí od 0,1 do 20 % v rozpouštědle pro místní nanesení. U menších zvířat může být koncentrační rozmezí odlišné a může být odpovídajícím způsobem upraveno.

Doba inkubace buněk s fotosenzitizujícím činidlem (tj. doba „styku“) se může lišit pohybovat od několika minut do několika hodin, například až do 48 hodin nebo déle. Doba inkubace by měla být taková, aby bylo fotosenzitizující činidlo přijato do vhodných buněk.

Po inkubaci buněk s fotosenzitizujícím činidlem může volitelně následovat období inkubace s médiem bez přítomnosti fotosenzitizeru ještě před tím, než jsou buňky vystaveny světlu nebo než je přidána přenášovaná molekula.

Přenášovou molekulou může být jakékoliv molekula, jak byla diskutována výše a taková molekula je uváděna do styku s buňkami ve vhodné koncentraci a na vhodné časové období. Překvapivě bylo zjištěno, že styk může být iniciován dokonce několik hodin po ozáření. Vhodná koncentrace může být stanovena v závislosti na účinnosti přijímání příslušné molekuly do buněk a na konečné koncentraci, jež má být v těchto buňkách dosažena. „Doba transfekce“ nebo „doba buněčného pohlcení“, tj. doba, po kterou jsou molekuly ve styku s buňkami, může být v rozmezí od několika minut až do několika hodin. Použita může být například doba transfekce od 10 minut až do 24 hodin, například od 30 minut do 10 hodin, nebo například od 30 minut až do 2 hodin nebo 6 hodin. Prodloužená doba transfekce má obvykle za následek zvýšené pohlcení příslušné molekuly. Ovšem zkrácené doby inkubace, například od 30 minut do 1 hodiny, se zdají poskytovat zlepšenou specifičnost pohlcení molekuly. Při volbě doby transfekce pro jakoukoliv metodu je tedy nutné zvolit patřičnou rovnováhu mezi dosažením dostatečného pohlcování molekul při zachování dostatečné specifičnosti takového pohlcování.

Za podmínek *in vivo* bude vhodný způsob a doba inkubace, při níž jsou přenášené molekuly a fotosenzitizující činidla uváděny do styku s cílovými buňkami, záviset na způsobu podávání a na typu přenášované molekuly a fotosenzitizujících činidel. Pokud se například přenášovaná molekula injikuje do nádoru jenž má být léčen, dostanou se buňky v blízkosti místa injekce do

styku s přenášenou molekulou a mají tedy sklon přijímat přenášenou molekulu rychleji než buňky, nacházející se ve větší vzdálenosti od místa injekce, která se pravděpodobně do styku s přenášenou molekulou dostanou později a v nižší koncentraci. Kromě toho může přenášené molekule, poskytované intravenózní injekcí, trvat určitou dobu, než se dostane k cílovým buňkám a proto může období po podání trvat déle, například několik dnů, než se dostatečně nebo optimální množství přenášené molekuly nahromadí v cílových buňkách nebo tkáních. Stejně úvahy samozřejmě platí i pro dobu podávání, stanovenou pro pohlcení fotosenzitizujícího činidla do buněk. Doba podávání, která je vyžadována u jednotlivých buněk *in vivo*, se tedy pravděpodobně mění v závislosti na těchto a dalších parametrech.

Přesto, i když je situace *in vivo* komplikovanější než *in vitro*, je základní koncept předkládaného vynálezu stále stejný, tj. doba, ve které se molekuly dostanou do styku s cílovými buňkami musí být taková, aby před ozáření bylo cílovými buňkami přijato příslušné množství fotosenzitizujícího činidla a buď: (i) před ozáření nebo během ozáření byla přenášená molekula buď pohlcena nebo po dostatečném styku s cílovými buňkami došlo k jejímu pohlcení do odlišných intracelulárních oddílů nebo (ii) po ozáření byla přenášená molekula ve styku s buňkami po dostatečné časové období k umožnění jejího pohlcení do buněk. Za předpokladu, že přenášená molekula je pohlcena do odlišných intracelulárních oddílů vzhledem k fotosenzitizujícímu činidlu, může být přenášená molekula pohlcena před ozáření nebo po něm.

Výraz „buňka“ se zde používá k zahrnutí všech eukaryotických buněk (včetně buněk hmyzu a hub). Reprezentativní „buňky“ tedy zahrnují všechny typy savčích a nesavčích živočišných buněk, rostlinných buněk, hmyzích buněk, buněk hub a prvoků.

Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být používány *in vitro* nebo *in vivo*, buď při léčbě *in situ* (místně, například za použití zacílených částic) nebo při léčbě *ex vivo* s následným podáním léčených buněk do těla.

Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být použity například k léčbě rakoviny. Některé fotosenzitizery se shromažďují přednostně v neoplastických tkáních, selektivnost vzhledem k nádoru ve srovnání s okolní tkání může mít obvykle faktor 2 až 3, ovšem tento faktor může být v některých případech, jako u mozkových tkání, vyšší tj. až do 30. Alternativně může být konkrétní fotosenzitizující činidlo zacíleno na konkrétní nádor výše popsány způsoby. Nadto molekuly, které mohou být klinicky zajímavé pro léčbu rakoviny, ale jsou omezeny malým nebo nulovým přijímáním do cytosolu, mohou být zavedeny do cytosolu a namířeny vůči specifickým buňkám prostřednictvím předkládaného vynálezu. Příkladem takové molekuly je gelonin, který bude uveden níže. Použity mohou být i jiné molekuly, buď samotné nebo navázané na další molekuly, které označují molekuly, jež mají být internalizovány do konkrétní buňky (například protilátky, transferrin, fotosenzitizery, apoB na rekonstituovaných LDL částicích). Výhodou takové kombinační léčby by mělo být 1) zvýšení cytotoxického účinku ve spodnějších vrstvách nádorových tkání, neboť k rozrušení lysosomů a endosomů dostačují nízké a subtoxické dávky světla; 2) zvýšení specifičnosti a léčby, neboť PCI se dává pouze do oblasti nádoru.

Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být rovněž použity k léčbě různých dalších poruch, vyžadujících výběr molekuly pro zavedení do buňky, jako jsou revmatoidní artritida, ateroskleróza a jiná kardiovaskulární onemocnění, virové a jiné infekce, lupénka, sluneční keratóza, léčba poranění, léčba zlomenin, bradavice a vrozené genetické poruchy jako cystická fibróza, Gorlinův syndrom a ataxie telangiectasia.

Způsoby podle tohoto vynálezu mohou být rovněž použity při genové léčbě, tj. při léčebném přenosu genů do buněk pacienta. Genová léčba je nadějná jako způsob léčby mnoha onemocnění, jako jsou rakovina, kardiovaskulární onemocnění, virová onemocnění, monogenní poruchy jako cystická fibróza a mnoho dalších stavů jako jsou ty, popsané výše.

Významnou obtíží současné genové léčby je nutnost vysoké účinnosti a specifčnosti genového přenosu, který musí probíhat *in vivo*. V používaných způsobech se k dosažení genového přenosu v genové léčbě využívá mnoho různých nosičů nebo vektorů. Jako příklady lze zmínit polykationtové sloučeniny, kationtové lipidy a virové systémy, ovšem až dosud se genová léčba *in vivo* setkávala jen s malým úspěchem. Mezi mnohé známé výhody současných způsobů patří malá stálost vektoru v séru, omezená specifčnost při poskytnutí genu, malá účinnost poskytnutí genu a podobně. Způsoby PCI podle předkládaného vynálezu poskytují prostředky k podstatnému zlepšení jak účinnosti, tak i specifčnosti mnoha metod dodání genu, používaných v současnosti v genové léčbě, a to zlepšením kroku endosomálního uvolnění, který může být krokem určujícím účinnost jak u mnoha syntetických vektorů poskytujících gen, tak u různých virových systémů. Také ovlivnění světlem, patřící do způsobu PCI, umožňuje přesnější stanovení toho, kde by mělo v těle dojít ke zvýšenému genovému přenosu, neboť zvýšení účinnosti genového přenosu nastane pouze v ozářených oblastech. Transfekce se může uskutečnit *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo* (příčemž buňky nebo tkáně se příslušným způsobem podávají pacientovi). Vhodné nosiče a vektory pro transfekci s výhodou zahrnují adenoviry, polykationty jako polylysin (například poly-D-lysin nebo poly-L-lysin), SuperFect®, polyethylenimin nebo dendrimery; kationtové lipidy jako DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylamino)propan) nebo Lipofectin, nebo kationtové lipidy formulované s „pomocným lipidem“ jako DOPE (dioleoylfosfatidylethanolamin); peptidy a zacílené vektory jako například transferrin polylysin nebo zacílené adenovirové vektory. V upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu je nosičem použitým pro léčebný gen adenovirus.

Jiným upřednostňovaným aspektem předkládaného vynálezu je použití nevirových nosičových systémů, jakými jsou například kationtové polymery, obsahující peptidy a kationtové lipidy. Typické polymery zahrnují například polyamin, polyaminokyseliny včetně bazických polyaminokyselin, syntetické a přírodní kationtové cukerné polymery, methakrylátové polymery, dendrimery, polyalkyleniminy a další polymery známé v oboru jako vhodné pro dodání léčiv; zvláště polymery vhodné pro dodání genu. Typickými sloučeninami, použitelnými podle předkládaného vynálezu, jsou polylysin, polarginin, poly-L-glutamová kyselina, polyvinylpyridin, chitosan, polyethylenimin, poly(2-dimethylamino)ethylmethakrylát, histony, protamin, poly(L-ornitin), avidin, spermin, spermidin a jakýkoliv derivát uvedených látek. V upřednostňovaném aspektu předkládaného vynálezu mohou být zde popsané polymery kombinovány s jinými polymery nebo kombinovány s jinými systémy dodávajícími gen. Nevirový systém pro dodání genu, který je použitelný podle předkládaného vynálezu, je například popsán R. I. Mahatem a spoluautory v *Advances in Genetics* 41, 95–156, vyd. J. C. Hall a další, 1999. Kationtové polymery jsou dále popsány M. C. Garnettem v *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 16, 147–207, 1999; K. A. Howardem se spoluautory v *Biochimica et Biophysica Acta* 1475, 245–255, 2000; H. K. Nguyenem a spoluautory v *Gene Therapy* 7, 126–138, 2000; A. Braganzim a spoluautory v *J. Controlled Release* 65, 187–202, 2000; S. C. DeSmedtem a spoluautory v *Pharmaceutical Research* 17, 113–126, 2000 a R. I. Mahatem v *J. Drug Targeting* 7, 249–268, 1999.

Jiný aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje využití liposomů nebo jiných konstruktů na bázi lipidů jako nevirových nosičových systémů. Liposomy mohou být vůči pH-citlivé liposomy nebo vůči pH necitlivé liposomy. Vůči pH citlivé liposomy sestávají z alespoň jedné vůči pH citlivé složky liposomální membrány. Typické sloučeniny zahrnují mastné kyseliny jako je kyselina olejová, palmitoylhomocystein, cholesterol, hemisukcinátová morfolinová sůl a dioleysukcinylglycerol. Kromě složek citlivých vůči pH mohou liposomy zahrnovat dioleyslfosfatidylethanolamin (DOPE) a/nebo jiné podobné fosfolipidy.

Liposomy nebo jiné přenašecí systémy na bázi lipidů s výhodou obsahují alespoň jeden kationtový lipid.

Přenašecí (dodávací) systémy na bázi lipidů mohou být přítomné v různých typech vodných přípravků. V literatuře se pro takové přípravky používají různé názvy: multilamelární liposomy,

jednovrstvé (unilamelární) liposomy, vůči pH citlivé liposomy, nanoemulze, nanočástice, proteo-liposomy, virosomy, chimerasomy, kocheláty, lipofectin® a lipoplex. Odkazy na použití kationtových lipidů v genovém přenosu zahrnují práce: P. L. Felgner se spoluautory, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7413–7417, 1987; D. D. Lasic se spoluautory, Adv. Drug Del. Rev. **20**, 221–266, 1996; L. G. Barron se spoluautory, Gene Therapy **6**, 1179–1183, 1999; S. Kawakami se spoluautory, Pharmaceutical Research **17**, 306–313, 2000; N. S. Templeton se spoluautory, Molecular Biotechnology **11**, 175–180, 1999; Y. Zou se spoluautory, Cancer Gene Therapy **7**, 683–696, 2000; D. D. Stuart se spoluautory, Biochemistry et Biophysica Acta **1463**, 219–229, 2000; R. I. Mahato se spoluautory, Drug Deliv. **4**, 151, 1997 a R. J. Lee se spoluautory, Crit. Rev. Drug Carrier Syst. **14**, 173, 1997.

Tuky použitelné podle předkládaného vynálezu jsou popsány například v patentech US 6 120 751, US 6 056 938, US 6 093 816, US 6 039 936, US 6 034 137, US 6 034 135, US 6 020 526, US 5 980 935, US 5 958 935, US 5 935 936, US 5 877 220, US 5 830 430, US 5 777 153, US 5 705 693, US 5 459 127, US 5 334 761, US 5 264 618 a v odkazech v nich uvedených.

Typické příklady kationtových lipidů zahrnují N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylamoniumchlorid (DOTMA), 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylamoniumbromid (DMRIE), 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylamino)propan (DOTAP), 3β(N',N'-dimethylaminoethan)-karbamoylcholesterol (DC-Chol), 2,3-dioleoyl-oxy-N[2-sperminkarboxy-yl-amido]-ethyl-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetát (DOS PA), 3-β(N⁴-sperminkarbamoyl)-cholesterol, 3-β(N⁴-spermidinkarbamoyl)cholesterol a dioktadecylamidoglylspermin (DOGS).

Jak bylo popsáno výše, v jednom z upřednostňovaných ztělesnění předkládaného vynálezu je nosičem kationtový lipid. Již dříve bylo zjištěno, že fotochemické působení má inhibující účinek na transfekci zprostředkovanou kationtovými lipidy, pokud je světlo poskytnuto až po přenášené molekule (Prasmickaite se spoluautory, J. Gene Med. **6**, 2000). Ovšem nyní bylo velmi překvapivě prokázáno, že pokud se světlo uplatní před aplikací přenášené molekuly, má PCI stimulační účinek na transfekci prostřednictvím kationtových lipidů (viz Příklad 9).

Jako další aspekt tedy předkládaný vynález poskytuje prostředky, obsahující přenášenou molekulu a fotosenzitizující činidlo pro použití k léčbě. Přenášená molekula a/nebo fotosenzitizující činidlo mohou být v prostředcích volitelně spojeny s nosičovými molekulami jako jsou ty, popsané výše. Prostředky se s výhodou používají pro léčbu rakoviny nebo pro genovou léčbu. Upřednostňovanou nosičovou molekulou pro genovou léčbu je adenovirus. Jinými upřednostňovanými nosiči jsou kationtové lipidy.

V dalším aspektu tedy předkládaný vynález poskytuje použití přenášené molekuly a/nebo fotosenzitizujícího činidla, jak byly popsány výše, k přípravě léčiva pro použití k léčbě, kde uvedené fotosenzitizující činidlo a odděleně i zmíněná přenášená molekula jsou uvedeny do styku s buňkami nebo tkáněmi pacienta a zmíněné buňky jsou ozářeny světlem o vlnové délce, která je účinná k aktivaci fotosenzitizujícího činidla, ozáření se provádí před buněčným pohlcením zmíněné přenášené molekuly do intracelulárního oddílu obsahujícího uvedenou fotosenzitizující činidlo, s výhodou pak před buněčným pohlcením zmíněné přenášené molekuly do kteréhokoliv intracelulárního oddílu. Způsoby léčby, obsahující takové metody, vytvářejí alternativní aspekty předkládaného vynálezu.

Vynález tedy poskytuje způsob léčby nebo prevence onemocnění, poruchy, nebo infekce u pacienta, zahrnující uvedení přenášené molekuly do jedné nebo do více buněk *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo* způsobem, jaký zde byl výše popsán a tam, kde je to nezbytné (tj. pokud se transfekce provádí *in vitro* nebo *ex vivo*), podávání uvedených buněk zmíněnému pacientovi.

Tak, jak je zde definován, týká se výraz „léčba“ snížení, zmírnění nebo odstranění jednoho nebo více z příznaků onemocnění, poruchy nebo infekce, které mají být léčeny a to vzhledem k přízna-

kům, pozorovaným před léčbou. „Prevence“ se týká opoždění nebo zabránění nástupu příznaků onemocnění, poruchy nebo infekce.

5 Jak bylo uvedeno dříve, mají takové způsoby, využití i při vakcinaci. Proto je dalším aspektem předkládaného vynálezu poskytnutí způsobu exprese nebo prezentace (předložení) antigenní molekuly (přenášené molekuly) nebo její části na povrchu buňky, s výhodou buňky předkládající antigen, přičemž zmíněný způsob zahrnuje kroky, jak zde byly dříve definovány.

10 Výrazy „exprese“ nebo „prezentace“, jak zde byly použity, se týkají přítomnosti molekuly nebo její části na povrchu zmíněné buňky tak, že alespoň část této molekuly je vystavena a je dostupná pro okolní prostředí takové buňky. Na „povrchu“ může být dosaženo takové exprese, kdy molekula, která má být exprimována, je ve styku s buněčnou membránou a/nebo se složkami, které mají být přítomny na této membráně.

15 Tento způsob může být prováděn *in vitro* nebo *in vivo*. Ovšem s výhodou může taková antigenní prezentace výhodně vyvolat stimulaci imunitní odpovědi, lépe pak imunitní odpovědi, která poskytuje ochranu vůči následné provokaci entitou, obsahující nebo zahrnující zmíněnou antigenní molekulu nebo její část a v důsledku toho předkládaný vynález nachází zvláštní využití jako způsobu vakcinace. Předkládaný vynález tedy s výhodou poskytuje způsob vakcinace, zahrnující metodu, která zde byla výše popsána.

20 V tomto aspektu předkládaného vynálezu je přenášená molekula definována jako odpovídající „antigenní molekule“. Antigenní molekulou může být jakákoliv molekula, pokud je taková molekula nebo její část schopna stimulovat imunitní odpověď pokud je prezentována imunitnímu systému patřičným způsobem. Antigenní molekulou bude tedy s výhodou vakcínový antigen nebo složka vakcíny, jako je entita obsahující polypeptid.

30 V oboru je známo mnoho takových antigenů nebo složek antigenních vakcín a zahrnují veškeré typy bakteriálních nebo virových antigenů nebo skutečných antigenů či antigenních složek jakýchkoliv patogenních druhů, včetně prvoků či vyšších organismů. Zatímco tradičně antigenní složky vakcín obsahovaly celé organismy (ať už živé, mrtvé nebo oslabené) tj. jednalo se o vakcíny s celými buňkami, široce byly studovány a v literatuře byly popsány také subbuněčné vakcíny, tj. vakcíny, založené na konkrétních antigenních složkách organismů, například proteinech či peptidech nebo dokonce cukrech. Jakákoliv taková složka „subbuněčné“ vakcíny může být pou-
35 žita jako antigenní molekula v předkládaném vynálezu. Ovšem tento vynález nachází zvláštní využití v oblasti peptidových vakcín.

Upřednostňovanou antigenní molekulou podle tohoto vynálezu je tedy peptid, (který je zde definován jako zahrnující peptidy o kratších i delších délkách řetězce, tj. peptidy, oligopeptidy
40 nebo polypeptidy a rovněž proteinové molekuly nebo jejich fragmenty, například peptidy o 5 až 500, například 10 až 250, jako 15 až 75 nebo 8 až 25 aminokyselinách). Části antigenních molekul, které jsou předkládány nebo exprimovány, s výhodou zahrnují takové části, které jsou vytvářeny mechanismem zpracování antigenu (antigen-processing machinery) v buňce. Takové části mohou být ovšem vytvářeny i jinými způsoby, jako vhodnou úpravou antigenu (například
45 vůči pH citlivé proužky) nebo pomocí jiných prostředků ke zpracování buňky. Výhodně mají takové části dostatečnou velikost pro vyvolání imunitní odpovědi, například v případě peptidů je to velikost větší než 5, například větší než 10 nebo 20 aminokyselin.

50 V literatuře bylo navrženo velké množství kandidátů na peptidové vakcíny, například pro léčbu virových onemocnění a infekcí jako AIDS/HIV infekce nebo chřipky, psích parvovirů, virů hovězí leukémie, hepatitidy a podobně (viz například Phanuphak se spoluautory, Asian Pac. J. Allergy, Immunol. 15 (1), 41–48, 1997; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 69 (4), 811–820, 1994; Casal se spoluautory, J. Virol. 69 (11), 7274–7277, 1995; Belyakov se spoluautory, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (4), 1709–1714, 1998; Naruse se spoluautory, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
55 91 (20), 9588–9592, 1994; Kabeya se spoluautory, Vaccine 14 (12), 1118–1122, 1996; Itoh se

spoluautory, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** (23), 9174–9178, 1986). Podobně mohou být použity bakteriální peptidy, stejně jako peptidové antigeny, které byly získány z jiných organismů nebo druhů.

- 5 Kromě antigenů získaných z patogenních organismů bylo rovněž navrženo použití peptidů jako
vakuin vůči rakovině nebo jiným onemocněním, jako roztroušené skleróze. Například mutantní
onkogenní peptidy jsou velmi nadějně jako rakovinné vakuiny, představující antigeny při
simulaci cytotoxických T lymfocytů. (Schirmacher, Journal of Cancer Research and Clinical
Oncology **121**, 443–451, 1995; Curtis, Cancer Chemoterapy and Biological Response Modifiers
10 17, 316–327, 1997). Syntetická peptidová vakuína byla také hodnocena vzhledem ke vhodnosti
pro léčbu metastatického melanomu (Rosenberg se spoluautory Nat. Med. **4**(3), 321–327, 1998).
Vakuína na bázi T–buněčného receptorového peptidu k léčbě roztroušené sklerózy je popsána
Wilsonem a spoluautory v J. Neuroimmunol. **76**(1–2), 15–28, 1997. Jakákoliv taková složka
peptidové vakuiny může být použita jako antigenní molekula podle tohoto vynálezu, stejně jako
15 kterýkoliv z peptidů, popsáných nebo navržených v literatuře jako peptidové vakuiny. Takový
peptid může být tedy syntetický nebo izolovaný, či jinak získaný z organismu.

20 Buňkami, které jsou používány v těchto způsobech, použitích a podobně podle předkládaného
vynálezu, mohou být jakékoliv buňky, které jsou schopné exprimovat nebo prezentovat na svém
povrchu molekulu, která je podávána nebo přenášena do jejich cytosolu.

Vzhledem k tomu, že prvotní využití tohoto aspektu předloženého vynálezu spočívá v antigenní
prezentaci nebo vakuinaci, buňkami jsou výhodně imunitní efektorové buňky, tj. buňky účastníci
se imunitní odpovědi. Předkládat antigen imunitnímu systému však mohou i jiné buňky a ty rov-
25 něž patří do rozsahu tohoto aspektu vynálezu. Buňkami podle tohoto aspektu jsou tedy výhodně
buňky předkládající (prezentující) antigen. Buňky prezentující antigen mohou být začleněny
v kterékoliv části nebo „rameni“ imunitní odpovědi, zahrnující jak humorální, tak i buněčně zpro-
středkovanou imunitu, například stimulaci tvorby protilátek nebo stimulaci cytotoxických či zabí-
ječských buněk, které mohou rozpoznat a zničit (nebo jinak eliminovat) buňky, exprimující „cizí“
30 antigeny na svém povrchu. Výraz „stimulující imunitní odpověď“ tedy zahrnuje všechny typy
imunitních odpovědí a mechanismy jejich stimulace.

Stimulace cytotoxických buněk nebo buněk vytvářejících protilátky vyžaduje, aby byly antigeny,
které mají být prezentovány buňkám, stimulovány konkrétním způsobem buňkami prezentujícími
35 (předkládajícími) antigen, například v prezentaci MHC (hlavního histokompatibilního komplexu)
třídy I (například aktivace CD8⁺ cytotoxických T–buněk vyžaduje antigenní prezentaci MHC–I).

40 Buňky prezentující antigen jsou v oboru známe a jsou popsány v literatuře; zahrnují například
lymfocyty (jak buňky T, tak i buňky B), dendritické buňky, makrofágy a podobně. Další zahrnují
například rakovinné buňky, například buňky melanomu.

Pro prezentaci antigenu buňkou prezentující antigen cytotoxické buňce T (CTL) musí antigenní
molekula vstoupit do cytosolu buňky prezentující antigen (Germain, Cell **76**, 287–299, 1994).
Předkládaný vynález poskytuje účinné prostředky pro dodání antigenní molekuly do cytosolu.

45 Jakmile je uvolněna do buněčného cytosolu procesem fotochemické internalizace, může být anti-
genní molekula zpracována mechanismem zpracování antigenu v buňce a předložena, prezento-
vána na buněčném povrchu vhodným způsobem, například prostřednictvím MHC třídy I. Takové
zpracování může zahrnovat degradaci (rozklad) antigenu, například degradaci bílkovinného nebo
50 polypeptidového antigenu na peptidy a tyto peptidy jsou pro prezentaci poté komplexovány
s molekulami MHC. Antigenní molekulou, exprimovanou nebo předkládanou na povrchu buňky
podle tohoto vynálezu, může tedy být část nebo fragment antigenní molekuly, která je přijmata
do buňky.

Antigeny mohou být přijmuty, pohlceny do buněk předkládajících antigeny endocytózou a degradovány v endocytárních měchýřcích na peptidy. Tyto peptidy se mohou vázat na molekuly MHC třídy II v endosomech a mohou být přenášeny na buněčný povrch, kde je komplex peptid-MHC třídy II rozpoznáván pomocnými T buňkami typu CD4⁺ a indukuje imunitní odpověď. Alternativně mohou být bílkoviny v cytosolu degradovány na části, například působením proteasomů a transportovány do endoplasmatického retikula prostřednictvím TAP (transportéru spojeného s předkládáním antigenu), kde se peptidy mohou vázat na molekuly MHC třídy I a být přenášeny na buněčný povrch tak, jak je znázorněno na Obr. 1 (Yewdell and Bennink, Adv. Immunol. 52, 1-123, 1992). Pokud je peptid původem cizorodým antigenem, bude komplex peptid-MHC třídy I rozpoznáván cytotoxickými T-buňkami typu CD8⁺ (CTL). Tyto CTL se budou vázat na komplex peptid-MHC (HLA) třídy I, čímž se aktivují, začínají proliferovat a vytvářejí klon CTL. Cílové buňky a jiné cílové buňky se stejným komplexem peptid-MHC třídy I na buněčných površích mohou být tímto klonem CTL usmrceny. Imunita vůči cizímu antigenu může být vytvořena tehdy, pokud lze do cytosolu zavést dostatečné množství antigenu (Yewdell and Bennink, 1992 viz výše; Rock, Immunology Today 17, 131-137, 1996). To je základem pro vývoj kromě jiného i rakovinných vakcín. Jedním z největších praktických problémů je zavedení dostatečných množství antigenů (nebo částí antigenu) do cytosolu. To může být vyřešeno podle předkládaného vynálezu prostřednictvím PCI.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou rovněž obsahovat buňky obsahující přenášenou molekulu, která byla internalizována do cytosolu zmíněných buněk způsobem podle tohoto vynálezu, pro použití k léčbě a zvláště k léčbě rakoviny, ke genové léčbě a vakcinaci.

Ještě dalším aspektem předkládaného vynálezu je poskytnutí buněk nebo populace buněk obsahujících přenášenou molekulu, která byla internalizována do cytosolu zmíněných buněk a tyto buňky jsou získatelné způsobem podle předkládaného vynálezu. Ještě další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje použití takových buněk nebo populace buněk pro přípravu prostředku nebo léčiva k použití při léčbě, zvláště léčby rakoviny, genové léčbě nebo vakcinaci.

Tento vynález dále poskytuje způsob léčby pacienta, který zahrnuje podávání buněk nebo prostředků podle předkládaného vynálezu zmíněnému pacientovi, tj. způsob, zahrnující kroky zavedení molekuly do buněk tak, jak zde bylo popsáno výše a podávání takto připravených buněk zmíněnému pacientovi. Uvedené způsoby se s výhodou používají k léčbě rakoviny, v genové léčbě nebo pro vakcinaci.

In vivo může být použit jakýkoliv způsob podávání, který je v oboru běžný nebo standardní, například injekce, infuze, místní podání jak na vnitřní, tak i na vnější tělesné povrchy a podobně. Za podmínek *in vivo* může být tento vynález použit ve vztahu k jakékoliv tkáni obsahující buňky, do nichž jsou soustředěny fotosenzitizující činidlo a přenášená molekula, včetně tělních tekutin, stejně jako pevných tkání. Pokud je fotosenzitizer přijímán cílovými buňkami a může být patřičně dodáváno světlo, mohou být léčeny veškeré tkáně.

Prostředky podle předkládaného vynálezu tedy mohou být formovány jakýmkoliv vhodným způsobem, technikami a postupy známými v oboru farmacie, například za použití jednoho nebo více z farmaceuticky přijatelných nosičů nebo pomocných látek. Výraz „farmaceuticky přijatelný“, jak je zde používán, se týká přísad, které jsou slučitelné s dalšími přísadami prostředků, a jsou také fyziologicky přijatelné pro příjemce. Povaha prostředků a nosičů nebo pomocných látek, dávkování a podobně mohou být zvoleny rutinním způsobem podle přání a požadovaného způsobu podávání, účelu léčby a podobně. Dávkování může být obdobně stanoveno rutinním způsobem a může záviset na povaze molekul, cíli léčby, věku pacienta, způsobu podávání a podobně. Ve spojení s fotosenzitizujícím činidlem by měla být rovněž uvažována možnost/schopnost rozrušit membrány při ozáření.

Vynález bude nyní popsán podrobněji v následujících Příkladech na něž se neomezuje a ve vztahu k doprovázejícím obrázkům.

Přehled obrázků na výkresech

- 5 Obr. 1 znázorňuje světlem indukovanou transfekci buněk THX s komplexem plasmidu a poly-
lysinu, tedy komplexem pEGFP-N1/polylysin, kde jsou buňky uvedeny do styku s komplexem
pEGFP-N1/polylysin před tím, nebo poté, co jsou buňky vystaveny světlu, jak je označeno na
obrázku.
- 10 Obr. 2 znázorňuje světlem indukovanou transfekci buněk HCT-116 s komplexem pEGFP-
N1/polylysin, kde jsou buňky uvedeny do styku s komplexem pEGFP-N1/polylysin před tím,
nebo poté, co jsou buňky vystaveny světlu, jak je označeno na obrázku.
- 15 Obr. 3 znázorňuje světlem indukovanou léčbu (ovlivnění) buněk THX geloninem a tedy
snížení syntézy proteinů, přičemž buňky jsou uvedeny do styku s molekulou geloninu před nebo
po vystavení světlu, jak je označeno na obrázku.
- Obr. 4 znázorňuje ovlivnění účinnosti světlem indukované transfekce buněk THX při uvedení
buněk do styku s komplexem pEGFP-N1/polylysin bezprostředně po vystavení světlu a v dalších
časových intervalech po vystavení světlu.
- 20 Obr. 5 znázorňuje ovlivnění účinnosti světlem indukované transfekce buněk THX při uvedení
buněk do styku s komplexem pEGFP-N1/polylysin v různých časových okamžicích před a po
vystavení světlu.
- 25 Obr. 6 znázorňuje ovlivnění účinnosti světlem indukované transfekce buněk THX při uvedení
buněk do styku s komplexem pEGFP-N1/polylysin pro různá časová období po vystavení světlu.
- Obr. 7 znázorňuje schématické nákres možného modelu jakým může fungovat předkládaný
výsledek.
- 30 A. I. fotosenzitizer S je endocytován (I) a končí v intracelulárních váčcích, vesikulech (II). Tyto
váčky praskají při vystavení světlu (III).
- B. Po fotochemickém ovlivnění, jak bylo popsáno v bodě A, jsou buňky léčeny nebo ovlivňo-
vány molekulou M, která je endocytována a končí v intracelulárních váčcích. Tyto váčky se
budou spojit s fotochemicky poškozenými váčky a molekula M bude uvolňována do cytosolu.
- 35 Obr. 8 znázorňuje účinek ovlivnění buněk komplexem pEGFP-N1/polylysin při 0 °C na trans-
fekci.
- 40 Obr. 9 znázorňuje světlem indukovanou transfekci komplexu pEGFP-N1/polylysin, pokud se
3-THPP, který není převážně lokalizován v endocytárních měchýřcích, použije jako fotosenziti-
zující činidlo.
- Obr. 10 znázorňuje účinek kombinace fotosenzitizeru a světelného ovlivnění na transfekci
buněk s kationtovými lipidy.
- 45 Obr. 11 znázorňuje účinek fotochemického ovlivnění na transdukcii buněk THX adenovirem.
- Obr. 12 znázorňuje účinek fotochemického působení na nitrobuněčnou (intracelulární)
lokalizaci FITC-dextranu. Buňky THX byly po dobu 18 hodin inkubovány s AIPcS_{2a} v konc-
50 traci 20 µg/ml a následně 4 hodiny v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a}. Poté byly buňky
vystaveny světlu po dobu 4 minut (B, D) nebo ponechány ve tmě (A, C) a následně byly
3 hodiny inkubovány s FITC-dextranem o koncentraci 5 mg/ml. Na mikrosnímčích je fluores-
cence (A, B) a fázový kontrast (C, D).

Obr. 13 znázorňuje účinek fotochemického působení na toxicitu geloninu u buněk THX a HCT 116. Při strategii „osvit předem“ byly buňky nejprve 18 hodin inkubovány s AIPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml a následně 4 hodiny v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a} před vystavením světlu, jak je vyznačené na obrázku. Po ozáření byl přidán gelonin v koncentraci 1 µg/ml a buňky byly inkubovány po dobu 18 hodin. Při strategii „osvit následně“ byly buňky před vystavením světlu, jak je vyznačené na obrázku, 18 hodin spoluinkubovány s AIPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml a s geloninem v koncentraci 1 µg/ml. Kontrolní buňky byly ovlivněny pouze inkubací s geloninem v koncentraci 1 µg/ml po dobu 18 hodin a poté byly vystaveny světlu; nebo pouze 18 hodinovou inkubací s AIPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml s následnou 4 hodinovou inkubací v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a} a poté byly vystaveny světlu. Inkorporace [³H]–leucinu do proteinů byla měřena další den po ovlivnění světlem a byla vyjádřena jako poměrná, relativní syntéza proteinů. Referenční body představují průměrné hodnoty ± střední chybu průměru tří souběžných měření.

Obr. 14 znázorňuje účinek fotochemického ovlivnění na expresi β–galaktosidázy v buňkách THX, infikovaných prostřednictvím AdHCMV–lacZ. Při strategii „osvit předem“ byly buňky předem ovlivněné AIPcS_{2a} inkubovány po další 4 hodiny v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a} a poté vystaveny světlu na dobu 3 minut. Po ozáření byly buňky během 30 minut při 37 °C infikovány AdHCMV–lacZ (při MOI 1). Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly dva dny inkubovány před analyzováním exprese β–galaktosidázy. Při strategii „osvit následně“ byly buňky předem ovlivněné AIPcS_{2a} inkubovány po další 3 hodiny v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a} a během 30 minut byly infikovány AdHCMV–lac. Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly inkubovány dalších 30 minut a následně ozářeny v trvání 3 minut. O dva dny později byla analyzována exprese β–galaktosidázy.

Obr. 15 znázorňuje účinek doby inkubace na účinnost světlem indukované transfekce s pEGFP/polylysinem u buněk THX a HCT 116. Buňky předem ovlivněné AIPcS_{2a} byly promyty a inkubovány po další 4 hodiny v médiu bez přítomnosti AIPcS_{2a} a poté vystaveny světlu na dobu 3 minut (buňky THX) nebo 7 minut (buňky HCT). Po ozáření byl přidán komplex pEGFP/polylysin (plasmid v koncentraci 5 µg/ml) a buňky byly inkubovány po různé časové úseky, vyznačené na obrázku. Po odstranění komplexu bylo přidáno čerstvé médium bez obsahu komplexu a buňky byly před stanovením exprese EGFP inkubovány v tomto médiu další dva dny.

Obr. 16 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitěm předem na transfekci buněk THX, zprostředkovanou poly–L–lysinem, za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru, ve srovnání se strategií následného osvitu, při použití různých dob ozáření (osvitu). PLL–L: ozáření po přidavku komplexu pEGFP–N1/PLL. L–PLL: ozáření před přidáním komplexu pEGFP–N1/PLL. Prázdné sloupce – bez osvitu; šrafované sloupce – ozáření po dobu 70 sekund, plné sloupce – ozáření po dobu 100 sekund. PLL = polylysin.

Obr. 17 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitěm předem na transfekci buněk THX, zprostředkovanou poly–L–lysinem, za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru, ve srovnání se strategií následného osvitu, při použití různých dob ozáření (osvitu). PLL–L: ozáření po přidavku komplexu pEGFP–N1/PLL. L–PLL: ozáření před přidáním komplexu pEGFP–N1/PLL. Prázdné sloupce – bez osvitu; šrafované sloupce – ozáření po dobu 70 sekund, plné sloupce – ozáření po dobu 100 sekund.

Obr. 18 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitěm předem na transfekci buněk HCT 116, zprostředkovanou poly–L–lysinem, za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru, ve srovnání se strategií následného osvitu, při použití různých dob ozáření (osvitu). PLL–L: ozáření po přidavku komplexu pEGFP–N1/PLL. L–PLL: ozáření před přidáním komplexu pEGFP–N1/PLL. Prázdné sloupce – bez osvitu; šrafované sloupce – ozáření po dobu 70 sekund, plné sloupce – ozáření po dobu 100 sekund.

Obr. 19 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na transfekci buněk HCT 116, zprostředkovanou poly-L-lysinem, za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru, ve srovnání se strategií následovného osvitu, při použití různých dob ozáření (osvitu). PLL-L: ozáření po přidavku komplexu pEGFP-N1/PLL. L-PLL: ozáření před přidáním komplexu pEGFP-N1/PLL. Prázdné
5 sloupce – bez osvitu; vodorovně šrafované sloupce – ozáření po dobu 1,5 minuty, svisle šrafované sloupce – ozáření po dobu 2 minut, plné sloupce – ozáření po dobu 3 minut.

Obr. 20 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na transfekci zprostředkovanou DOTAP, za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru, ve srovnání se strategií následovného osvitu, při
10 použití různých dob ozáření (osvitu). DOTAP-L: ozáření po přidavku komplexu pEGFP-N1/DOTAP. L-DOTAP: ozáření před přidáním komplexu pEGFP-N1/DOTAP. Prázdné sloupce – bez osvitu; šrafované sloupce – ozáření po dobu 70 sekund, plné sloupce – ozáření po dobu 100 sekund.

Obr. 21 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na transfekci zprostředkovanou SuperFect[®], za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru, přičemž byly použity různé doby ozáření a transfekce a měnilo se i množství DNA pro transfekci. Plné čtverečky – transfekce po dobu
15 1 hodiny s 0,75 µg DNA; plné trojúhelníčky – transfekce po dobu 4 hodin s 0,75 µg DNA; prázdná kolečka – transfekce po dobu 1 hodiny s 1,55 µg DNA.

Obr. 22 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na transfekci zprostředkovanou genovou transdukcí buněk HCT 116 za použití AIPcS_{2a} jako fotosenzitizeru, přičemž virus byl
20 přidáván v různých časech. Procentní množství transdukovaných buněk, vzniklých za přidání viru v různých časových bodech, bylo analyzováno průtokovou cytometrií, jak je popsáno v Příkladech. Časové body přidání virových komplexů jsou vyznačeny na obrázku. Časové body na levé straně osy Y představují virus přidávaný před ozářením, časové body na pravé straně osy Y představují virus přidávaný po ozáření. Plné čtverečky – 1 minutové ozáření; prázdné čtverečky – bez ozáření.

Obr. 23 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na transfekci buněk HCT 116 zprostředkovanou poly-D-lysinem, za použití AIPcS_{2a} jako fotosenzitizeru, přičemž se lišily
30 doby ozáření.

Obr. 24 znázorňuje účinek strategie PCI s osvitem předem na usmrcení buněk cytostatickým
35 činidlem bleomycinem, za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru, přičemž se množství bleomycinu, doby ozáření a doby transfekce lišily. Prázdné kosočtverce: 5 TPPS⁻, 1 h = 5 µmol.l⁻¹ bleomycin, bez TPPS_{2a}, inkubace 1 hodina; plné kosočtverce: 5 TPPS⁺, 1 h = 5 µmol.l⁻¹ bleomycin, s TPPS_{2a}, inkubace 1 hodina; prázdné trojúhelníčky: 25 TPPS⁻, 1 h = 25 µmol.l⁻¹ bleomycin, bez TPPS_{2a}, inkubace 1 hodina; plné trojúhelníčky: 25 TPPS⁺, 1 h = 25 µmol.l⁻¹ bleomycin, s TPPS_{2a},
40 inkubace 1 hodina; prázdné čtverečky: 100 TPPS⁻, 1 h = 100 µmol.l⁻¹ bleomycin, bez TPPS_{2a}, inkubace 1 hodina; plné čtverečky: 100 TPPS⁺, 1 h = 100 µmol.l⁻¹ bleomycin, s TPPS_{2a}, inkubace 1 hodina; prázdná kolečka: 100 TPPS⁻, 4 h = 100 µmol.l⁻¹ bleomycin, bez TPPS_{2a}, inkubace 4 hodiny; plná kolečka: 100 TPPS⁺, 4 h = 100 µmol.l⁻¹ bleomycin, s TPPS_{2a}, inkubace 4 hodiny.

Obr. 25 znázorňuje účinek PCI s geloninem na léčbu nádorů u myšího modelu *in vivo*. Léčené
45 skupiny byly následující: prázdný trojúhelníček: pouze gelonin; plný čtvereček: placebová léčba injekcí fosfátem pufovaného solného roztoku (PBS) v kombinaci s ozářením; prázdné kosočtverce: pouze fotochemické ovlivnění (tj. AIPcS_{2a} + světlo), bez geloninu; plná kolečka: plná léčba PCI s geloninem (tj. AIPcS_{2a} + gelonin + světlo).

50

Příklady provedení vynálezu

Materiály a metody

5 Buněčné linie

Buněčná linie lidského melanomu THX byla vytvořena z nádorové tkáně, získané od pacientů léčených na metastázující maligní melanom v zařízení „Norwegian Radium Hospital“ (Aamdal se spoluautory, *Int. J. Cancer* **37**, 579, 1986) a pěstována v kultivačním médiu RPMI 1640 (Gibco-BRL), doplněném 10 % fetálním telecím sérem (FCS, Gibco-BRL) a 2 mmol.l⁻¹ glutaminem (Gibco-BRL). Buněčná linie lidského karcinomu tlustého střeva HCT 116 byla získána z americké sbírky kultur (American Type Culture Collection, ATCC č. CCL-247) a byla pěstována v kultivačním médiu RPMI 1640, doplněném 10 % fetálním telecím sérem, penicilinem v koncentraci 100 U/ml, streptomycinem v koncentraci 100 U/ml a 2 mmol.l⁻¹ glutaminem (všechny reagenty Gibco-BRL, Paisley, Velká Británie).

Ozáření

K ovlivnění buněk byly použity dva odlišné světelné zdroje, přičemž oba sestávaly se série čtyř fluorescenčních trubíc. Buňky ovlivňované (léčené) působením TPPS₄, TPPS_{2a} a 3-THPP (Porphyrin Products, Logan, UT) byly vystaveny modrému světlu (model 3026; Appl. Photophysics, London, Velká Británie) se světelnou intenzitou působící na buňky 1,5 mW/cm²; zatímco buňky ovlivňované (léčené) prostřednictvím AlPcS_{2a} (Porphyrin Products, Logan, UT) byly vystaveny červenému světlu (Philips TL 20W/09), filtrovanému průchodem přes filtr Cinemoid 35, se světelnou intenzitou působící na buňky 1,35 mW/cm².

Fluorescenční mikroskopie

Buňky byly analyzovány fluorescenční mikroskopií tak, jak popisuje K. Berg se spoluautory v *Biochem. Biophys. Acta* **1370**, 317–324, 1998. Pro analýzu fluoresceinem označených molekul byl mikroskop vybaven excitačním filtrem v rozsahu 450 až 490 nm, rozdělovačem dichroického paprsku (dichroic beam splitter) při vlnové délce 510 nm a emisním filtrem procházejícího pásu 510 až 540 nm.

35 Příprava komplexů plasmid-pLys a ovlivnění (léčba) buněk

Komplexy plasmid-pLys (poměr náboje 1,7; jak popisuje Berg se spoluautory v *Cancer Res.* **59**, 1180–83, 1999) byly připraveny jemným smícháním 5 µg plasmidu (pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) v 75 µl HBS s 5,3 µg pLys (o molekulové hmotnosti 20 700; Sigma, St. Louis, MO) v 75 µl HBS. Roztoky byly inkubovány 30 minut při teplotě místnosti, naředěny kultivačním médiem a poté přidány k buňkám.

Buňky THX byly nejprve 18 hodin inkubovány při teplotě 37 °C s AlPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml, poté byly promyty a inkubovány v médiu bez senzitivizačního činidla další 3 hodiny, po nichž následovala inkubace s komplexy plasmid-pLys v trvání 1 hodiny a pak vystavení světlu. Alternativně byly buňky po inkubaci s AlPcS_{2a} promyty a inkubovány v médiu bez senzitivizačního činidla další 4 hodiny, po nichž následovalo vystavení světlu a inkubace s komplexy plasmid-pLys v trvání 1 hodiny. Před analýzou exprese GFP, prováděnou průtokovou cytometrií, byly buňky inkubovány 2 dny při teplotě 37 °C.

Buňky HCT-116 byly 18 hodin inkubovány s AlPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml, promyty a inkubovány 4 hodiny bez přítomnosti AlPcS_{2a} před vystavením světlu. Bezprostředně před nebo po vystavení světlu byly buňky 4 hodiny ovlivňovány (léčeny) komplexem pEGFP-N1. Po 2 dnech inkubace při 37 °C byla exprese GFP studována průtokovou cytometrií.

Analýza průtokovou cytometrií

Buňky byly trypsinizovány, odstředěny, resuspendovány ve 400 μ l kultivačního média a zfiltró-
 vány přes nylonový filtr o velikosti otvorů 50 μ m. Poté byly buňky analyzovány za použití průto-
 kového cytometru FACS–Calibur (Becton Dickinson). Pro každý vzorek bylo shromážděno
 1000 výsledků. Flouresceinová fluorescence (například zelená fluorescentní bílkovina, GFP,
 green Fluorescent protein) byla měřena přes 510 až 530 nm filtr po excitaci argonovým laserem
 (200 mW), vyladěným na 488 nm, AlPcS_{2a} bylo měřeno přes podlouhlý průchozí filtr 670 nm po
 excitaci diodovým laserem (50 mW), vyladěným na 635 nm. Buněčné dublety a mrtvé buňky
 byly od jednotlivých živých buněk odlišeny na základě průstupnosti (gating). Hodnoty byly
 analyzovány za použití programu CELL Quest Software (Becton Dickinson).

Příklad 1

Světlem indukovaná transfekce jako funkce světelné dávky

Buňky THX byly 18 hodin ovlivňovány AlPcS_{2a} v koncentraci 20 μ g/ml, poté byly promyty
 a inkubovány v médiu bez senzitizeračního činidla další 3 hodiny, po nichž následovala inkubace
 s 5 μ g komplexu plasmid–pLys v trvání 1 hodiny a pak vystavení světlu na 1, 2, 3 nebo 4 minuty.
 Alternativně byly buňky po inkubaci s AlPcS_{2a} promyty a inkubovány 4 hodiny v médiu bez
 senzitizeračního činidla před ovlivněním světlem po dobu 1, 2, 3 nebo 4 minut a následnou inkuba-
 cí s komplexem pEGFP–N1/polylysinu v trvání 1 hodiny, jak je znázorněno na Obr. 1. Poměr
 náboje pEGFP–N1/polylysinového komplexu byl 1,7.

Výsledky jsou znázorněny na Obr. 1 a je zjevné, že transfekce GFP je stejně účinná, pokud se
 komplex plasmid–pLys (tj. pEGFP–N1/polylysin) přidá k buňkám raději po vystavení světlu než
 před vystavením světlu. Rovněž je zřejmé, že při obou způsobech ovlivnění závisí procento trans-
 fektovaných buněk na délce vystavení buněk světlu, přičemž maximální procentní úroveň je
 dosaženo kolem 2 minut a poté se snižuje.

Příklad 2

Expres GFP u buněk HCT–116

Buňky HCT–116 byly před vystavením světlu inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci
 20 μ g/ml a následně 4 hodiny bez přítomnosti AlPcS_{2a}. Bezprostředně před nebo po vystavení
 světlu byly buňky 4 hodiny ovlivňovány komplexem pEGFP–N1/polylysin, jak je znázorněno na
 Obr. 2. Expres GFP byla měřena průtokovou cytometrií 2 dny po vystavení světlu.

Výsledky jsou znázorněny na Obr. 2 a je zjevné, že podobně jako u transfekce buněk THX v Pří-
 kladu 1, je i transfekce GFP stejně účinná, pokud se komplex plasmid–pLys (tj. pEGFP–N1/poly-
 lysin) přidá k buňkám raději po vystavení než před vystavením světlu. Procentní množství trans-
 fektovaných buněk se opět liší v závislosti na délce vystavení buněk světlu.

Příklad 3

Syntetické účinky přidání geloninu před fotochemickým ovlivněním a po něm

Gelonin je rostlinný toxin, který, pokud je přítomný v cytosolu buněk, účinně inhibuje syntézu
 proteinů. Buňky THX byly před vystavením světlu inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci
 20 μ g/ml a následně 4 hodiny bez přítomnosti senzitizeračního činidla. Buňky byly buď ovlivňo-

vány současným působením AlPcS_{2a} a geloninu v koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$, nebo byl gelonin ($1 \mu\text{g/ml}$) bezprostředně po vystavení světlu přidán do média na dobu 18 hodin a poté byl z média odstraněn. Syntéza proteinů byla měřena 24 hodin po vystavení světlu.

- 5 Výsledky jsou znázorněny na Obr. 3 a je zřejmé, že ačkoli samotné fotochemické působení v nepřítomnosti geloninu vede k určitému snížení syntézy proteinů, přítomnost geloninu, ať už před nebo po fotochemickém působení, indukuje významně vyšší inhibici syntézy proteinů. Tyto údaje ukazují, že gelonin je internalizován do buněk, ať už je uveden do styku s buňkami před fotochemickým působením, nebo po něm.

10

Příklad 4

Účinek doby prodlevy na světlem indukovanou transfekci

15

- Buňky THX byly inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci $20 \mu\text{g/ml}$, promyty a následně inkubovány 4 hodiny bez přítomnosti senzitizeračního činidla; pak byly vystaveny světlu po dobu 3 minut. V růstovém médiu byly buňky inkubovány po doby, uvedené v Obr. 4 a následně byly ovlivněny komplexem pEGFP-N1/polylysin (poměr náboje 1,7) v trvání 1 hodiny. Expres GFP byla analyzována průtokovou cytometrií 48 hodin po vystavení světlu.

20

Výsledky jsou znázorněny na Obr. 4 a je zřejmé, že pro dosažení nejlepšího výsledku by molekuly, které mají být internalizovány, měly být vystaveny buňkám brzo po fotochemickém působení, neboť transfekce účinkem pEGFP-N1 klesá s poločasem přibližně 5 hodin po vystavení světlu.

25

Příklad 5

Účinnost transfekce jako funkce transfekčního impulzu, vztahujícího se k ozáření

30

- Buňky THX byly inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci $20 \mu\text{g/ml}$, promyty a následně inkubovány 4 hodiny bez přítomnosti senzitizeračního činidla. Buňky obdržely impuls (v trvání 0,5 hodiny nebo 1 hodina, přičemž šířka sloupce na Obr. 5 odráží počátek a konec působení) ovlivnění prostřednictvím komplexu pEGFP-N1/polylysin buď před třiminutovým vystavením světlu (záporné hodnoty na ose x) nebo po něm (kladné hodnoty na ose x). Expres GFP byla analyzována průtokovou cytometrií 48 hodin po vystavení světlu. Údaje z několika pokusů byly normalizovány tak, že účinnost transfekce provedené právě před vystavením světlu nebo právě po něm byla považována za 100 %.

35

- 40 Výsledky jsou znázorněny na Obr. 5 a je zřejmé, že pro nejlepší účinnost transfekce by buňky měly být vystaveny molekulám, které mají být internalizovány, buď krátce před vystavením světlu, nebo krátce po něm.

45 Příklad 6

Světlem indukovaná transfekce – závislost na době inkubace s komplexem pEGFP-N1/polylysin

- 50 Buňky THX byly inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci $20 \mu\text{g/ml}$, promyty a následně před vystavením světlu inkubovány 4 hodiny bez přítomnosti senzitizeračního činidla. Pak byly inkubovány s komplexem pEGFP-N1/polylysin (poměr náboje 1,7) v trvání až do 6 hodin, jak je znázorněno na Obr. 6A. Expres GFP byla analyzována průtokovou cytometrií 48 hodin po vystavení světlu. Počet buněk exprimujících GFP po takovém ovlivnění je znázorněn na Obr. 6B a specifická různá ovlivnění je znázorněna na Obr. 6C.

55

Výsledky jsou znázorněny na Obr. 6 a je zřejmé, že ačkoli se počet transfektovaných buněk zvyšuje s rostoucí dobou inkubace s komplexem pEGFP-N1/polylysin (Obr. 6B), nejvyšší specifčnost transfekce se uplatňuje po nejkratších dobách inkubace (Obr. 6C).

5

Příklad 7

Ovlivnění komplexem pEGFP-N1/polylysin při 0 °C

- 10 Tento pokus byl navržen k testování toho, zda fotochemické ovlivnění může vést k menšímu poškození buněčných membrán, což by znamenalo, že plasmid přivedený do styku s buňkami po ovlivnění světlem by mohl proniknout plasmatickou membránou.

- 15 Buňky THX byly inkubovány 18 hodin s AlPcS_{2a} v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, promyty a následně inkubovány 4 hodiny bez přítomnosti senzitizera před vystavením světlu. Následně byly okamžitě inkubovány s komplexem pEGFP-N1/polylysin (poměr náboje 1,7) 45 minut při teplotě 0 °C. Pak byly buňky buď: A) trypsinizovány a zaočkovány aniž by byly převedeny na 37 °C; nebo B) převedeny na teplotu 37 °C bez trypsinizace. Buňky byly vystaveny světlu tak, jak je uvedeno na Obr. 8. Expres GFP byla analyzována průtokovou cytometrií 48 hodin po
- 20 vystavení buněk světlu.

- Po 45 minutové inkubaci buněk při 0 °C s komplexem pEGFP-N1/polylysin bude komplex přilepen na jejich buněčný povrch, ale nebude endocytován. Při popisovaném pokusu byly buňky THX následně buď inkubovány při 37 °C v médiu bez přítomnosti plasmidu (Obr. 8B) nebo trypsinizovány (Obr. 8A) k odstranění plasmidu z povrchu a byly zaočkovány do nových misek při teplotě 37 °C. Výsledky ukazují, že komplex plasmid/polylysin po fotochemickém působení
- 25 neproniká plasmatickou membránou.

30 Příklad 8

Kombinace 3-THPP a světla s ovlivněním komplexem pEGFP-N1/polylysin

- 35 Buňky THX byly ovlivňovány 18 hodin působením 3-THPP v koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$, následně byly promyty a inkubovány před vystavením světlu 4 hodiny v médiu bez přítomnosti senzitizera. Bezprostředně poté byly inkubovány 1 hodinu s komplexem pEGFP-N1/polylysin (poměr náboje 1,7). Buňky byly vystaveny světlu tak, jak je uvedeno v Obr. 9 a expres GFP byla analyzována průtokovou cytometrií 48 hodin po vystavení buněk světlu.

- 40 3-THPP je fotosenzitizujícím činidlem, jehož hlavní lokalizace není v endosomech nebo v lysosomech. Výsledky znázornění na Obr. 9 ukazují, že ovlivnění buněk prostřednictvím 3-THPP před ozáření indukuje pouze menší zvýšení exprese GFP ve srovnání s výsledky, uvedenými v předchozích Příkladech, v nichž byl jako fotosenzitizující činidlo použit AlPcS_{2a} (disulfonovaný hlinitý ftalocyanin). To ukazuje, že výhodné může být takové fotosenzitizující činidlo,
- 45 které je lokalizováno v endosomech a lysosomech.

Příklad 9

- 50 Kombinace fotosenzitizeru a předběžného ovlivnění světlem umožňuje transfekci buněk za použití kationtových lipidů

- Buňky HCT 116 byly zaočkovány v hustotě 75 000 buněk na jamku do 12 jamkových destiček jeden den před prováděním pokusu. Buňky byly 18 hodin inkubovány s fotosenzitizerem AlPcS_{2a} (20 $\mu\text{g/ml}$), pak následovala prodleva v trvání 7 hodin v médiu bez přítomnosti fotosenzitizera-
- 55

ho činidla a poté byly buňky vystaveny na 7 minut červenému světlu. Pak byly tyto buňky inkubovány s komplexem kationtového lipidu DOTAP (DOTAP byl získán od firmy Boehringer) s plasmidem pEGFP-N1 (5:1 DOTAP/plasmid, 1 µg/ml pEGFP-N1) po dobu 3 hodin, promyty růstovým médiem a inkubovány 21 hodin při 37 °C před tím, než byla exprese EGFP měřena průtokovou cytometrií tak, jak je popsáno v Materiálech a metodách. Kontrolní buňky nebyly vystaveny světlu, ale jinak bylo jejich ovlivnění shodné.

Výsledky jsou znázorněné na Obr. 10 a je zřejmé, že působení PCI zvyšuje účinnost transfekce s komplexem DOTAP/plasmid přibližně čtyřnásobně.

Příklad 10

Účinek PCI na transdukci buněk THX adenovirem

Materiál

Di-β-D-galaktopyranosid fluoresceinu (FDG) byl získán od firmy Molecular Probes (F-1179). Zásobní roztok v koncentraci 20 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním prášku v poměru 1:1 ve směsi DMSO (dimethylsulfoxid)/ethanol. Směs byla postupně přidávána do příslušného objemu ledově studené vody k vytvoření soustavy voda/DMSO/ethanol v poměru 8:1:1.

Rekombinantní virus AdCA17lacZ byl vytvořen a propagován v lidské buněčné linii 293, tedy linii Ad E1-transformovaných embryonálních ledvinných buněk, uchovávané v minimálním esenciálním médiu MEM F-11, doplněném 10% fetálním telecím sérem, penicilinem (100 U/ml, Gibco-BRL), streptomycinem (0,1 mg/ml, Gibco-BRL) a glutaminem (2 mmol.l⁻¹).

Konstrukce rekombinantního viru

Rekombinantní adenovirus AdCA17lacZ, kódující *lacZ* gen *E. coli* pod kontrolou lidského promotoru CMV, byl získán homologní rekombinací za použití systému pJM17 v 293 buňkách (Addison se spoluautory, J. Gen. Virol. 78, 1653–1661, 1997). Rekombinantní vektory byly plakově čištěny, pěstovány do vysokého titru v 293 buňkách a čištěny gradientem chloridu cesného, jak bylo popsáno dříve (Hitt se spoluautory, Methods in Mol. Genetics 7, 15–30, 1995).

Senzitizace buněk

Buňky THX (4 x 10⁵ buněk) byly zaočkovány na misky o průměru 6 cm a ponechány růst přes noc. Při přibližně 60% konfluenci (souběžném růstu) bylo růstové médium nahrazeno 2 ml růstového média, doplněného AlPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml a misky byly umístěny na 16 až 18 hodin zpátky do inkubátoru. Médium obsahující senzitivizační činidlo pak bylo odsáto a buňky byly inkubovány alespoň 4 hodiny v běžném růstovém médiu před ovlivněním světlem a infekcí virem.

Infikace buněk

K uvolnění buněk ze tří misek byla použita soustava trypsin-EDTA a průměrný počet buněk v miskách byl vypočítán za použití Bürcherovy komůrky. Naředění adenoviru bylo připraveno v PBS s CaCl₂ (0,68 mmol.l⁻¹) a MgCl₂ (0,5 mmol.l⁻¹) podle počtu buněk, které měly být infikovány. Buňky byly obvykle infikovány při m.o.i. (multiplicity of infection, násobnosti infekce) 1 a 10.

Před přidáním viru byly buňky vystaveny červenému světlu (Philips TL 20W/09, filtrovanému přes filtr Cinemoid 35, se světelnou intenzitou působící na buňky 1,35 mW/cm²) po dobu 3 minut. Následně bylo médium odsáto a do každé misky bylo přidáno 200 µl virové suspenze

(nebo PBS s $0,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 a $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ MgCl_2 v případě kontrol neovlivňovaných virem). Po inkubaci probíhající 30 minut při 37°C bylo přidáno 5 ml obvyklého růstového média a buňky byly ponechány růst 48 hodin.

5 Stanovení β -galaktosidázy

Buňky byly uvolněny působením trypsinu/EDTA a resuspendovány v 5 ml růstového média. Po odstředění (5 minut, 1000 otáček za minutu) bylo médium odsáto, buněčný pelet byl resuspendován v 50 μl růstového média a zkumavky byly na 5 minut umístěny do vodní lázně o teplotě 37°C .

Následně bylo do zkumavek přidáno 50 μl 2 mmol.l^{-1} roztoku FDG, předem zahřátého na teplotu 37°C a zkumavky byly vráceny na 1 minutu do vodní lázně. Nakonec bylo přidáno 900 μl růstového média a zkumavky byly inkubovány 30 až 60 minut v ledu před analýzou vzorků průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše.

Buňky THX byly ovlivněny AlPcS_{2a} (označeném na Obr. 11 jako PS) a adenovirem (označován na Obr. 11 jako „virus“) a na 3 až 4 minuty byly vystaveny světlu tak, jak bylo popsáno v oddělení Materiál a metody. Aktivita β -galaktosidázy (β -gal) byla měřena průtokovou cytometrií. Celková aktivita β -gal byla kvantifikována sloučením (integrací) buněk, které jsou vzhledem k β -gal pozitivní a jejich β -galaktosidázové aktivity. Jak počet buněk, které jsou vzhledem k β -gal pozitivní, tak i průměrná β -galaktosidázová aktivita byly účinkem PCI zvýšeny.

Výsledky ukazují, že k minimální infekci buněk THX dochází při inkubaci buněk se samotným virem nebo s virem a s fotosenzitizujícím činidlem, a že fotochemické ovlivnění, tj. přidavek světla k fotosenzitizujícímu činidlu, významně zesiluje transdukcii buněk (jak je prokázáno zvýšením β -galaktosidázové aktivity).

30 Příklad 11

Účinek fotochemického ovlivnění na intracelulární (nitrobuněčnou) lokalizaci molekuly označující endocytózu

Buňky THX byly zaočkovány na misky Falcon 3001 ($2,5 \times 10^4$ buněk na misku) a další den byly 18 hodin ovlivňovány působením AlPcS_{2a} v koncentraci $20 \mu\text{g/ml}$, promyty k odstranění AlPcS_{2a} a inkubovány v médiu bez obsahu AlPcS_{2a} po dobu 4 hodin. Poté byly buňky na 4 minuty vystaveny světlu a následně inkubovány 3 hodiny s endocytárním markerem FITC-dextranem v koncentraci 5 mg/ml . Neozářené buňky byly ovlivňovány obdobně, s výjimkou ozáření. Intracelulární lokalizace FITC-dextranu v uvolněných buňkách byla pozorována fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan (Oberkochen, Německo) za použití objektivu pro 63-násobné zvětšení, excitačního filtru pro oblast 540 až 490 nm a emisního filtru pro oblast 510 až 540 nm. Fluorescenční mikrosnímky byly zaznamenávány pomocí chlazené CCD (charge-coupled device) kamery (Photometric Inc., Tuscon, AZ).

Výsledky znázorněné na Obr. 12 ukazují, že PCI s vynaložením světla před inkubací s fluorescenčním endocytárním markerem FITC-dextranem posunuje lokalizaci tohoto markeru (označující sloučeniny) z endocytárních měchýřků (body viditelné v části 12A pro neozářené buňky) do cytosolu (difusní fluorescence, viditelná v části 12 B u ozářených buněk). Pokud je tedy ovlivnění světlem provedeno před přidavkem makromolekuly, která má být internalizována, je taková makromolekula velmi rychle převedena do cytosolu, což podstatně snižuje možnosti lysosomálního odbourání (degradace) takové molekuly.

Příklad 12

Účinky fotochemického ovlivnění na geloninovou toxicitu v buňkách THX a HCT-116

5 Gelonin je rostlinný toxin, který účinně inhibuje syntézu proteinů, pokud je přítomný v cytosolu buněk, ale který není schopen se do cytosolu sám o sobě dostat a proto je celkem netoxický pro nenarušené, intaktní buňky. Pro ovlivnění geloninem bylo 25×10^3 buněk na jamku zaočkováno na destičky o 24 jamkách (Nunc, Dánsko). Další den byl přidán AlPcS_{2a} a buňky byly 18 hodin inkubovány při 37°C . Veškeré postupy po přidání AlPcS_{2a} byly prováděny při utlumeném světle.

10 Při strategii „osvit předem“ byly buňky promyty k odstranění AlPcS_{2a} a inkubovány v médiu bez obsahu AlPcS_{2a} po dobu 4 hodin. Poté byly buňky vystaveny světlu (jak je označeno na obrázcích) a následně byly 18 hodin ovlivňovány geloninem v koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$. U strategie „osvit následně“ byly buňky 18 hodin inkubovány společně s AlPcS_{2a} v koncentraci $20 \mu\text{g/ml}$ i s geloninem v koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$ a poté byly promyty a vystaveny světlu tak, jak je označeno na obrázku.

15

Neozářené buňky byly ovlivňovány obdobným způsobem s výjimkou ozáření. Ovlivňované buňky byly jednou promyty kultivačním médiem a po přidání čerstvého média byly inkubovány při teplotě 37°C až do další analýzy. Inhibice syntézy proteinů byla stanovována inkorporací $[^3\text{H}]$ -leucinu do proteinu 24 hodin po vystavení světlu. Ozáření bylo provedeno ze světelné lavice se čtyřmi světelnými trubicemi (Philips TL 20W/09) a podlouhlým průchozím filtrem pro oblast 550 až 600 nm. Světelná intenzita působící na buňky byla $13,5 \text{ W/m}^2$.

20

Tento příklad ukazuje, že jak u buněk THX (Obr. 13A), tak i u buněk HCT-118 (Obr. 13B) funguje strategie „osvit předem“ lépe než postup „osvit následně“. U buněk THX při nejvyšší dávce světla byla tedy inhibice syntézy proteinů u postupu „osvit předem“ přibližně trojnásobná ve srovnání s postupem „osvit následně“. Rovněž je zřejmé, že u obou buněčných linií nemá gelonin sám o sobě, bez PCI -ovlivnění, žádný toxický účinek, což prokazuje účinnost a specifčnost při indukci účinků toxinu, kterých lze dosáhnout fotochemickým ovlivněním.

25

30

Příklad 13

Fotochemická stimulace adenovirem zprostředkované transdukce genu

35

Buňky THX byly v množství 5×10^4 na jamku zaočkovány na destičky o 6 jamkách. Další den byl přidán AlPcS_{2a} a buňky byly 18 hodin inkubovány při 37°C . Veškeré postupy po přidání AlPcS_{2a} byly prováděny při utlumeném světle. Při strategii „osvit předem“ byly buňky promyty k odstranění AlPcS_{2a} a inkubovány v médiu bez obsahu AlPcS_{2a} po dobu 4 hodin. Poté byly buňky po dobu 3 minut vystaveny světlu a následně byly ovlivňovány adenovirovým vektorem AdHCMV-lacZ (označovaným také v Příkladu 10 jako AdCA17lacZ) při násobnosti infekce (MOI) 1 po dobu 30 minut. Tento vektor obsahuje reportérový gen β -galaktosidázy, jehož expresi lze analyzovat průtokovou cytometrií (viz níže).

40

45 U strategie „osvit následně“ byly buňky ovlivněné AlPcS_{2a} a promyté nejprve ovlivňovány adenovirem ve stejné koncentraci a po stejnou dobu, jak bylo popsáno výše, následně byly promyty a po přidavku čerstvého kultivačního média byla vystaveny světlu. Neozářované buňky byly ovlivňovány stejným způsobem, s výjimkou ozáření.

50 Ovlivňované buňky byly jednou promyty kultivačním médiem a po přidavku čerstvého média byly inkubovány při 37°C až do další analýzy. Expres β -galaktosidázy byla analyzována průtokovou cytometrií dva dny po vystavení světlu. Podrobné postupy pro konstrukci viru (který je označován jako AdHCMV-lacZ, nebo jako AdCA17lacZ), pro ovlivnění buněk, ozáření a analýzu exprese β -galaktosidázy jsou popsány v Příkladu 10.

Výsledky (Obr. 14) ukazují, že fotochemické ovlivnění, využívající postup „osvit předem“ (znázorněné sloupce na pravé straně Obr. 14), zvyšuje procento buněk exprimujících β -galaktosidázu přibližně šestinásobně; od 2,5 % do 15 % za těchto pokusných podmínek. Rovněž je zřejmé, že účinek postupu „osvit předem“ byl téměř shodný s účinkem, získanému za použití postupu „osvit následně“ (viz sloupce na levé straně Obr. 14).

Příklad 14

Účinek doby inkubace na účinnost světlem indukované transdukce

Buňky THX v množství 5×10^4 na jamku a buňky HCT-116 v množství $7,5 \times 10^4$ na jamku byly zaočkovány na destičky o 6, respektive 12 jamkách. Druhý den byl přidán AlPcS_{2a} v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a buňky byly 18 hodin inkubovány při 37 °C. Veškeré postupy po přidání AlPcS_{2a} byly prováděny při utlumeném světle. Buňky promyty k odstranění AlPcS_{2a} a inkubovány v médiu bez obsahu AlPcS_{2a} po dobu 4 hodin. Poté byly buňky vystaveny světlu (buňky THX po dobu 3 minut, buňky HCT-116 po dobu 7 minut) a následně byly ovlivňovány komplexem pEGFP-N1/polylysin (5 $\mu\text{g/ml}$ pEGFP-N1) po doby, označené na Obr. 15. Neozářené buňky byly ovlivňovány stejným způsobem, s výjimkou ozáření. Ovlivňované buňky byly jednou promyty kultivačním médiem a po přidání čerstvého média byly inkubovány při teplotě 37 °C 2 dny do analýzy exprese EGFP průtokovou cytometrií (viz Materiály a metody).

Ozáření bylo provedeno ze světelné lavice se čtyřmi světelnými trubicemi (Philips TL 20W/09) a podlouhlým průchozím filtrem pro oblast 550 až 600 nm. Světelná intenzita působící na buňky byla 13,5 W/m^2 .

Komplex pEGFP-N1/polylysin (poměr náboje 1,7) byl připraven mírným smísením roztoků plasmidu a polylysinu, připravených odděleně: 5 μg plasmidu pEGFP-N1 bylo naředěno 75 μl vody a 5,3 μg polylysinu bylo rovněž naředěno 75 μl vody. Oba roztoky byly smíchány a inkubovány 30 minut při teplotě místnosti, naředěny kultivačním médiem na 1 ml a přidány k buňkám.

Výsledky (Obr. 15) ukazují, že transfekce jak buněk THX, tak i buněk HCT-116 komplexy DNA/polylysin může být silně indukována fotochemickým ovlivněním typu „osvit předem“. Je zřejmé, že stimulace transfekce je účinná již po krátkých dobách inkubace s DNA, alespoň do 30 minut inkubační doby. Světlem indukovaná transfekce roste s dobou inkubace, ovšem po přibližně 2 hodinách inkubace s DNA se zdánlivě ustálí.

Příklad 15

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci buněk THX, zprostředkovanou poly-L-lysinem za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru

Disulfonát tetrafenylporfinu (TPPS_{2a}), č. šarže 04197, byl vyroben firmou Porphyrin Products (UT, USA). TPPS_{2a} byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Plasmid pEGFP-N1 byl získán z Clontech Laboratories Inc. (CA, USA, katalogové číslo 6085-1). Použitá šarže (č. EGFP-N1-1002) byla vyrobena firmou ELIM Biopharmaceuticals, Inc. (CA, USA) a dodávána v koncentraci 5 mg/ml sterilní vody. Zásobní roztok 0,5 mg/ml byl připraven ve sterilním TE-pufu o pH 7,4 (1 mmol.l^{-1} Tris-HCl, 1 mmol.l^{-1} EDTA) a uchováván při -20 °C.

Buňky THX lidského melanomu byly kultivovány v médiu RPMI, doplněném 10 % fetálním telecím sérem, penicilinem/streptomycinem a L-glutaminem. Při ztlumeném světle bylo médium

odstraněno nahrazeno médiem obsahujícím TPPS_{2a} v koncentraci 2 µg/ml. Buňky (chráněné před světlem) byly inkubovány 18 hodin při 37 °C. Poté byly trojnásobně promyty médiem a do vzorků PLL-L („osvit následovně“) byl přidán 1 ml média, obsahujícího komplex pEGFP-N1/-poly-L-lysín. Komplex obsahoval 5 µg pEGFP-N1 a měl poměr náboje poly-L-lysinu (PLL) a DNA 1,7. Po 4 hodinách další inkubace při 37 °C a ve tmě bylo médium odstraněno a buňky byly jednou promyty médiem. Následně byl přidán 1 ml média a buňky byly vystaveny modrému světlu, jak je znázorněno na Obr. 16 a popsáno v odstavci Materiál a metody.

Vzorky L-PPL („osvit následovně“) byly nejprve 4 hodiny inkubovány v médiu bez komplexu pEGFP-N1/PLL, komplex byl přidán bezprostředně po ozáření a odstraněn po dalších 4 hodinách inkubace. Buňky byly inkubovány 48 hodin (stále chráněny před světlem) a poté byly analyzovány vzhledem k expresi EGFP průtokovou cytometrií. Pro tuto analýzu byly buňky trypsinizovány (Trypsin-EDTA, Sigma, MO, USA), resuspendovány v 0,4 ml média RPMI a zfiltrány přes nylonový filtr o velikosti otvorů 50 µm. Poté byly buňky analyzovány za použití průtokového cytometru FACSalibur (Becton Dickinson, CA, USA). Měření EGFP se provádělo přes filtr 510 až 540 nm po excitaci při 488 nm. Pro každý vzorek bylo shromážděno 1000 výsledků. K odlišení mrtvých a živých buněk byl použit propidiumiodid (1 µg/ml) a k odlišení buněčných dubletů od jednotlivých buněk bylo použito pulsního zpracování. Hodnoty byly analyzovány za použití programu CELLQuest Software (Becton Dickinson, CA, USA).

Výsledky

Jak je zřejmé z Obr. 16, za použití fotosenzitizéru TPPS, u poly-L-lysinem zprostředkované transfekce buněk THX funguje přidání přenášené molekuly postupem „osvit předem“ stejně, jako postupem „osvit následně“.

Příklad 16

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci buněk THX, zprostředkovanou poly-L-lysinem za použití TPPS₄ jako fotosenzitizéru

Buňky THX byly pěstovány a ovlivňovány tak, jak je popsáno v Příkladu 15, jen s tím rozdílem, že místo TPPS_{2a} byl použit fotosenzitizer TPPS₄ (75 µg/ml).

Výsledky

Z Obr. 17 je zřejmé, že za použití fotosenzitizéru TPPS₄ u poly-L-lysinem zprostředkované transfekce buněk THX funguje postup „osvit předem“ poněkud lépe než postup „osvit následně“, ale oběma postupy je stále dosaženo transfekce.

Příklad 17

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci buněk HCT-116, zprostředkovanou poly-L-lysinem za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizéru

Buňky HCT-116 byly pěstovány a ovlivňovány stejně, jak bylo popsáno v Příkladu 15.

Výsledky

Z Obr. 18 je zřejmé, že za použití fotosenzitizéru TPPS_{2a} u poly-L-lysinem zprostředkované transfekce buněk HCT-116 funguje postup „osvit předem“ stejně jako postup „osvit následně“.

Příklad 18

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci buněk HCT-116, zprostředkovanou poly-L-lysinem za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru

Buňky HCT-116 byly pěstovány a ovlivňovány stejně, jak bylo popsáno v Příkladu 15, jen s tím rozdílem, že místo TPPS_{2a} byl použit fotosenzitizer TPPS₄ (75 µg/ml).

Výsledky

Z Obr. 19 je zřejmé, že za použití fotosenzitizeru TPPS₄ u poly-L-lysinem zprostředkované transfekce buněk HCT-116 funguje postup „osvit předem“ stejně jako postup „osvit následně“.

Příklad 19

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci, zprostředkovanou DOTAP, za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru

Buňky HCT-116 byly pěstovány v médiu RPMI-1640, doplněném 10 % fetálním telecím sérem, penicilinem/streptomycinem a L-glutaminem. Při ztlumeném světle bylo médium odstraněno a nahrazeno médiem obsahujícím TPPS₄ v koncentraci 75 µg/ml. Buňky (chráněné před světlem) byly inkubovány 18 hodin při 37 °C. Poté byly trojnásobně promyty médiem a ke vzorkům DOTAP-L („osvit následně“) byl přidán 1 ml média obsahujícího komplex 1 µg pEGFP-N1 a 5 µg DOTAP. Po 4 hodinách další inkubace ve tmě a při 37 °C bylo médium odstraněno a buňky byly vystaveny modrému světlu tak, jak je uvedeno na Obr. 20 a popsáno v odstavci Materiál a metody.

U vzorků L-DOTAP („osvit předem“) byly vzorky nejprve 4 hodiny inkubovány v médiu bez přítomnosti komplexu pEGFP-N1/DOTAP, který byl přidán bezprostředně po ozáření a odstraněn po dalších 4 hodinách inkubace. Buňky pak byly inkubovány 1 den (stále chráněné před světlem) před analýzou exprese EGFP průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno v Příkladu 15.

Výsledky

Z Obr. 20 je zřejmé, že pro transfekci buněk HCT-116, zprostředkovanou kationtovým lipidem DOTAP, slouží za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru postup „osvit předem“ podstatně lépe než postup „osvit následně“. Postup „osvit předem“ se zdá být zvláště výhodný pro transfekci zprostředkovanou kationtovými lipidy.

Příklad 20

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci zprostředkovanou látkou SuperFect[®], za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru

SuperFect[®] byl získán od firmy QIAGEN AG.

Příprava komplexů plasmid/SuperFect[®]

Komplexy plasmid/SuperFect[®] byly připraveny následovně: (i) pEGFP-N1 byl naředěn médiem RPMI 1640 (bez obsahu séra, proteinů a antibiotik). (ii) SuperFect[®] (2 µl na µg DNA) byl přidán k roztoku plasmidu a celý obsah byl vířivě míchán 10 sekund (iii). Roztok byl inkubován 10 až 20 minut při teplotě místnosti k umožnění tvorby komplexu. (iv) 400 µl růstového buněčného

média (se sérem a antibiotiky) bylo přidáno do zkumavek, obsahujících transfekční komplexy, obsahy zkumavek byly promíchány dvojnásobným pipetováním tam a zpět a celkový objem byl okamžitě převeden k buňkám.

5 Ovlivnění buněk

Buňky HCT-116 (75 000 buněk na jamku; 1 ml na jamku) byly zaočkovány na destičky o 12 jamkách (Costar Corning, NY, USA) a ponechány přichytit se po dobu 6 hodin. Poté byl přidán 1 ml média s TPPS_{2a} (0,7 µg/ml) a buňky byly inkubovány 18 hodin (5% CO₂ obj./obj., 37 °C). Poté byly trojnásobně promyty médiem a inkubovány další 4 hodiny (5% CO₂ obj./obj., 37 °C) v médiu s obsahem séra. Buňky byly ozářeny vystavením lavici o čtyřech fluorescenčních trubiciích (Osram 18W/67) s nejvyšším působením v oblasti přibližně 420 nm. Komplexy plasmid/-SuperFect[®] byly přidány bezprostředně po vystavení buněk světlu a buňky nimi byly inkubovány 1 hodinu nebo 4 hodiny. Následně byly čtyřnásobně promyty v médiu RPMI 1640 a po přidání 1 ml média byly dále inkubovány po dobu 2 dní. Poté byla exprese EGFP analyzována průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno v Příkladu 15.

Výsledky

Je zřejmé (z Obr. 21), že PCI podstatně zlepšuje transfekci zprostředkovanou látkou SuperFect[®] za všech testovaných podmínek. Například pro 0,75 µg DNA a 1 hodinu transfekce bylo pozorováno devítinásobného zlepšení, zatímco pro 0,75 µg DNA a 4 hodiny transfekce bylo pozorováno desetinásobné zlepšení.

25

Příklad 21

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na adenovirem zprostředkovanou genovou transdukcii buněk HCT-116, za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru

30

Buňky HCT-116 byly kultivovány v médiu RPMI 1640, doplněném 10% fetálním telecím sérem, penicilinem/streptomycinem a L-glutaminem. Za ztlumeného světla bylo médium odstraněno a do každé jamky bylo přidáno médium s obsahem 1 µg/ml TPPS_{2a}. Buňky (chráněné před světlem) byly inkubovány 18 hodin při 37 °C. Poté byly trojnásobně promyty médiem a následně byly infikovány Ad-HCMV-lacZ adenovirem v různých časových okamžicích před ozářením, nebo po něm (které bylo vždy provedeno 4 hodiny po odstranění fotosenzitizeru). Buňky pak byly inkubovány další 2 dny (stále chráněné před světlem) až do analýzy β-galaktosidázové aktivity průtokovou cytometrií, jak je popsáno v Příkladu 10 (a v Materiálech a metodách).

35

40 Výsledky

Obr. 22 znázorňuje účinek načasování světelného ovlivnění vzhledem k dodání viru na účinek PCI při adenovirem zprostředkované genové transdukcii. Je zřejmé, že při postupu „osvit předem“ (pravá strana osy Y) je PCI ozáření účinné alespoň 13 hodin, takže virus může být podáván až do 13 hodin po ozáření za stálého udržení kladných účinků PCI na transdukcii. Tato skutečnost je velmi důležitá z klinického hlediska, neboť to klinickému lékaři poskytuje větší pružnost při plánování léčby a koordinaci s další léčbou, kterou může pacient podstupovat, například s chirurgickými zákroky.

45

50

Příklad 22

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na transfekci buněk HCT-116 zprostředkovanou poly-D-lysinem, za použití TPPS_{2a} jako fotosenzitizeru

55

Buňky HCT-116 byly pěstovány, ovlivňovány a analyzovány tak, jak je popsáno v Příkladu 15 s tou výhradou, že místo poly-L-lysinu byl pro přípravu komplexu s pEGFP-N1 použit poly-D-lysin.

5 Výsledky

Z Obr. 23 je zřejmé, že PCI s postupem „osvit předem“ funguje stejně dobře i za použití polykationtu poly-D-lysinu jako transfekčního činidla.

10

Příklad 23

Účinek strategie PCI „osvit předem“ na zabíjení buněk cytostatickým činidlem bleomycinem, za použití TPPS₄ jako fotosenzitizeru

15

Disulfonát tetrafenylporfinu (TPPS_{2a}), šarže č. 04197, byl vyroben firmou Porfyrin Products (UT, USA). TPPS_{2a} byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu.

20

V této studii byla použita buněčná linie plicních fibroblastů V79 čínského křečka.

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid) byl získán od firmy Sigma (MO, USA, katalogové číslo M 2128), rozpuštěn v PBS (fosfátem pufrovaném solném roztoku) v koncentraci 5 mg/ml, sterilně zfiltrován a uchováván při teplotě 4 °C.

25

Bleomycin (ASTA Medica) 15 000 IE/KY byl získán z lékárny nemocnice „Norwegium Radium Hospital“. 1 IE odpovídá 1 mg bleomycinu. Bleomycinový prášek byl rozpuštěn ve sterilním 0,9% roztoku NaCl v konečné koncentraci 2 mmol.l⁻¹.

Kultivace buněk

30

Buňky V-79 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Gibco), doplněném 10% fetálním telecím sérem, penicilinem m(100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml) a 2 mmol.l⁻¹ glutaminem (všechny reagenty od firmy Gibco BRL, Paisley, Skotsko), při 37 °C a ve vlhkém prostředí s 5% CO₂.

35 Ovlivnění buněk

Buňky (75 000 buněk na jamku; 1 ml na jamku) byly zaočkovány na destičky o 12 jamkách (Costar Corning, NY, USA) a ponechány přichytit se po dobu 6 hodin. Do některých jamek byl přidán 1 ml média s TPPS_{2a} (0,7 µg/ml) (viz Tabulka 1) a buňky byly inkubovány 18 hodin (5% CO₂ obj./obj., 37 °C). Poté byly trojnásobně promyty médiem a inkubovány další 4 hodiny v médiu s obsahem séra. Následně bylo médium odstraněno, přidáno bylo nové médium a buňky byly ozářeny vystavením světlu z kazety, obsahující lavici o čtyřech fluorescenčních trubiciích (Osram 18W/67) s nejvyšším působením v oblasti přibližně 420 nm.

40

Hned poté byly přidány různé dávky bleomycinu. Po 1 hodině nebo po 4 hodinách inkubace s bleomycinem byly buňky jednou promyty médiem RPMI, přidán byl 1 ml média a po 3 dnech inkubace bylo měřeno přežití buněk prostřednictvím stanovení MTT. Tato metoda je založena na redukci vodou rozpustné tetrazoliové sole (MTT) na purpurový, nerozpustný formazanový produkt mitochondriálními dehydrogenázami, přítomnými v živých, metabolicky aktivních buňkách.

50

K buňkám se přidá 1 ml média s obsahem 0,25 µg MTT a následuje inkubace (5% CO₂ obj./obj., 37°C) po dobu 4 hodin. Výsledné formazanové krystaly jsou rozpuštěny přidavkem 200 µl isopropanolu (Sigma, MO, USA) na jamku. Roztok se převede do mikrotitračních destiček o 96 jamkách, které jsou odečítány na odečítači mikrodestiček Multiskan EX (Labsystems, Finsko)

s filtrem pro průchozí pás o vlnové délce 570 nm. Přežití buněk se počítá jako procentní množství vzhledem ke kontrolním buňkám, které nebyly ovlivněny světlem.

Výsledky

Obr. 24 ukazuje, že PCI s postupem „osvit předem“ může také zvýšit biologický účinek klinicky schváleného chemoterapeutika o nízké molekulové hmotnosti, bleomycinu. Je tedy zřejmé, že pro dávku $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ bleomycinu lze pozorovat podstatné, světlem indukované zvýšení cytotoxicity bleomycinu (plné čtverečky a plná kolečka na Obr. 24). Nepřítomnost účinku u nejnižší dávky bleomycinu (plné kosočtverečky na Obr. 24) ukazuje, že tato zvýšená cytotoxicita není výsledkem fotochemického ovlivnění samotného, neboť tato série vzorků podstoupila stejné fotochemické ovlivnění jako série se 100 mmol.l^{-1} bleomycinu, aniž by došlo k pozorovatelnému světlem indukovanému účinku na přežití buněk.

Příklad 24

PCI s geloninem pro léčbu tumorů u myšího modelu *in vivo*

Zvířata

Holé samice myši Balb/c (nu/nu) byly namnoženy v Department of the Institute for Cancer Research. Myši byly chovány ve speciálních podmínkách bez přítomnosti patogenů. Voda a strava byla poskytována *ad libitum*. Veškeré postupy, týkající se zvířat, byly prováděny v souladu s protokoly, schválenými komisí pro péči o zvířata (Animal care committee) v Norwegian Radium Hospital, pod kontrolou Směrnic Národního etického výboru pro blaho zvířat (National Ethical Committee's guidelines on animal welfare). Myši měly na počátku pokusů průměrnou hmotnost 20 až 25 g (stáří 5 až 8 týdnů) a v jedné pokusné skupině bylo alespoň 5 zvířat. Lidský adenokarcinom WiDr, používaný v této studii, byl rozšiřován (propagován) sériovou transplantací myším Balb/c (nu/nu). Nádory byly skalpelem rozsekány do homogenity a 20 μl roztoku bylo podkožně injikováno do pravého kyčle každé myši. Velikost nádoru byla měřena dvakrát nebo třikrát týdně přeměřením dvou na sebe kolmých průměrů. Obem nádoru byl počítán podle následujícího vzorce:

$$V = (W^2 \times L)/2$$

kde W je šířka a L délka průměrů měřených nádorů.

Léčba

Myši byly náhodně rozděleny do různých skupin, uvedených v Tabulce 1 a na Obr. 25. Zásobní roztok AlPcS_{2a} byl naředěn na koncentraci 1,25 mg/ml v PBS a injikován intraperitoneálně (do dutiny břišní) v konečné koncentraci 10 mg/kg, jakmile nádory dosáhly objemu přibližně 100 mm^3 . Čtyřicet osm hodin po injikaci AlPcS_{2a} byly nádory po dobu 16 minut vystaveny červenému světlu (viz níže). Bezprostředně po vystavení světlu byl do nádoru gelonin injikován (50 μg celkového množství v roztoku o koncentraci 2 mg/ml, tj. 25 μl). Myši byly po injikaci AlPcS_{2a} ponechány ve tmě po dobu 1 týdne.

Působení světlem

Nádory byly ozářeny halogenovou lampou (150 W, Xenophot HLX64640), filtrovanou dlouhovlnným filtrem 580 nm a krátkovlnným filtrem 700 nm, emitující 150 mW/cm^2 . Zvířata byla pokryta hliníkovou fólií všude kromě oblasti nádoru, kde byl ve fólii vytvořen otvor s průměrem o 2 mm širším než průměr nádoru. Nádory byly vystaveny 145 J/cm^2 světla. Objemy nádorů byly měřeny dvakrát až třikrát týdně, jak bylo popsáno výše. Myši byly usmrceny, jakmile nádor

dosáhl průměru přibližně 20 mm. Hodnocen byl podíl myši bez nádoru 30 dní po ozáření a zaznamenána byla průměrná velikost nádoru u každé z léčených skupin (Obr. 25).

Výsledky

5

Tabulka 1

Myši byly léčeny tak, jak bylo popsáno výše a výskyt nádorů byl zaznamenán 30 dní po ozáření.

skupina č.	léčba	podíl myši bez nádoru 30 dní po ozáření	% myši bez nádoru 30 dní po ozáření
1	neléčené	1/8	13
2	PBS + světlo	0/7	0
3	gelonin	0/8	0
4	gelonin + "osvit předem"	0/5	0
5	AlPcS _{2a}	0/10	0
6	AlPcS _{2a} + gelonin	0/7	0
7	AlPcS _{2a} + světlo	2/11	18
8	AlPcS _{2a} + gelonin + "osvit předem"	4/5	80

10

Z Tabulky 1 je zřejmé, že fotochemická internalizace (PCI) s geloninem, využívající postup „osvit předem“ (skupina 8) vyléčila 80 % (4 z 5) myši z jejich nádorového bujení. Oproti tomu gelonin samotný nevykázal žádný účinek, ani s přídavným ovlivněním světlem (skupina 4), ani bez ovlivnění světlem (skupina 3), v obou případech bez přítomnosti AlPcS_{2a}. Gelonin nevykázal žádný účinek ani v kombinaci s AlPcS_{2a} bez ovlivnění světlem (skupina 6). Nízká míra vyléčení byla zaznamenána u neléčených myši (skupina 1), což bylo pravděpodobně způsobeno spontánním vymizením nádoru. Nízkou míru vyléčení je možné pozorovat také u zvířat, která obdržela AlPcS_{2a} a podstoupila ovlivnění světlem (skupina 7), což bylo dáno účinkem fotodynamické léčby (PDT), nezávislým na přítomnosti geloninu. Ovšem tento účinek PDT (18 % vyléčení) byl významně nižší než účinek nalezený u ovlivnění PCI společně s geloninem (80 %, skupina 8). I když gelonin sám o sobě nemá žádný účinek, jakkoliv vysoká míra vyléčení u skupiny PCI nemůže být vysvětlena pouze aditivním, součtovým účinkem PDT a geloninu, ale musí být vyvolána synergickým účinkem, při němž ovlivnění PCI uskutečňuje toxický potenciál geloninu.

15

20

25

30

Obr. 25 znázorňuje účinek ovlivnění prostřednictvím PCI na střední objem nádoru u některých z léčených skupin. Je zřejmé, že u skupiny, dostávající pouze gelonin (prázdné trojúhelníčky) rostou nádory stejně rychle jako u skupiny, která je také ozářena a dostává placebo v injekci PBS (plné čtverečky). U zvířat, ovlivňovaných pouze fotochemicky, ale nikoli geloninem (prázdné kosočtverečky) byl růst tumorů opožděn, ale nádory začaly zase růst přibližně 15 dní po ozáření. Naproti tomu u zvířat, ovlivňovaná plnou geloninovou a PCI léčbou (plná kolečka), nebylo pozorováno žádné zvýšení středního objemu nádoru ani 33 dní po ozáření.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky in vitro nebo ex vivo, **vyznačující se tím**, že tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, buňka se uvede do styku s molekulou jež má být zavedena, tedy s přenášenou molekulou a buňka se ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího činidla, přičemž uvedené ozáření se provádí před buněčným pohlcením zmíněné molekuly do kteréhokoliv intracelulárního oddílu, přičemž přenášená molekula není snadno uvolněna z oddílu, vymezeného intracelulární membránou, do cytosolu, a/nebo se jedna složka nebo obě složky, sestávající z fotosenzitizačního činidla a přenášené molekuly, spojí s nebo připojí na jednu nebo více z nosičových molekul, zaciňujících molekul nebo vektorů.
- 15 2. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky in vitro nebo ex vivo, **vyznačující se tím**, že tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, tato buňka se ozáří světlem o vlnové délce účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího činidla a ve stejnou dobu nebo v době po ozáření se buňka uvede do styku s molekulou, jež má být zavedena, tedy s přenášenou molekulou, přičemž přenášená molekula není snadno uvolněna z oddílu, vymezeného intracelulární membránou, do cytosolu, a nebo se jedna složka nebo obě složky, sestávající z fotosenzitizačního činidla a přenášené molekuly, spojí s nebo připojí na jednu nebo více z nosičových molekul, zaciňujících molekul nebo vektorů.
- 20 3. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že ozáření se provádí před buněčným příjmem přenášené molekuly.
4. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že buňka se uvede do styku s přenášenou molekulou v době následující po uskutečněném ozáření.
- 30 5. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že buňka se uvede do styku se zmíněnou přenášenou molekulou v rozmezí od 0 do 4 hodin poté, co se uskutečnilo ozáření.
- 35 6. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že buňka se uvede do styku se zmíněnou přenášenou molekulou ve stejné době, v jaké se provádí ozáření.
- 40 7. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že přenášená molekula se uvede do styku se zmíněnou buňkou na dobu 30 minut až 6 hodin.
- 45 8. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že jako přenášená molekula se používá protein, peptid, protilátka nebo antigen, či jejich fragment.
9. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že přenášená molekula, nebo její část či fragment se prezentuje nebo exprimuje na buněčném povrchu.
- 50 10. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že jako zmíněná buňka se používá buňka prezentující antigen.

11. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že jako zmíněná přenášená molekula se používá cytotoxické léčivo.
- 5 12. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že jako zmíněná přenášená molekula se používá molekula nukleové kyseliny.
- 10 13. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že zmíněná molekula nukleové kyseliny se začlení do vektorové molekuly, s výhodou adenoviru.
- 15 14. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, **vyznačující se tím**, že se fotosenzitizující činidlo zvolí ze skupiny, sestávající z tetra-sulfonátu tetrafenylporfinu, disulfonátu tetrafenylporfinu, hlinitého disulfonátu ftalocyaninu a z dalších amfifilních fotosenzitizérů.
- 20 15. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, **vyznačující se tím**, že jako zmíněná fotosenzitizující činidla se používají sloučeniny, kterými jsou kyselina 5-aminolevulinová nebo estery kyseliny 5-aminolevulinové či farmaceuticky přijatelné sole takových sloučenin.
- 25 16. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizující činidlo se uvede do styku s uvedenými buňkami na dobu 4 až 24 hodin před ozáření, s výhodou po zmíněné časové rozmezí bezprostředně před ozáření.
- 30 17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizující činidlo se uvede do styku s uvedenými buňkami na dobu 4 až 24 hodin bezprostředně před ozáření.
- 35 18. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, **vyznačující se tím**, že zmíněné fotosenzitizující činidlo se odstraní po styku se zmíněnou buňkou na 1 hodinu až 4 hodiny před ozáření.
- 40 19. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18, **vyznačující se tím**, že jako nosič, zacílující molekula nebo vektor, k nimž je přenášená molekula připojena, nebo s nimiž je spojena, se používá adenovirus, polykationt, kationtový lipid či peptid, nebo zacílený vektor.
- 45 20. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že zmíněná přenášená molekula se připojí k vektoru, s výhodou adenoviru, nebo se s ním spojí a zmíněný vektor se připojí k nosičové molekule, zacílující molekule nebo vektoru, nebo se s nimi spojí.
- 50 21. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím**, že jako zmíněný polykationt se použije poly-L-lysin, poly-D-lysin nebo kationtový dendrimer.
22. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím**, že jako zmíněný kationtový lipid se použije 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylamino)-propan.
- 55 23. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím**, že jako zmíněná nosičová molekula se použije liposom nebo konstrukt na bázi lipidu, s výhodou obsahující alespoň jeden kationtový lipid.

24. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, nebo 12 až 23 **vyznačující se tím**, že alespoň 50 % zmíněných buněk, do nichž se uvedená molekula zavádí, není usmrceno.

25. Způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 24, **vyznačující se tím**, že krok ozáření se provádí 1 až 10 minut.

26. Použití přenášené molekuly a fotosensitizujícího činidla, tak jak jsou definovány v kterémkoliv z předchozích nároků, pro výrobu léčiva, obsahujícího buňky připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25 pro použití při léčení nebo prevenci onemocnění, poruchy nebo infekce, s výhodou pro genovou terapii, stimulaci imunitní odpovědi nebo k prevenci nebo léčení zhoubného nádoru.

27. Použití přenášené molekuly a fotosensitizujícího činidla, tak jak jsou definovány v kterémkoliv z předchozích nároků, pro výrobu léčiva pro použití při léčení nebo prevenci onemocnění, poruchy nebo infekce, s výhodou pro genovou terapii, stimulaci imunitní odpovědi nebo k prevenci nebo léčení zhoubného nádoru, při němž jsou fotosenzitizační činidlo a odděleně přenášená molekula určeny pro styk s buňkami nebo tkáněmi nemocného a buňky mají být ozářeny světlem s vlnovou délkou, účinně aktivující fotosenzitizační činidlo před pohlcením přenášené molekuly do jakéhokoliv intracelulárního oddílu buňky.

28. Použití přenášené molekuly a fotosensitizujícího činidla, tak jak jsou definovány v kterémkoliv z předchozích nároků, pro výrobu léčiva pro použití při léčení nebo prevenci onemocnění, poruchy nebo infekce, s výhodou pro genovou terapii, stimulaci imunitní odpovědi nebo k prevenci nebo léčení zhoubného nádoru, přičemž toto onemocnění, porucha nebo infekce má být léčena tak, že se léčivo a odděleně fotosenzitizační činidlo, definované v předchozích nárocích mají uvést do styku s buňkami nebo tkáněmi nemocného a buňky mají být ozářeny světlem s vlnovou délkou, účinně aktivující fotosenzitizační činidlo před pohlcením přenášené molekuly do jakéhokoliv intracelulárního oddílu buňky.

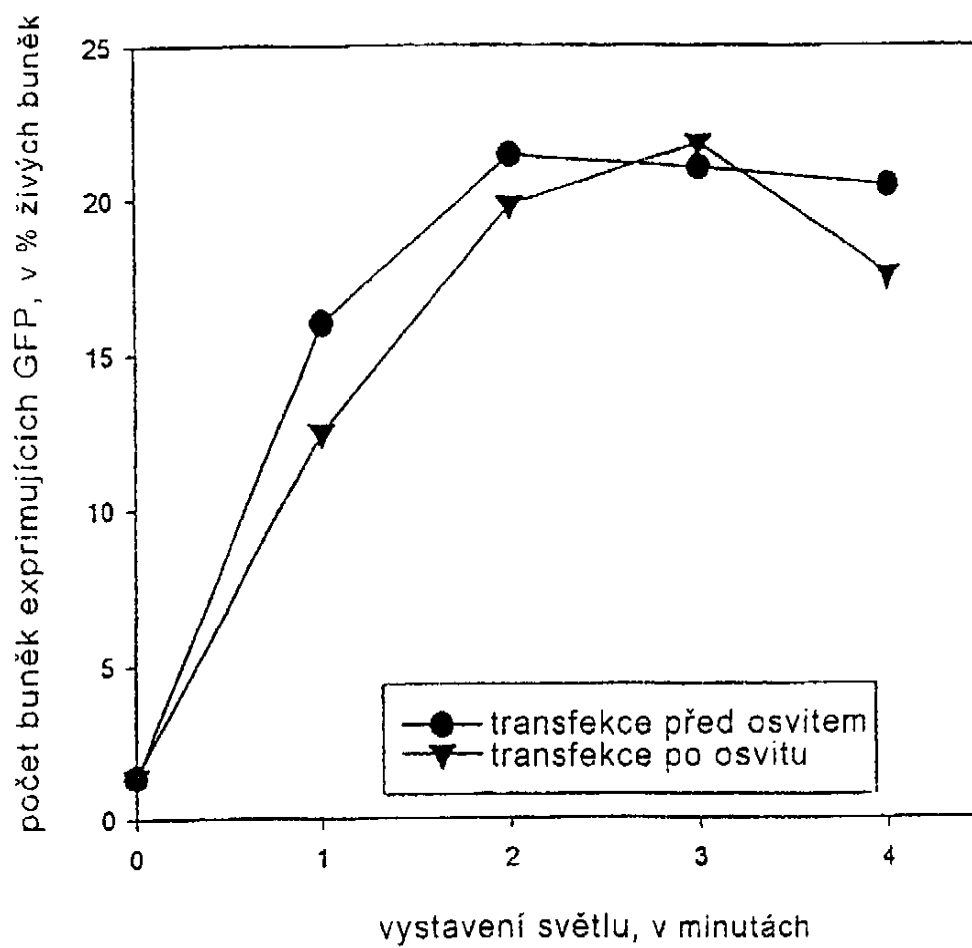
29. Použití přenášené molekuly a fotosensitizujícího činidla, tak jak jsou definovány v kterémkoliv z předchozích nároků, pro výrobu léčiva pro použití při léčení nebo prevenci onemocnění, poruchy nebo infekce, s výhodou pro genovou terapii, stimulaci imunitní odpovědi nebo k prevenci nebo léčení zhoubného nádoru, přičemž toto onemocnění, porucha nebo infekce má být léčena tak, že se léčivo a odděleně přenášená molekula, definovaná v předchozích nárocích mají uvést do styku s buňkami nebo tkáněmi nemocného a buňky mají být ozářeny světlem s vlnovou délkou, účinně aktivující fotosenzitizační činidlo před pohlcením přenášené molekuly do jakéhokoliv intracelulárního oddílu buňky.

30. Použití podle kteréhokoliv z nároků 26 až 29, při němž pohlcení do buňky má být uskutečněno způsobem podle kteréhokoliv z nároků 2 až 7, 16 až 18, 24 nebo 25.

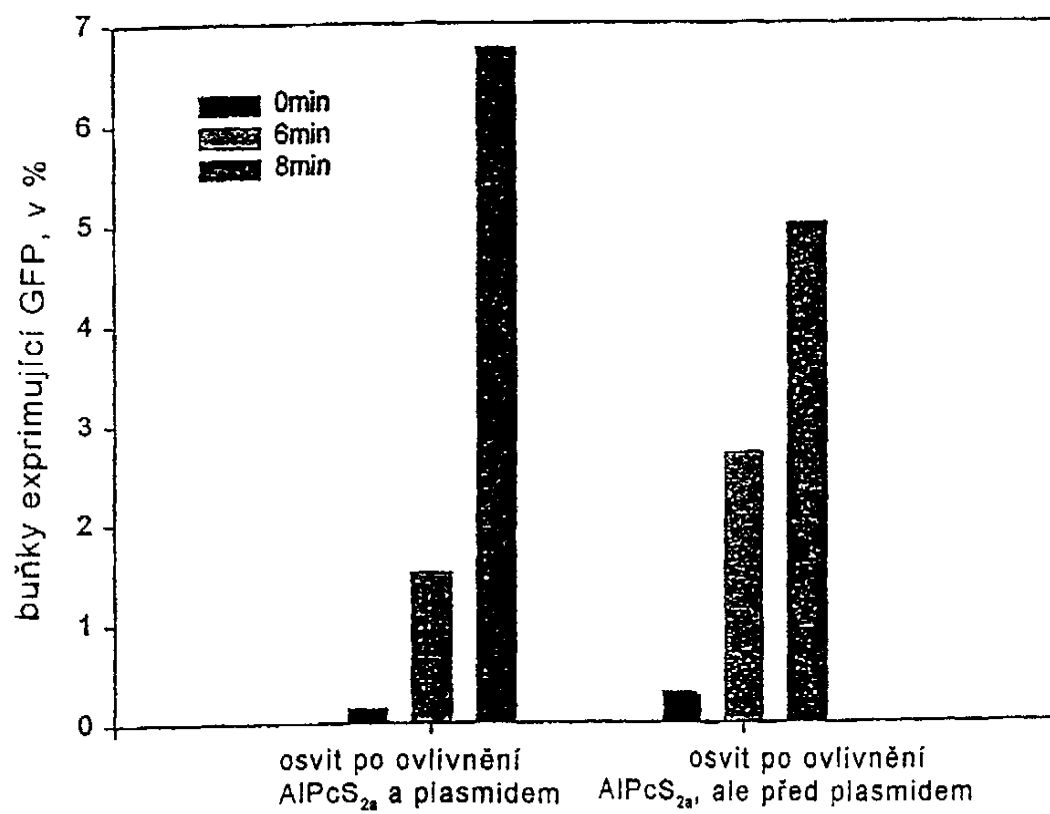
31. Použití podle kteréhokoliv z nároků 26 až 30, při vakcinaci, jako přenášená molekula se užije molekula antigenu nebo její část nebo fragment, který je prezentován nebo exprimován na buněčném povrchu.

32. Prostředek, obsahující přenášenou molekulu a odděleně fotosenzitizující činidlo, tak jak byly definovány v kterémkoliv z předchozích nároků, jako kombinovaný prostředek pro oddělené nebo následné použití při léčení nebo prevenci onemocnění, poruchy nebo infekce, s výhodou pro genovou terapii, stimulaci imunitní odpovědi nebo k prevenci nebo léčení zhoubného nádoru, přičemž fotosenzitizační činidlo a odděleně přenášená molekula mají být uvedeny do styku s buňkami nebo tkáněmi nemocného a buňky mají být ozářeny světlem s vlnovou délkou, účinně aktivující fotosenzitizační činidlo před pohlcením přenášené molekuly do jakéhokoliv intracelulárního oddílu buňky.

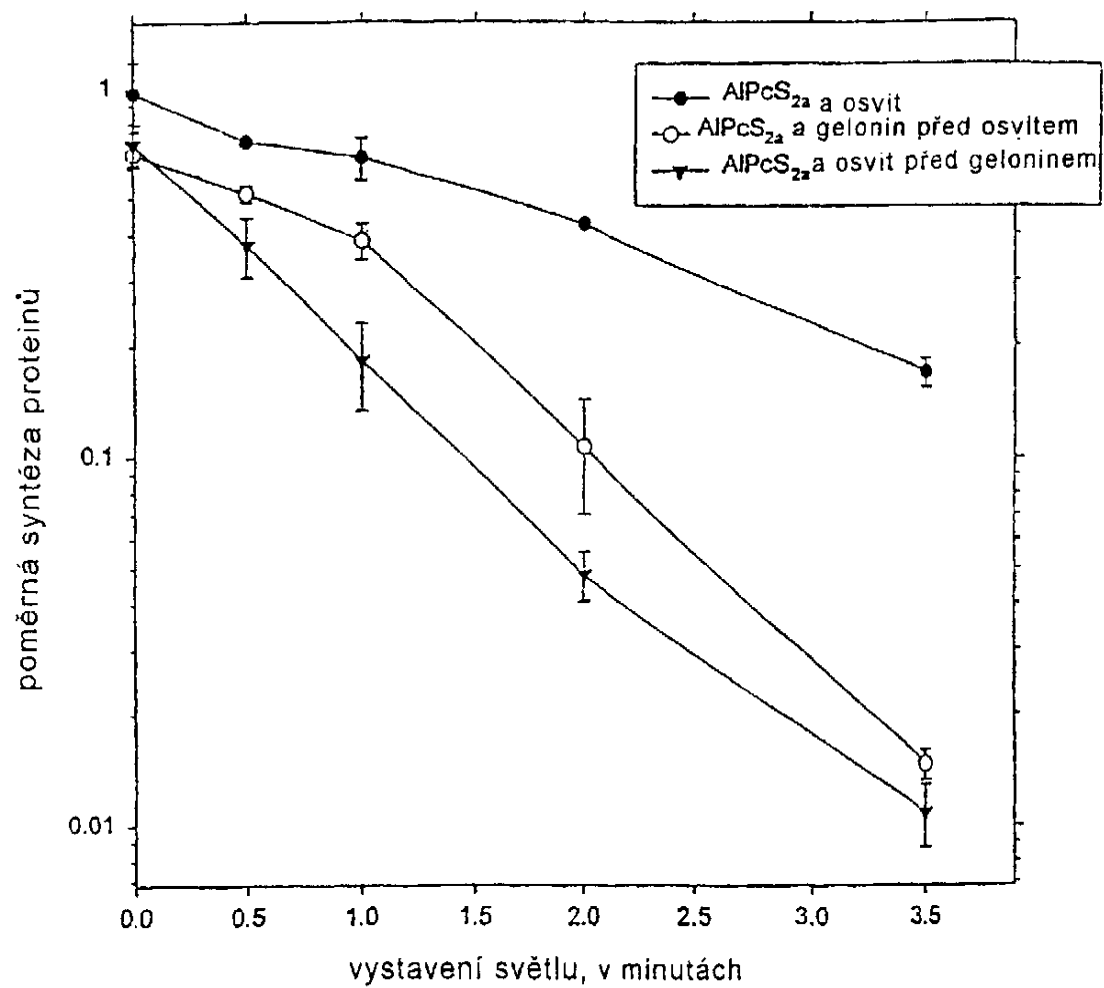
Obr. 1



Obr. 2

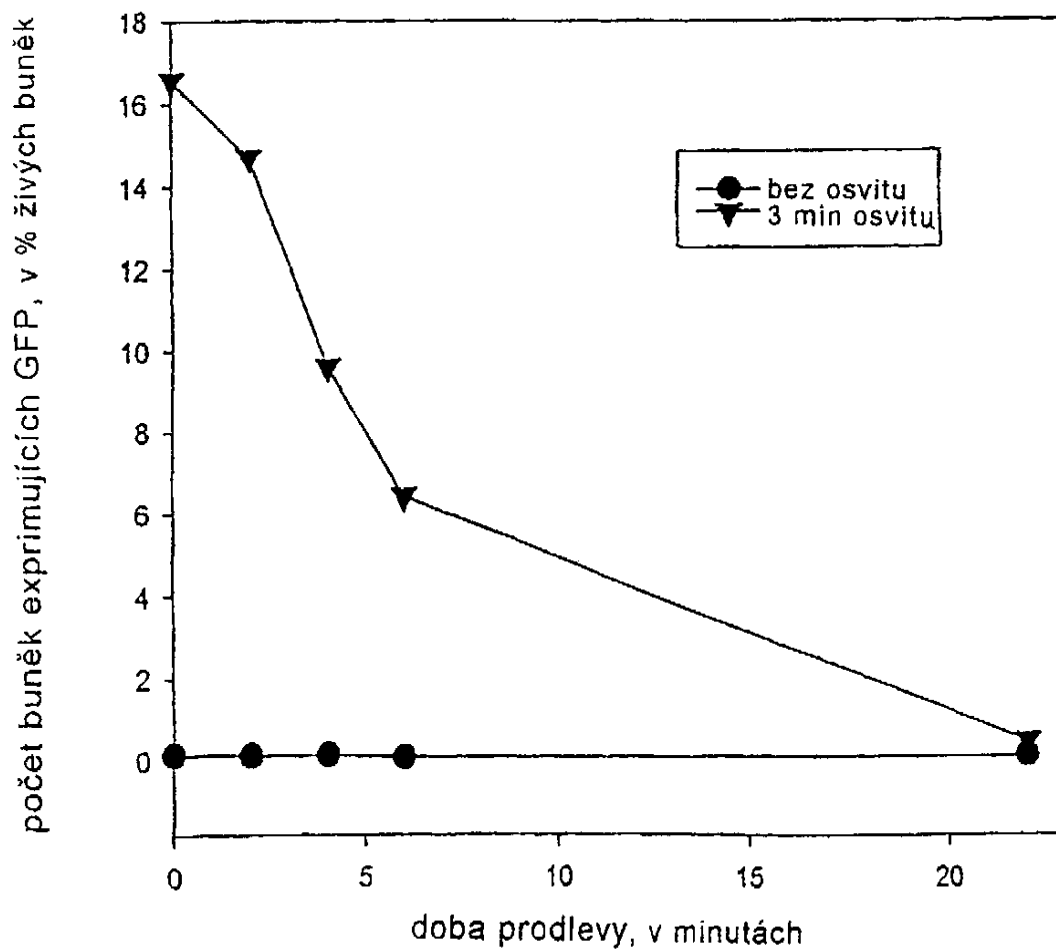
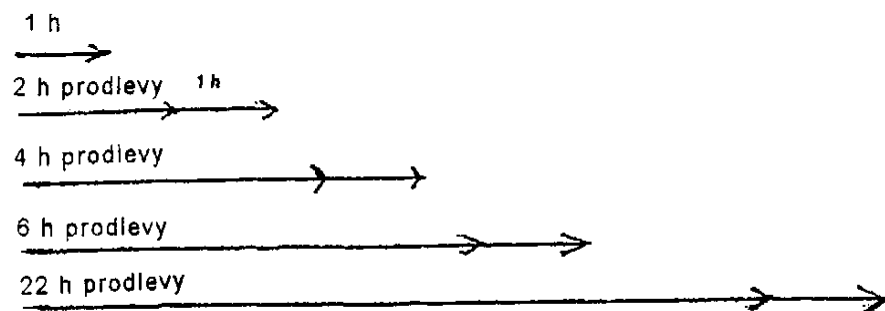


Obr. 3

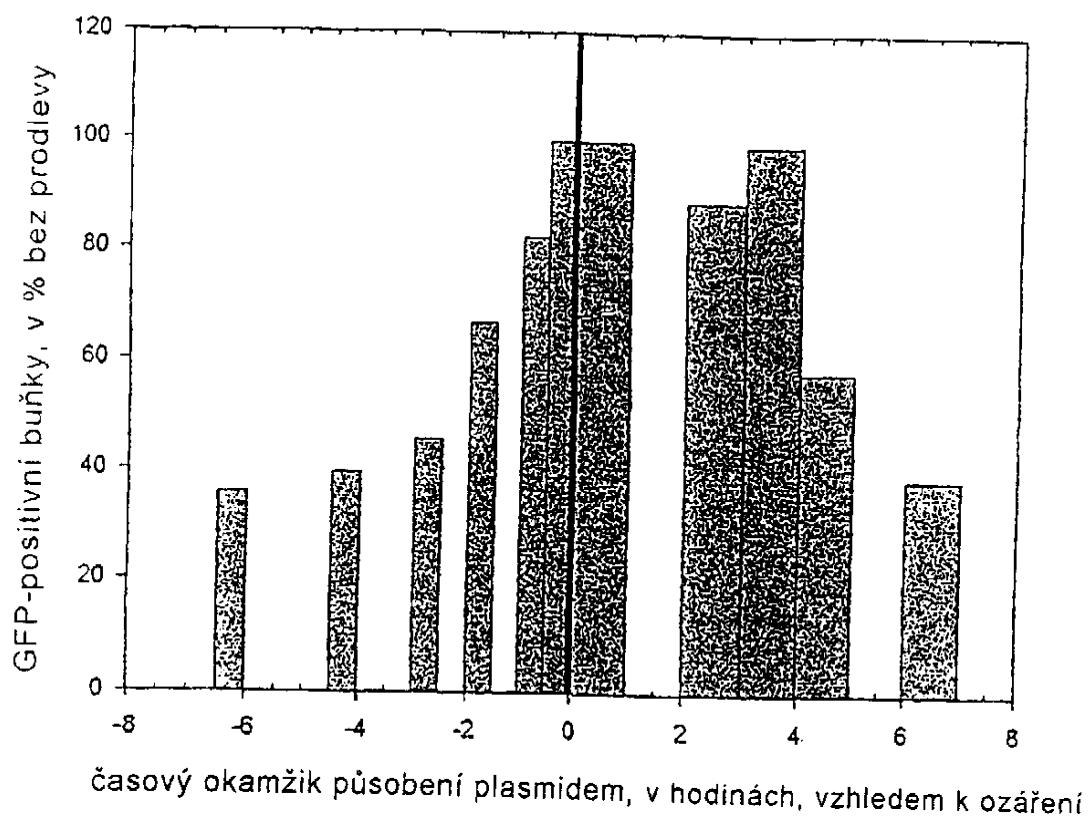


Obr. 4

3 min osvitu

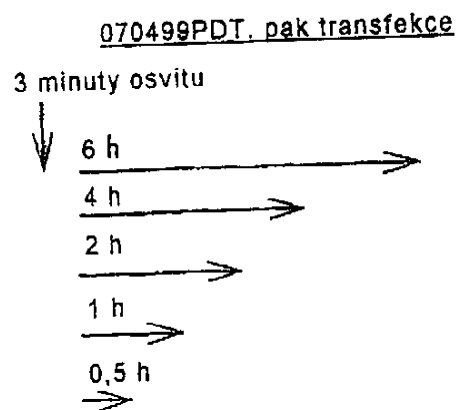


Obr. 5

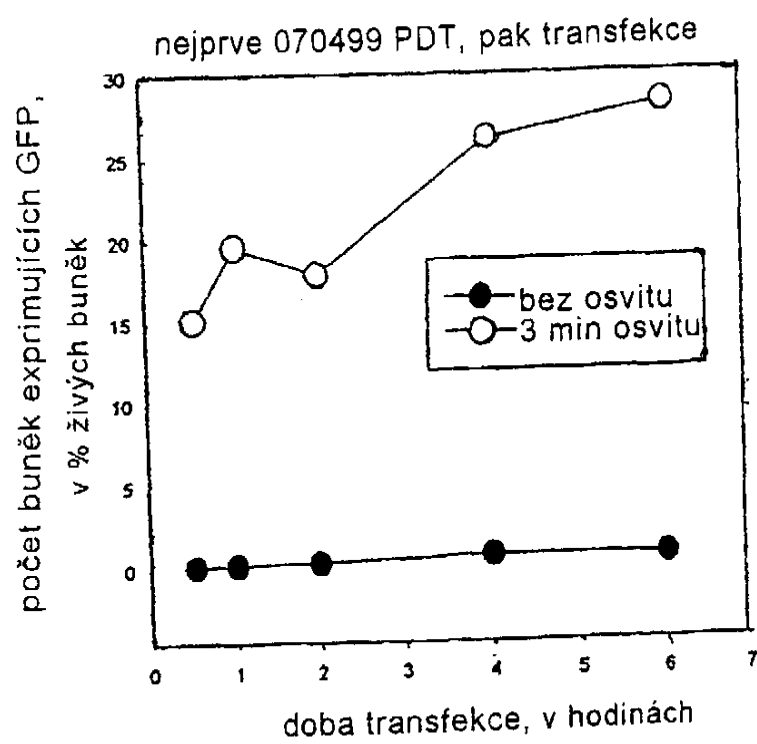


Obr. 6

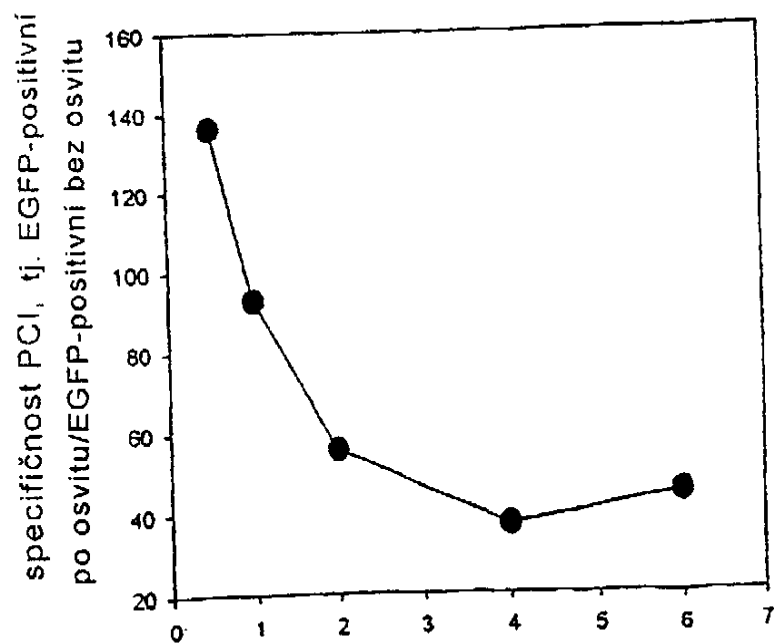
A



B

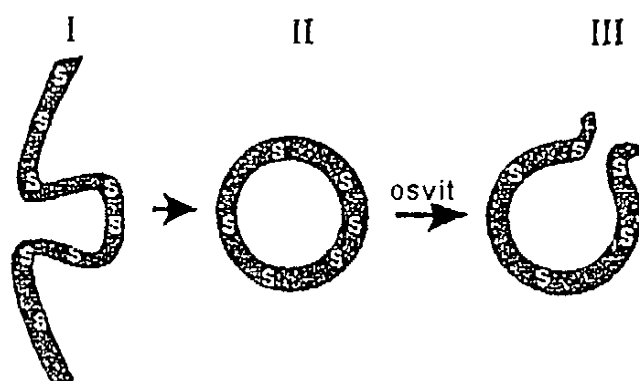


C

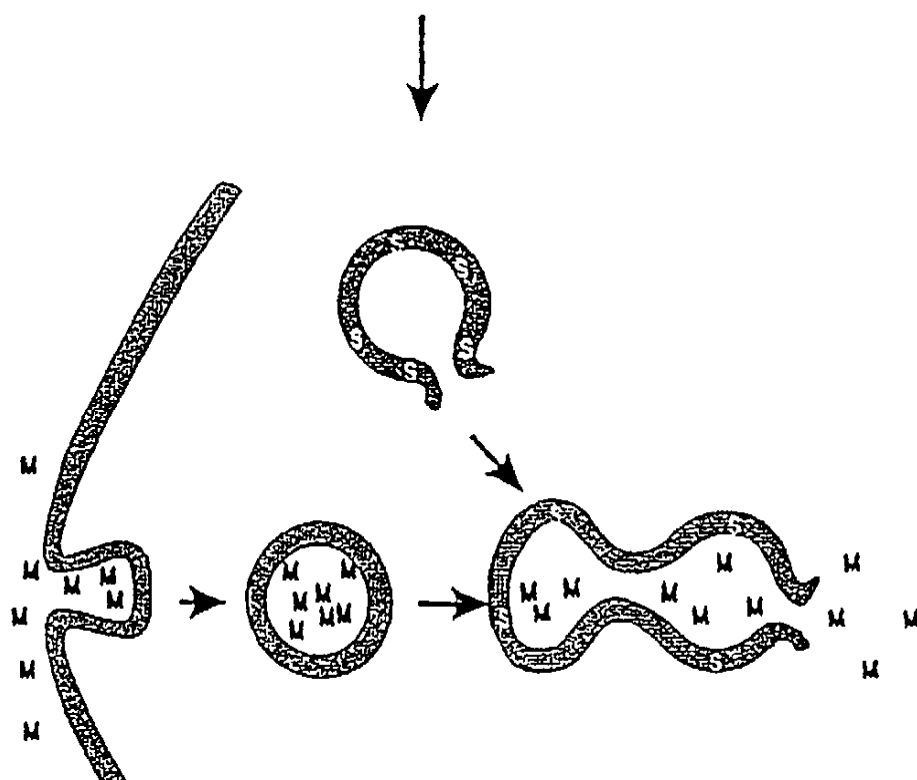


Obr. 7

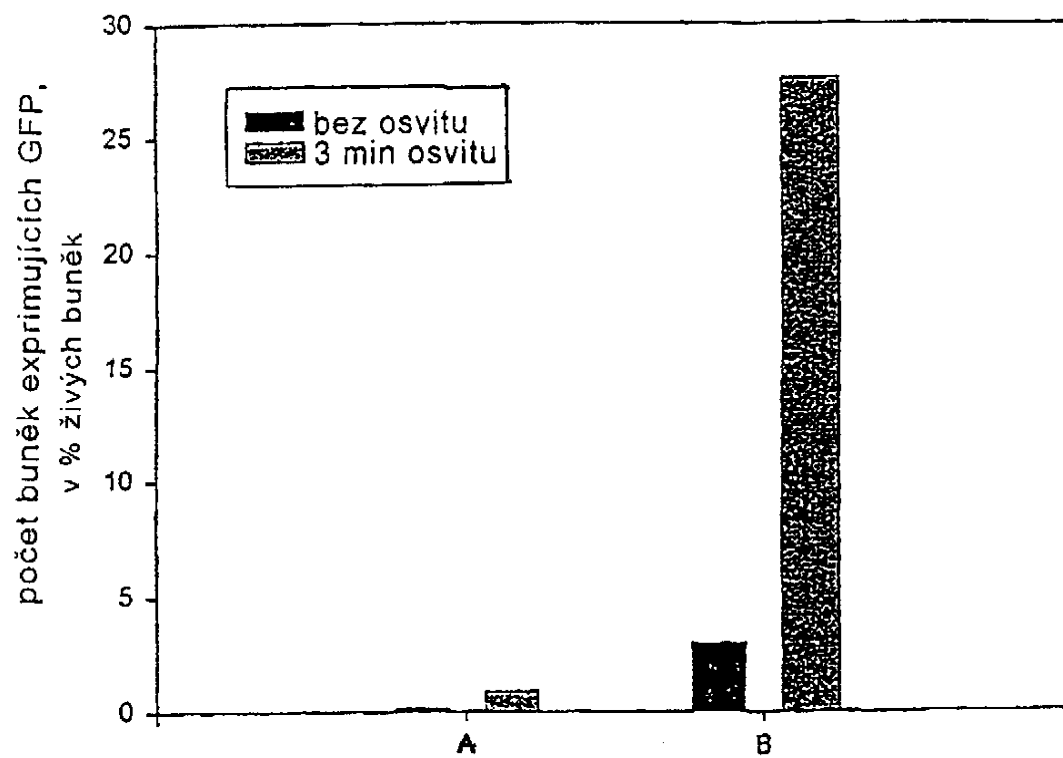
A

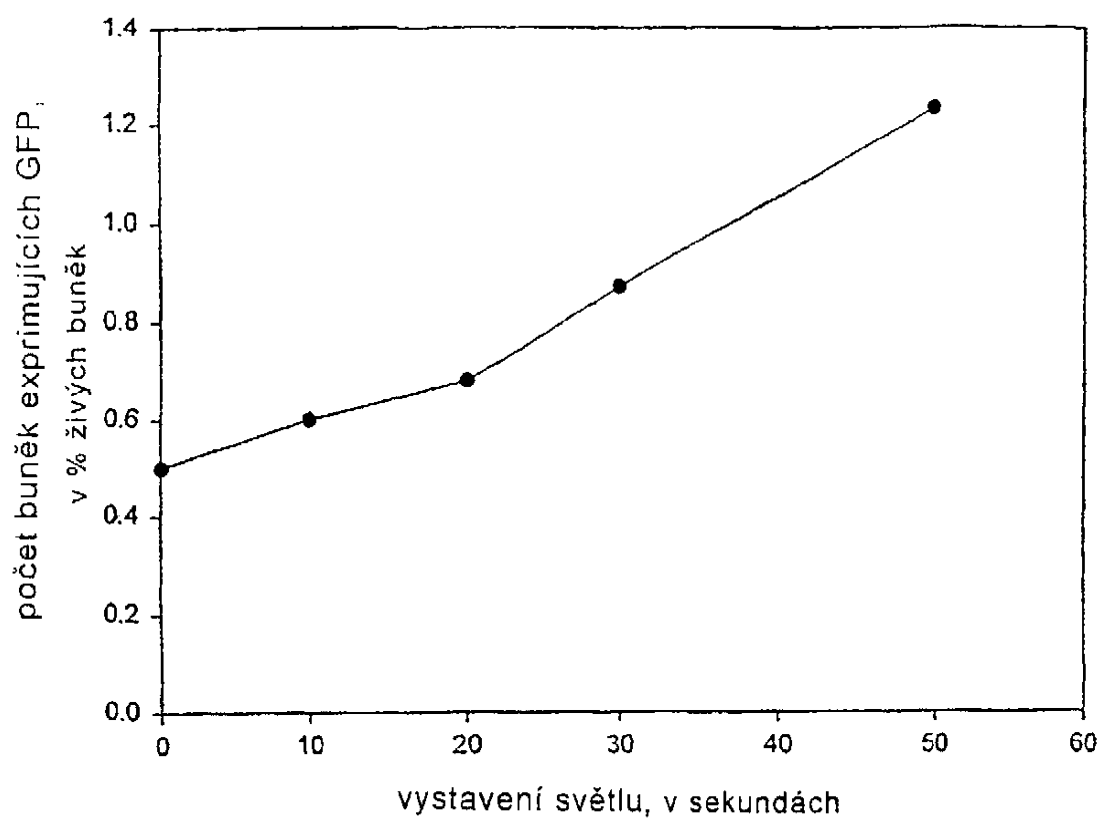
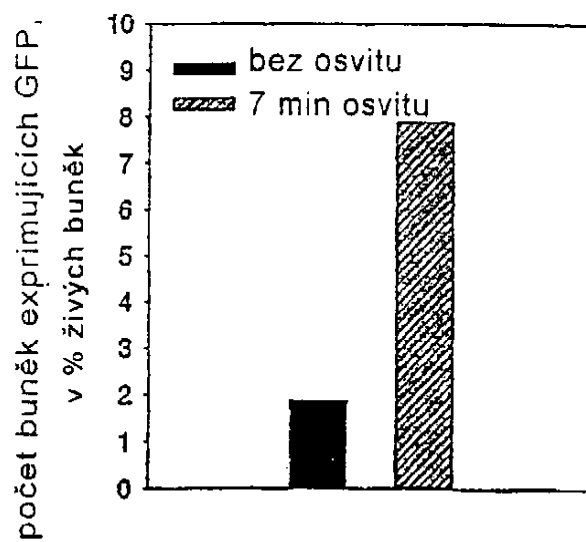


B

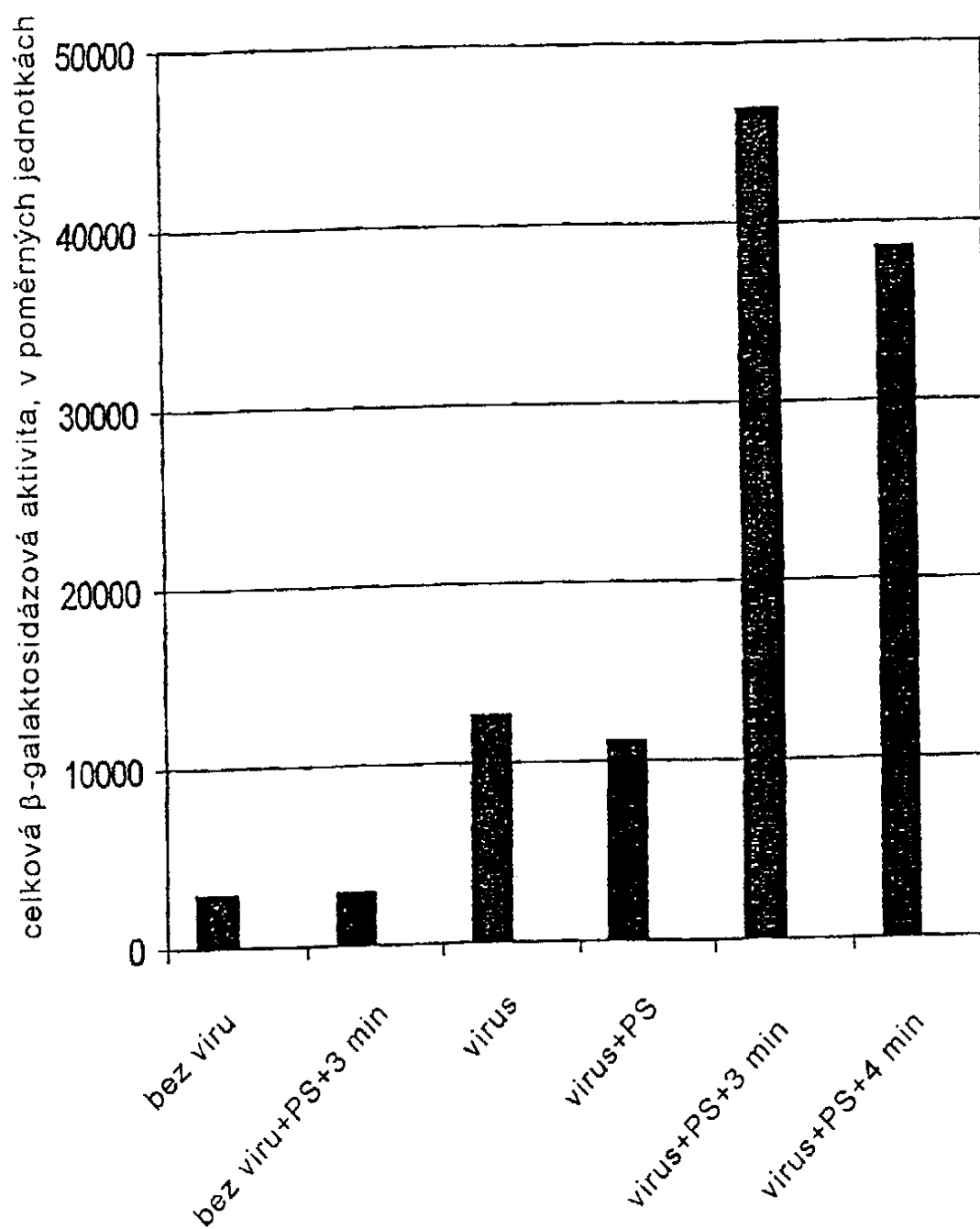


Obr. 8

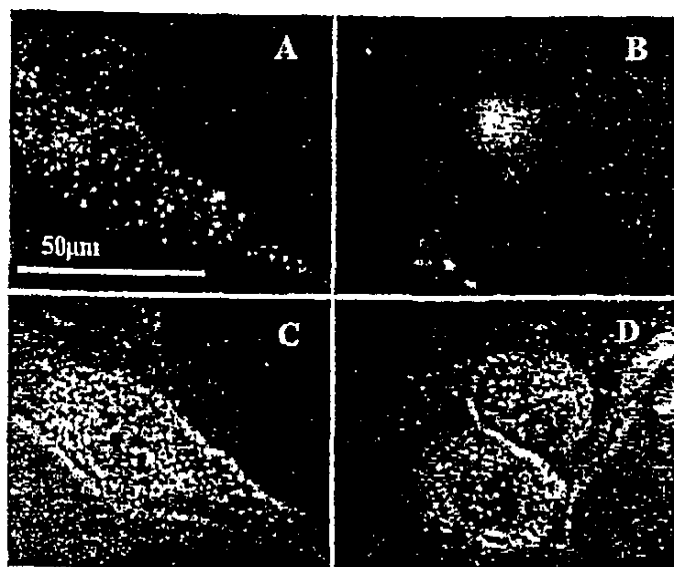


Obr. 9**Obr. 10**

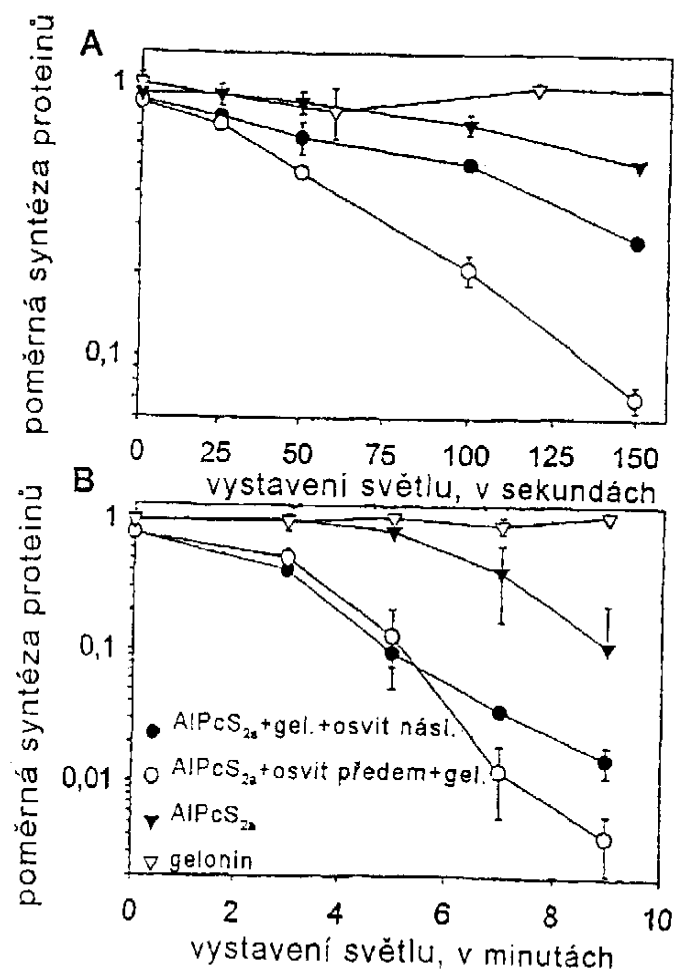
Obr. 11

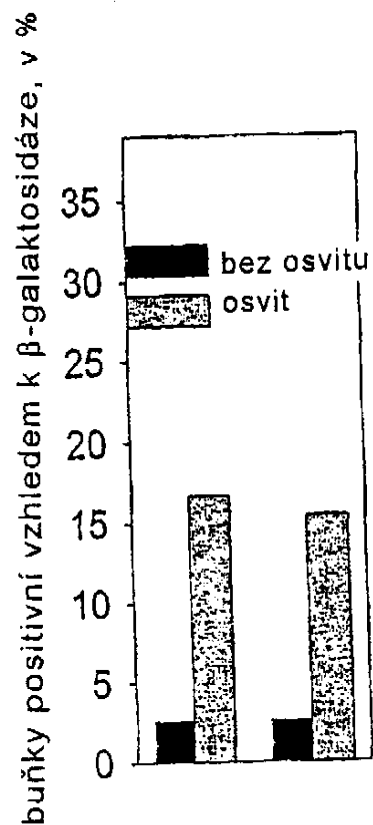
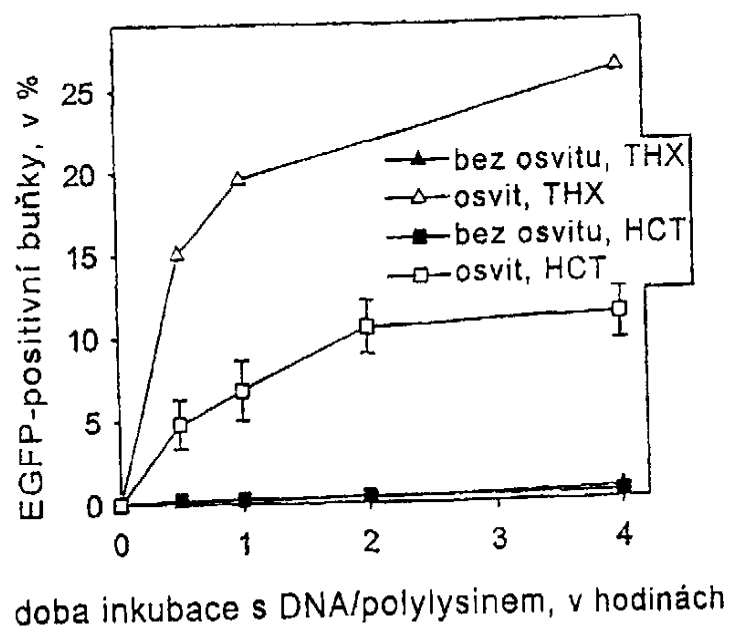


Obr. 12

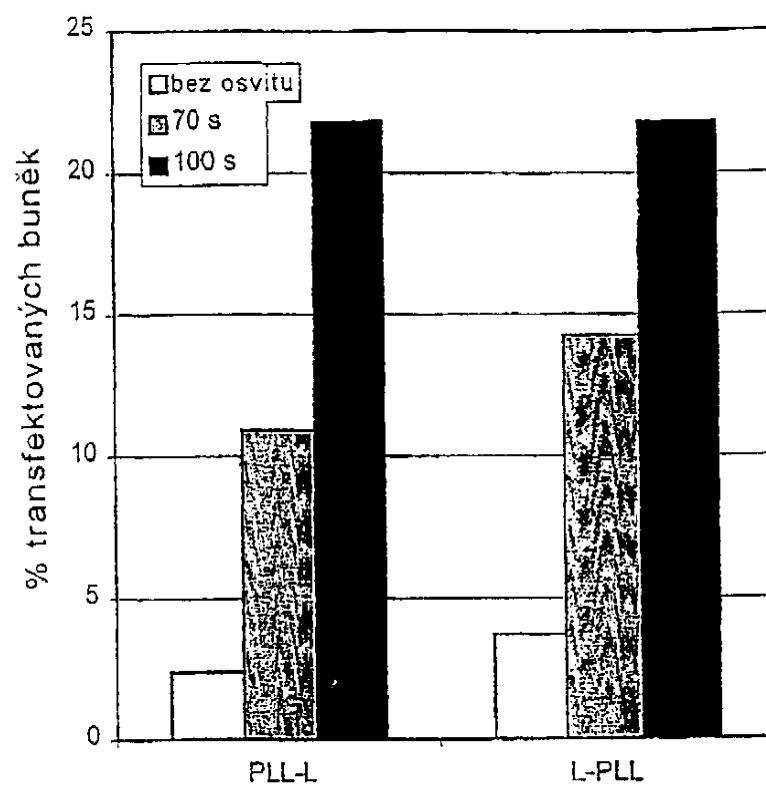


Obr. 13

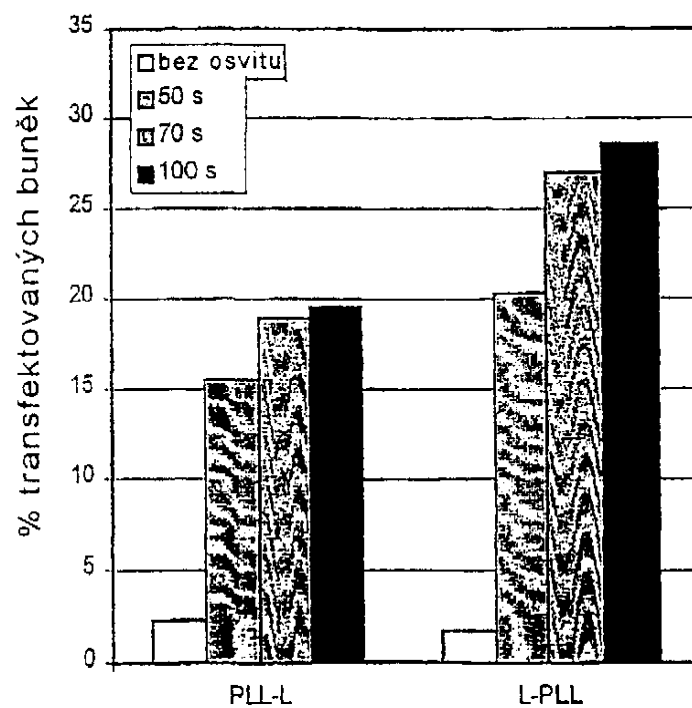


Obr. 14**Obr. 15**

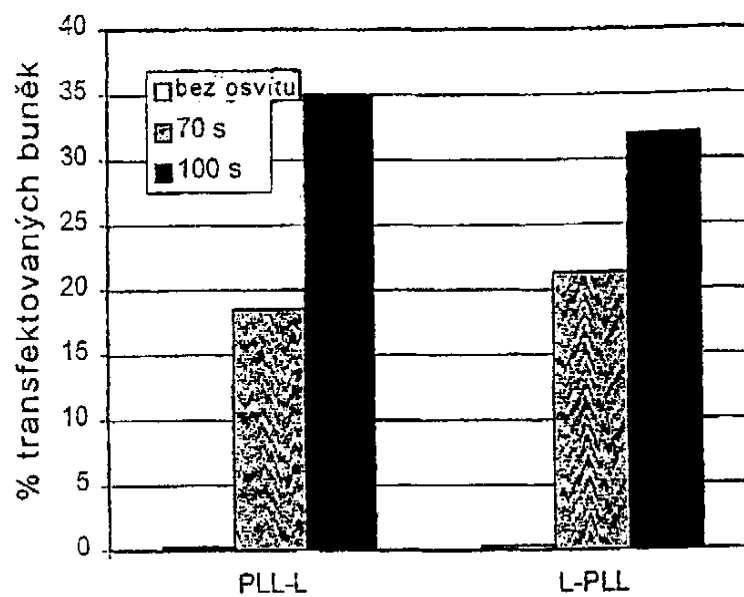
Obr. 16



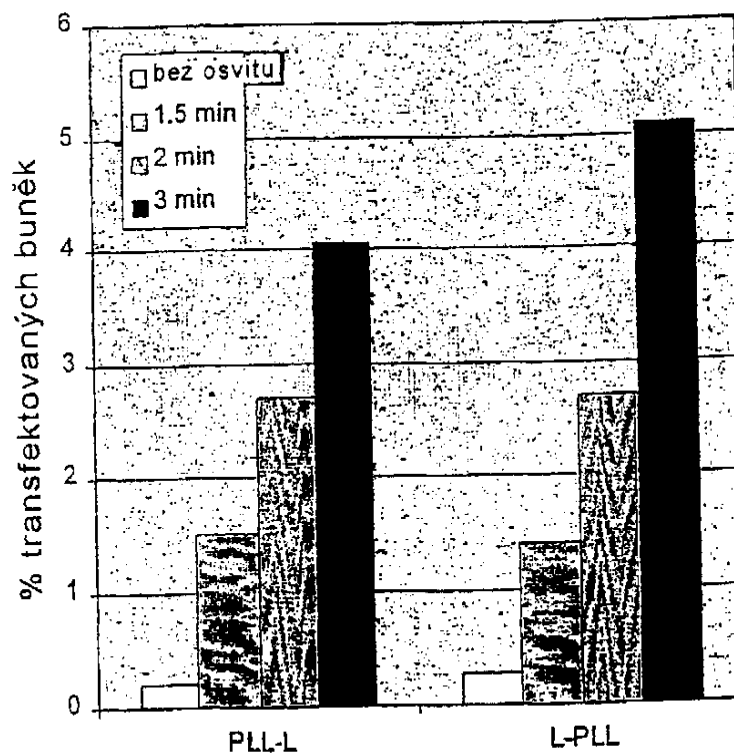
Obr. 17



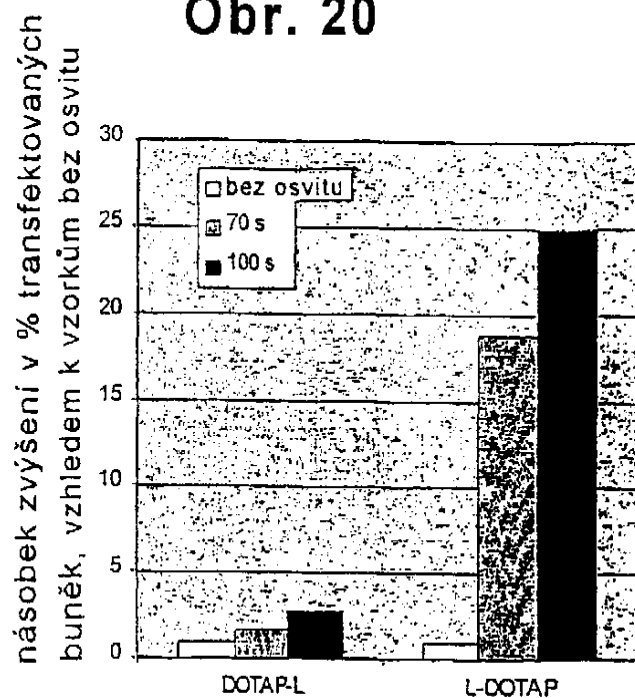
Obr. 18



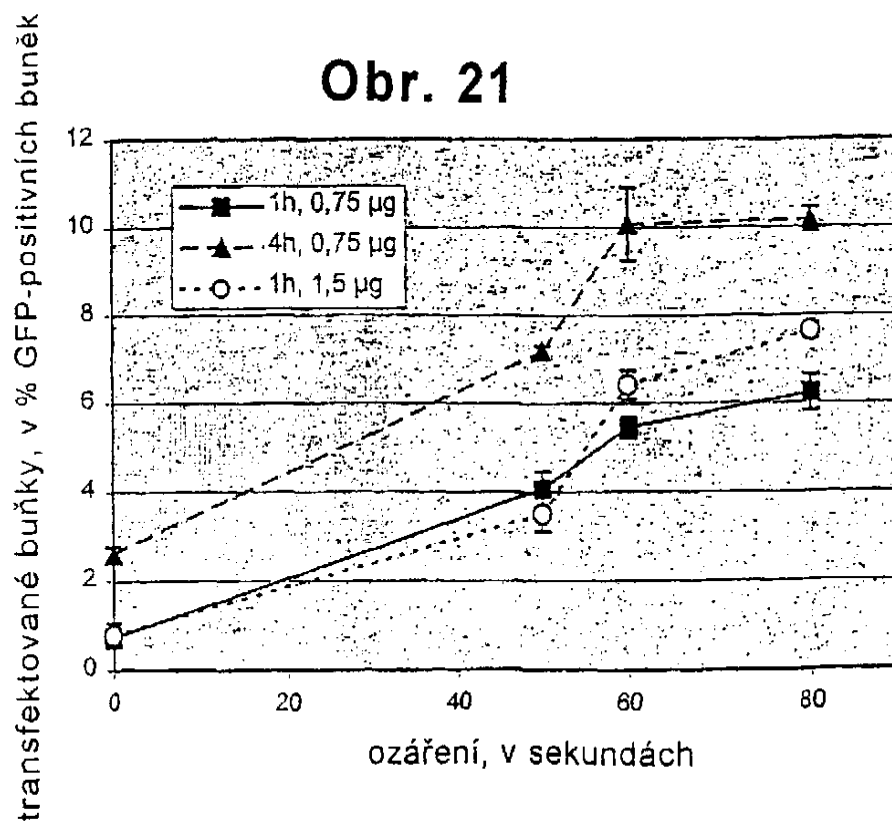
Obr. 19

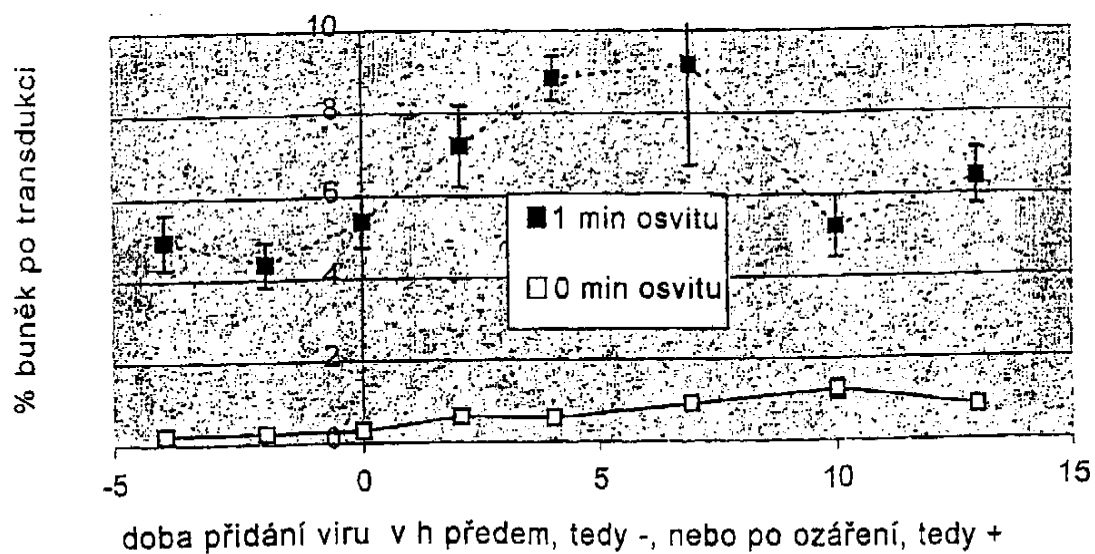
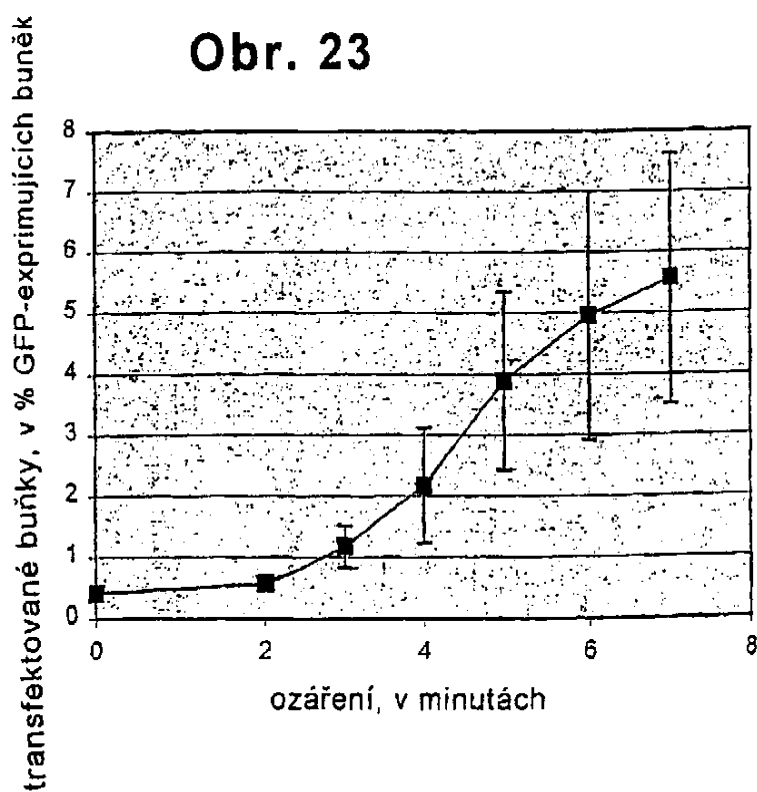


Obr. 20

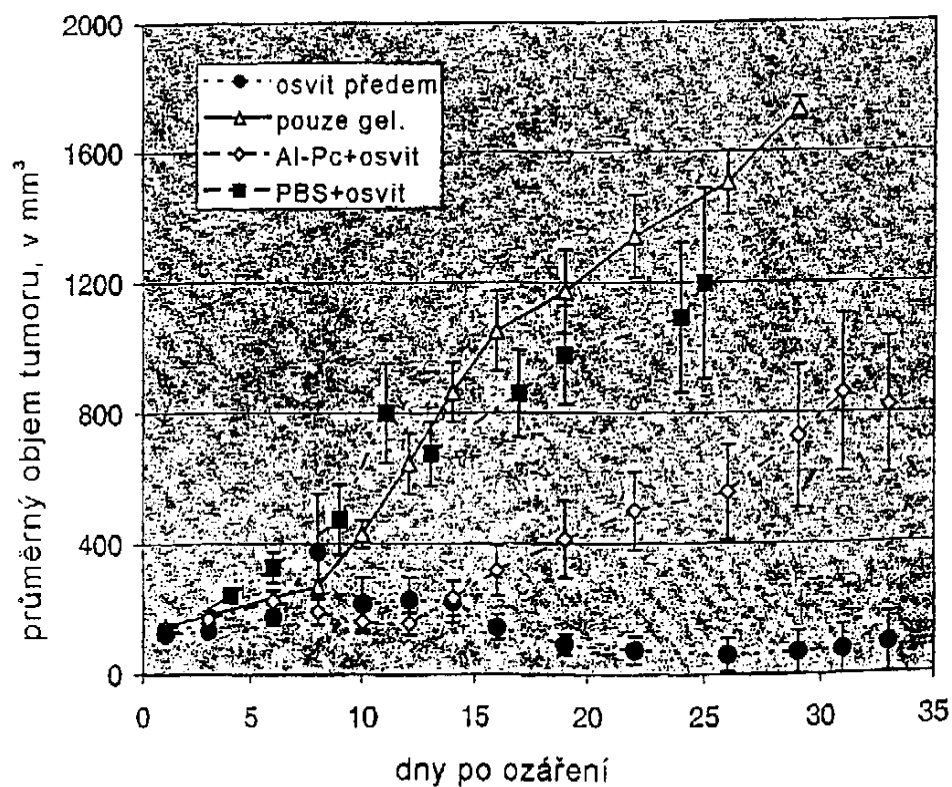
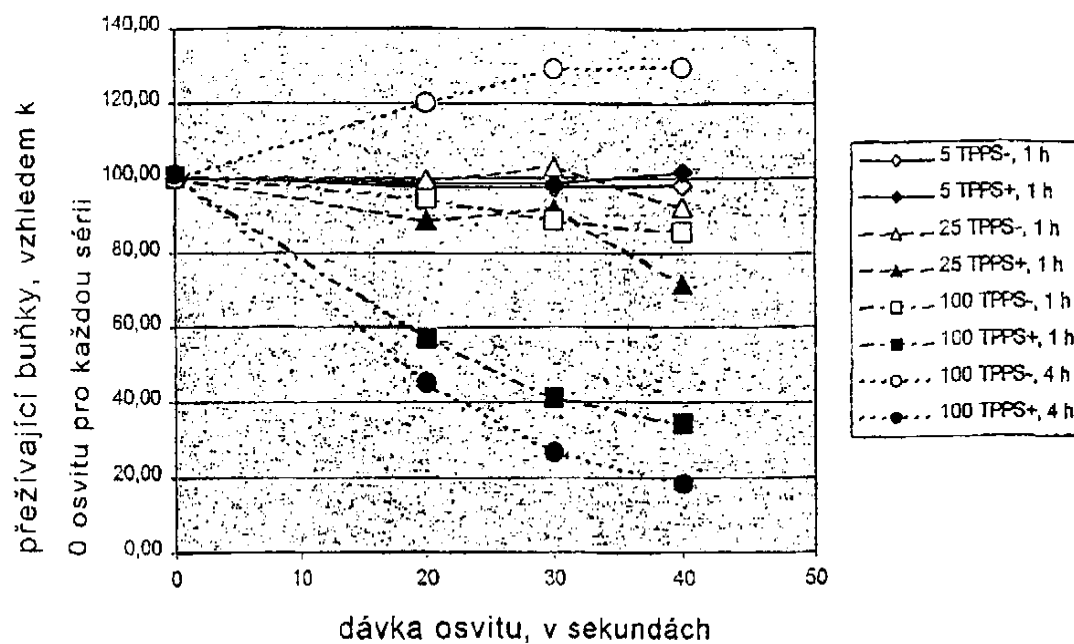


Obr. 21



Obr. 22**Obr. 23**

Obr. 24



Obr. 25