



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

220 251 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 00814

(22) A bejelentés napja: 1993. 09. 20.

(30) Elsőbbségi adatok:

07/948,113 1992. 09. 21. US

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/CA 93/00382

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/06424

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 31/40

A 61 K 31/365

A 61 P 35/00

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 11. 28.

(72) Feltaláló:

Richter, Anna M., Vancouver,
British Columbia (CA)

(73) Szabadalmaz:

Quadra Logic Technologies Inc., Vancouver,
British Columbia (CA)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Fényérzékenyítő anyagok in vivo transzkután aktiválása a vérben**

KIVONAT

Egy fényérzékenyítő anyagot szelektíven akkumuláló célsejtek elpusztítására vagy gyengítésére szolgáló gyógyszerkészítmény. A célsejtek egy intakt állat véráramában vannak, mely véráram és állat tartalmaz még nem célsejteket is. A besugárzást olyan intenzitással alkalmazzák transzkután módon, az intakt állat legalább

egy részén, hogy az hatékony a célsejtek szelektív elpusztításában vagy gyengítésében, és viszonylag érintetlenül hagyja a nem célsejteket. A célsejtek közé tartoznak a leukémia-sejtek, a vírust tartalmazó sejtek, a parazitákat tartalmazó sejtek és a mikroorganizmusok, mint a baktérium, a paraziták és a szabad vírusok.

A találmány fényérzékenyítő farmakoterápiás anyagokkal kapcsolatos. Specifikusan, a találmány olyan módszerrel kapcsolatos, melyben vér eredetű célsejteket pusztítunk el vagy gyengítünk, mely célsejtek fényérzékenyítő anyagot vesznek fel a transzkután besugárzás hatására; ezzel a módszerrel a célsejteket gyengítjük vagy elpusztítjuk, és a nem célsejteket viszonylag érintetlenül hagyjuk.

A fotodinamikus terápia egy fényérzékenyítő vegyület bejuttatását, majd ezt követően a szövet – mely szövet a fényérzékenyítő vegyületet szelektíven magában foglalja – fénnel való besugárzását foglalja magában. A megfelelően magas koncentrációjú fényérzékenyítő vegyületet tartalmazó célszövet szelektíven abszorbeálja a fényt, mely azt eredményezi, hogy a közvetlen környezetében levő sejtek gyengülnek vagy elpusztulnak. Az 5,095, 030 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás olyan eljárásokat ír le, melyekben fényérzékenyítő vegyületet adnak állatoknak, melyeket ezután külső fényforrással sugároznak be. Például ezen találmány 5. példája egerek P815 tumorsejtekkel való szubkután injektálását írja le, melyek aztán kitapintható tumorra fejlődnek. Ezután fényérzékenyítő vegyületet injektálunk az egerekbe, majd az állatok 3 órán keresztül sötétben való tartása után tumorjaikat erős fénynek tesszük ki. A kezelt állatok túlélési aránya a kezeletlen kontrollokéhoz képest megnő. Hasonlóképpen a találmány 8. példája *rhabdomyosarcoma* rendszert ír le egerekben, hasonló eljárással. Így ezek a példák lokalizált szilárd tumorok kezelésére irányulnak, ahol a kívülről alkalmazott fényt irányítjuk a tumorra. Ezekben az esetekben a célszövet nem a véráramban található, ahol a kezelés során el kell kerülni a véredények és a nem célsejtek károsítását.

A 4,960,408 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás a véráram tartalmának (HIV-vírus és fertőzött T-sejtek) fotoferezissel való kezelését írja le. Ebben a technikában a beteg vérének egy testen kívüli készüléken vezetik keresztül, melyben a vér fehérvérsejtfraekcióját UV fénynek teszik ki, mielőtt a sejtek visszatérnek a betegbe.

A benzoporfirinszármazékok (BPD) vörös fénnel (400–900 nm) való kombinálásáról azt írják, hogy hatékonyan távolítja el a szabad vírusokat és a vírusok által fertőzött sejteket a rögzített vérkészítményekből és a virémiás macskákból nyert teljes vérből. A vörösvértestek életképesnek tűnnek a vírusölő kezelés után is (North és munkatársai, *Blood cells*, 18:129–40, 1992).

A BPD magasabb affinitást mutat a tumorszövetekkel szemben, ideértve a leukémiás sejteket is, mint a normális nem rosszindulatú sejtekkel szemben (Jaimeson és munkatársai, *Leukemia Res.*, 14:209–219, 1990).

Az 1992. március 10-én megjelent 5,095,030 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás különböző hullámhossz-specifikus citotoxikus anyagokat ír le, melyeket általánosan „zöld porfirinekként” jelöl. Ezek a vegyületek porfirinszármazékok, melyeket a Diels–Alder-reakcióval módosítottak, az abszorpció hullámhossz hosszabb hullámhosszra való emelésének céljából. Ez néhány kedvező tulajdonságot eredményez

a hematoporfirinszármazékokhoz képest, például ezen vegyületek általános fotodinamikus terápiában való használatuk. Ahogy a találmányban is részletezzük, ezek a citotoxikus anyagok szisztematikus alkalmazásukkor nemkívánatos sejtekben lokalizálódnak, különösen tumorsejtekben vagy patogén vírusokban, és az ezt követő fénnel való besugárzás – amit ezek a vegyületek abszorbeálnak – olyan átalakulást okoz bennük, ami a citotoxicitást befolyásolja.

Az 1992. február 5-én bejelentett 6,074,666 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás porfirin fényérzékenyítő vegyületek liposzómáinak előállítását írja le.

A találmány eljárást biztosít a fényérzékenyítő vegyületet szelektíven akkumuláló célsejtek elpusztítására vagy gyengítésére, ahol a célsejtek egy intakt állat véráramában vannak. A véráramban és az állatban azonban vannak nem célsejtek is. A találmány magában foglalja az intakt állat legalább egy részének transzkután módon való, olyan tetszőleges intenzitású besugárzását, mely hatékony a célsejtek szelektív gyengítésében vagy elpusztításában, és a nem célsejteket viszonylag érintetlenül hagyja.

Egy másik találmány szerinti megoldásban a találmányt olyan célsejtek esetében használjuk, melyek sokkal gyorsabban szaporodnak, mint a nem célsejtek. Egy másik megoldásban a célsejtek lehetnek leukémia-sejtek, vírus tartalmazó sejtek, parazitát, baktériumot, szabad vírusokat, a véren belüli fertőző anyagokat tartalmazó sejtek.

Míg a találmány bármely fényérzékenyítő vegyület használatát biztosítja, előnyösen az anyagot a klorinok (mint például a klorin e6), a bakterioklorinok, a ftalocianinok, a porfirinek, a purpurinek, merocianinok, pszoralének és prodrogok (mint például a δ -aminolevulinsav – mely a szövetben protoporfirin drogot képes létrehozni – közül szelektáljuk. Egy másik megoldás szerint a BPD–MA és nátrium-porfimer a fényérzékenyítő vegyületek.

Az 1A. ábra a fénykamra által sugárzott fény spektrumát mutatja, az 1B. ábra a BPD-t aktiváló fény spektrumát mutatja.

A 2. ábra a liposzómás BPD egérbe való injektálása [20 μ g/egér (0,9 mg/kg)] után különböző időpontokban mért egérplazma BPD-koncentrációkat mutatja.

A 3. ábra a liposzómás BPD egérbe való injektálása [20 μ g/egér (0,9 mg/kg)] után különböző időpontokban mért egérplazma BPD-koncentrációit mutatja olyan egerek esetében, melyeket fénynek tettünk ki, valamint a kontrollegerek esetében, melyeket sötétben tartottunk.

A 4. ábra a különböző időpontokban fénynek kitett egerek vérében lévő BPD (1 μ g/ml) in vitro fotodegradációját mutatja.

Az 5. ábra a fénynek kitett egérvérben lévő fotodegradált BPD in vivo és in vitro százalékat ábrázolja a fénynek ki nem tett vérben lévő BPD-lebontáshoz viszonyítva.

A 6. ábra a vörös fénynek (600–900 nm) kitett egérvérben lévő fotodegradált BPD in vitro és in vivo (tel-

jes vérbesugárzás) százalékát ábrázolja a fénynek ki nem tett vérben levő BPD-lebontáshoz viszonyítva.

A találmány a fényérzékenyítő anyagot szelektíven akkumuláló vér eredetű célsejtek elpusztításának vagy gyengítésének módszere, miközben a nem célsejteket viszonylag érintetlenül hagyja. A találmány magában foglalja az intakt állat legalább egy részének transzktán módon való, olyan tetszőleges intenzitású besugárzását, mely hatékony a célsejtek szelektív gyengítésében vagy elpusztításában.

A találmány szerinti használatban a „célsejtek” azok a sejtek, melyeket ezzel a kezelési módszerrel szándékozunk gyengíteni vagy elpusztítani. A célsejtek felveszik a fényérzékenyítő anyagot; majd ha megfelelő besugárzást alkalmazunk, a célsejtek elpusztulnak vagy meggyengülnek. Célsejt lehet bármely, a vérben található sejt. A célsejtek közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül a leukémia-sejtek, a vírus tartalmazó sejtek, a parazitát tartalmazó sejtek. A célsejtek közé tartoznak azok a sejtek is, melyek gyors osztódáson mennek keresztül a nem célsejtekhez viszonyítva. A „célsejt” kifejezés magában foglalja az ezekre való korlátozás nélkül a mikroorganizmusokat is, mint például baktériumokat, vírusokat, parazitákat és más fertőző anyagokat. Így a „célsejt” fogalom nem korlátozódik csupán élő sejtekre, magában foglal olyan fertőző részecskéket is, mint a vírusok.

A „nem célsejt” kifejezés olyan intakt állatok sejtjeit jelenti, mely sejteket nem szándékozunk gyengíteni vagy elpusztítani ezzel a kezelési eljárással. Ezen nem célsejtek közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül az egészséges vörsejtek, a sugárzásnak kitett véredényeket felépítő normális sejtek és a sugárzásnak kitett véredényeket körülvevő szövetek sejtjei.

Az „elpusztítás” kifejezés a kívánt célsejtek megsemmisítését jelenti. A „gyengítés” a célsejt oly módon való megváltoztatását jelenti, hogy gátolja annak funkcióját. Például North és munkatársai megfigyelték, hogy a BPD-vel kezelt, vírussal fertőzött T-sejtek fénynek való kitevése után lyukak fejlődtek ki a T-sejtmembránon, melyek addig nőnek, míg az egész membrán teljesen le nem bomlik (Blood Cells, 18: 129–40, 1992). A célsejteket akkor is gyengítettnek vagy elpusztítottak tekintjük, ha a célsejteket végül a makrofágok tüntetik el.

A „fényérzékenyítő anyag” olyan kémiai vegyület, mely egy vagy több típusú szelektált célsejtben lokalizálódik és amikor besugárzásnak tesszük ki, elnyeli a fényt, ami a célsejtek gyengítését vagy elpusztulását eredményezi. Gyakorlatilag bármely olyan kémiai vegyület felhasználható a találmányban, mely a szelektált célsejtben lokalizálódik és abszorbeálja a fényt. Előnyösen a kémiai vegyület nem toxikus arra az állatra nézve, mely esetében használjuk, vagy elő lehet állítani nem toxikus készítmények formájában is. Előnyösen a kémiai vegyület fotodegradáló formája sem toxikus. A fényérzékenyítő vegyületek átfogó listája a Kreimer–Birnbau-leírásban (*Sem. Hematol.*, 26: 157–73, 1989) található meg. A fényérzékeny vegyületek közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül a klorinok, bakterioklo-

rinok, a ftalocianinok, a porfirinek, a purpurinek, a merocianinek, a pszoralének és a prodrugok, mint a 8-aminolevulinsav – mely olyan drogokat hozhat létre, mint a protoporfirin. Előnyben részesítjük a benzoporfirinszármazékokat (BPD) és a porfimer-nátriumot. A leginkább előnyben részesített vegyület a benzoporfirinszármazék monosavas A-gyűrű (BPD–MA).

A „besugárzás” a találmány szerinti használatban a teljes hullámhossz-tartományt magában foglalja. Előnyösen a besugárzási hullámhosszot úgy választjuk meg, hogy megfeleljen a fényérzékeny vegyület gerjesztési hullámhosszával. Még előnyösebben a besugárzási hullámhossz megfelel a fényérzékeny vegyület gerjesztési hullámhosszával és a nem célsejtek és az intakt állat többi része – ideértve a vérproteineket is – kismértékben abszorbeálja. Például az előnyben részesített hullámhossz a BPD–MA esetében a 600–900 nm hullámhossz-tartomány.

A besugárzást a találmány szerinti használatban a továbbiakban az intenzitás, az időtartam és a besugárzás időzítése szerint határozzuk meg, a fényérzékeny anyaggal való dózisok tekintetében.

Az intenzitás elegendő kell legyen a sugárzás bőrön való keresztülhatolásához és a vér eredetű célsejtek eléréséhez. Az időtartam elegendő kell legyen a célsejtekre ható fényérzékeny anyag fotoaktiválásához. Mind az intenzitást, mind az időtartamot úgy kell megválasztani, hogy elkerüljük az állat túlkezelését. A fényérzékeny anyaggal való dózist figyelembe véve az alkalmazás időzítése szintén fontos, mivel 1. a fényérzékeny anyag alkalmazása után bizonyos időre van szükség ahhoz, hogy az anyag a célsejtekben lokalizálódjon, 2. számos fényérzékeny anyag vérben való előfordulási szintje az idő múlásával gyorsan csökken.

A találmány egy állat kezelésére szolgáló módszert biztosít, mely állat körébe, az ezekre való korlátozás nélkül a következők tartoznak: az ember és más emlősök. Az „állat” fogalma magában foglalja a gazdasági állatokat, mint például a szarvasmarhát, a sertést és a juh, valamint a kedvenc háziállatokat vagy sport célú állatokat, mint a lovakat, a kutyákat és macskákat.

Az „intakt állat” fogalmán azt értjük, hogy az egész, osztatlan állat alávethető besugárzásnak. Az állat semmilyen részét nem távolítjuk el az elkülönített besugárzáshoz, szemben a fotoforézissel, ahol az állat vérének annak testén kívül keringtetjük a besugárzás céljából. Az egész állatot azonban nem szükséges besugározni. Csúpn az intakt állat egy részét lehet vagy kell sugárzásnak alávetni. Gyakorlati szempontból a felszínhez közel levő véredényekkel ellátott területek besugárzása előnyösebb lehet a szelektív besugárzáshoz.

A „transzktán” fogalma a találmányban azt jelenti, hogy az állat bőrén keresztül történik a besugárzás.

Röviden, a fényérzékenyítő anyagot az állatnak általában az állat sugárzásnak való alávetése előtt adjuk be.

Az előnyben részesített fényérzékenyítő anyagok közé, az ezekre való korlátozás nélkül a klorinok, a bakterioklorinok, a ftalocianinek, a porfirinek, a pupurinek, a merocianinek, a pszoralének és prodrug anya-

gok – mint a δ -aminolevulinsav, mely olyan drogokat képes előállítani, mint a protoporfirinek – tartoznak. Még inkább előnyben részesülnek a benzoporfirinszármazékok (BPD) és a porfimer-nátrium. A leginkább előnyben részesített vegyület a benzoporfirinszármazék monosavas A-gyűrű (BPD-AM).

A fényérzékennyé tevő anyagot lokálisan vagy szisztémásan alkalmazzuk. A fényérzékennyé tevő anyagot orálisan vagy injekcióval juttatjuk be, mely injekálás lehet intravénás, szubkután, intramuszkuláris vagy intraperitoneális. A fényérzékennyé tevő anyagot adhatjuk enterálisan vagy topikálisan is, tapaszok vagy beültetés segítségével is.

A fényérzékennyé tevő anyag dimerként is előállítható, több fény/mól abszorbeálása céljából. A fényérzékennyé tevő anyag specifikus ligandumokhoz is konjugálható, melyek a céllal reakcióba lépnek, ilyenek például a receptorspecifikus ligandumok vagy az immunoglobulinok, vagy az immunoglobulinok immunospecifikus részei, lehetővé téve, hogy ezek egy kívánt célsejtben vagy mikroorganizmusban még koncentráltabban legyenek jelen. Ez a konjugálás lehetővé teszi, hogy a szükséges dózisszinteket csökkentsük, mivel az anyag sokkal szelektívebb a célra, és kevésbé vesz el a többi szövetben való eloszlás során, mely szövetek károsítása kerülendő.

A fényérzékennyé tevő anyag adható száraz készítményként, mint például tableta, kapszula, kúp vagy tapasz formájában. A fényérzékennyé tevő anyag adható folyadékkészítmény formájában is, magában vagy vízzel, vagy gyógyszerészetileg elfogadható hatásjavítóval, mint amilyenek például a Remington's Pharmaceutical Sciences című műben kerültek leírásra. A folyadékkészítmények lehetnek szuszpenziók vagy emulziók. Különösen, a leginkább előnyben részesített készítmények a liposzómás vagy lipofil készítmények. Ha szuszpenziókat vagy emulziókat alkalmazunk, a megfelelő kötőanyagok közé a következők tartoznak: a víz, a sóoldat, a dextróz, a glicerín és a hasonló vegyületek. Ezek a készítmények tartalmazhatnak kisebb mennyiségű nem toxikus segédanyagokat, mint nedvesítő- vagy emulgeálószerket, antioxidánsokat, pH-pufferelő anyagokat és hasonló szereket.

A fényérzékennyé tevő anyag dózisa a keresett célsejt(ek)től, az optimális vérszinttől (lásd a 2. példát), az állat súlyától és a besugárzás időzítésétől függ. Az alkalmazott fényérzékennyé tevő anyagtól függően egy azonos optimális terápiás szintet is meg kell állapítani. Előnyösen a dózist úgy állapítjuk meg, hogy egy 0,01–100 $\mu\text{g/ml}$ közé eső vérszintet kapjunk. Előnyösen a dózis 0,01–10 $\mu\text{g/ml}$ vérszintet fog eredményezni. Ha a fényérzékennyé tevő anyag a BPD-MA, a vérszint előnyösen 0,01–4 $\mu\text{g/ml}$. Még előnyösebben egy 0,01–2 $\mu\text{g/ml}$ BPD-MA vérszintet valósítunk meg.

A véráramon belüli besugárzási intenzitás előnyösen 2–150 mW/cm^2 . Még előnyösebben a besugárzás intenzitása a véráramon belül 10–100 mW/cm^2 . Legelőnyösebben a véráramon belüli besugárzási intenzitás 15–70 mW/cm^2 .

A besugárzás időtartama előnyösen 0,25 perc és 24 óra között változik. Még előnyösebben a sugárzás időtartama 0,25 perc és 6 óra között változik. Legelőnyösebben a besugárzás időtartama 0,25 perc és 2 óra között változik.

Anélkül, hogy találmányunkat valamilyen elmélettel korlátoznánk, a feltalálók feltételezik, hogy a BPD alapján véve viszonylag rövid idő alatt fotoaktiválható a vérben, felesleges toxicitás nélkül. Így úgy tűnik, hogy létezik egy terápiás lehetőség, melyet a BPD-dózis és besugárzási dózis határoz meg. A BPD fotodegradációs termékeinek képződése a fotoaktiválás indikátoraként használható. A BPD fotoaktiválásáról feltételezzük, hogy szabad oxigénatom képződéséhez vezet, mely viszont citotoxikus hatású. A vér extrakorporális kezelésével vagy a szálóptikás, intravénás fényaktiválásal kapcsolatos problémák miatt a BPD-vel beinjektált betegek egész testének „vőtörő fényágyban” való besugárzása jó megoldásnak tűnik a vérben levő fertőző anyagok kezelése esetében.

A felsorolt példákkal a találmány hatékonyságát szeretnénk demonstrálni, valamint segítséget szeretnénk nyújtani a találmány gyakorlati megvalósításában. A következőkben leírt példákban egy fényérzékennyé tevő anyagot mutatunk be, és eszközt biztosítunk más fényérzékennyé tevő anyagok vagy új, a találmány módszerében használatos vegyületek szkríneléséhez. A következőkben leírt példák csupán példának szántuk, és nem akarjuk velük a találmányt semmilyen módon korlátozni.

Az 1–4. példákban alkalmazott anyagok

A BPD-AM vegyületet a 4,920,143 és 4,883,790 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmakban leírtak szerint állítjuk elő, mely szabadalmak a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. A BPD-AM vegyületet a QadraLogic Technologies Inc. cégtől szerezzük be, és DMSO-ban oldott állapotban (4,5 mg/ml) tároljuk -70°C hőmérsékleten. A liposzómás BPD-t (4,95 mg/ml) az 1992. február 5-én bejelentett 6,704,666 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírtak szerint állítjuk elő. A következő készítményeket használjuk:

Alkotórész	Mennyiség (mg/ml)
BPD-MA	4,95
Dimiristoil foszfátidil kolin	23,27
Tojás foszfátidil glicerín	16,09
Laktóz vagy trehalóz	148,50
Aszkorbil palmitát	0,05
Butilált hidroxitoluén	0,005
Víz az injekáláshoz	Q.S.

A liposzómás BPD-t megszáritjuk és fagyasztott állapotban -20°C hőmérsékleten 1 ml azonos mennyiségben tároljuk. A megfelelő számú azonos mennyiségeket közvetlenül a felhasználás előtt olvasztjuk ki és ekkor hígítjuk 5%-os dextrózzal vízben az állatokba való injekáláshoz.

Ezekben a vizsgálatokban him Balb/c egereket (7–11 hetesek; Charles River, Canada) használunk, ha csak másként nem jelöljük. A Balb/c egereket a bőrükben levő pigmenthiány miatt választjuk. A szőrt hatáso-

san leborotvájuk vagy depilálással eltávolítjuk az egész testről, a fejet kivéve. Ekkor az egér bőre teljesen áttetszőnek tűnik. A belső szervek, különösen a sötétvörös szervek, mint a máj és a lép, láthatóvá válnak a bőrön keresztül. Az egereket a kereskedelembe beszerezhető depilálóeszközzel (Neet[®] vagy Nair[®]) depiláljuk vagy borotváljuk 5 nappal a kísérletekben való felhasználás előtt. A kontrollegereket, melyeket BPD-vel szintén injektálunk, azonban fénynek nem tesszük ki, nem borotváljuk meg. Az injektálás után az egereket különböző ideig sötétben tartjuk a fentiekben leírtak szerint. A vizsgálatok előtt és után az egereket az állatoknak kedvező 12 órás világos és 12 órás sötét, napi periódusban tartjuk. A vizsgálatok után az egereket érő fény mennyiségének csökkentése céljából a ketrecek egy-alsó polcra helyezzük és alufóliával letakarjuk.

A fénykamrákat a University of British Columbia műhelyében készítették rendelésre. Kétrétegű 14 75 W tungstam halogén reflektorégekkel (General Electric) szerkesztették meg, mely a kezelési területet felülről és alulról világítja meg. A fényt szűrőn vezetjük át, 1. egy sárga és piros műanyag filmrétegen keresztül, mely a 600 nm hullámhosszúánál rövidebb sugarak többségét szűri ki, és 2. 15 mm vastag vízsűrőn keresztül, mely a 900 nm hullámhosszúánál nagyobb sugarakat abszorbeálja. A hűtést folyamatosan áramoltatott hideg vízzel biztosítjuk a vízsűrőn keresztül, valamint 5 ventilátorral. A fény intenzitását egy IL 1350 Fotométerrel (International Light) mérjük.

A fénykamra által biztosított fény spektrumát az 1A. ábrán mutatjuk be. Összehasonlítás céljából a BPD abszorpciós spektrumát az 1B. ábrán mutatjuk be. Megközelítően a kibocsátott fény 1/3-a a BPD-aktiváló spektrumtartományon belül van.

A felső és alsó égősorozat által biztosított fény intenzitása nem egyforma. Az alsó sorozat 33–40 mW/cm² intenzitást biztosít, ahogy azt az expozíciós kamra padlósíntjén mérjük, míg a felső égősorozat 27–33 mW/cm² intenzitást biztosít az állatok hátbőrének felszínén mértek szerint. A leírt tartomány a besugárzási horizontális sík egyenletlenségéből adódik. Továbbá az egerek a fénykezelés ideje alatt mozognak, így különböző időpontokban bőrük különböző mennyiségű fénymentiséget kap. Így az egerek bőrét érő dózisokat megközelítően számítjuk ki a 30 mW/cm² fényintenzitást alapul véve.

Eljárások

Vérteszt: A vért 50 µl heparint tartalmazó (1000 egység/ml sóoldat) injekcióstűkbe szívjuk le. A mintavételenkénti legalább egy egérből származó vérmintákat (0,45 ml) a Diagnosztikai Laboratóriumnak küldjük el (University Hospital, University of British Columbia) egy Coulter Counterrel való analízis céljából. A vér morfológiáját vérkenetkészítményben határozzuk meg, mely keneteket a laboratórium technikusai a szelektált vérmintákból készítenek.

A plazmában levő BPD-koncentráció meghatározása: A plazmamintákat az egerekből gyűjtött és –20 °C hőmérsékleten a felhasználásig tárolt vérből centrifugálással nyerjük ki. A mintákban levő BPD koncentrá-

cióját fluorometriával határozzuk meg egy Jacso Model FP–770 (Japan Spectroscopic Co.) spektrofluorométert és egy mikroküvetát (Far UV Quartz Cell, Starna Cell Inc.) használva. A gerjesztési és emissziós hullámhosszok sorrendben 439 és 699 nm hullámhosszokat jelentenek. A plazmamintákat húszszorosukra hígítjuk 1% Triton X–100-at tartalmazó PBS-sel, közvetlenül a fluoreszcencia meghatározása előtt. A BPD-standardokat 5% egérplazmából, BPS-ből és 1% Triton X–100-ból állítjuk elő. Ilyen körülmények között a BPD-koncentráció és a fluoreszcencia egység közötti kapcsolat lineáris (a korrelációs koeficiens >0,99) a 0,1 bgf/ml és az 1 µg/ml koncentrációk között. A detektálási határérték 0,1 ng/ml minta értéknek felel meg, ami ng/ml plazmának felel meg. A maximális plazma-autofluoreszcenciát 52 nm hullámhosszon figyeljük meg. A 699 nm hullámhosszon mért BPD fluoreszcencia-csúcs gyakorlatilag mentes egyéb hatásoktól.

1. példa

A bőrfotoszenzitivitási teszt

Hat Balb/c egeret (22±1 g) készítünk elő a fent leírtak szerint. Két egeret kétszer injekciózunk (24 órás időközben) DMSO törzsoldatból származó (nem liposzómás) BPD-vel és az injektálás után 1 órával fénykezelésnek vetjük alá őket. Egy egeret nem injekciózunk be, azonban fénykezelésnek alávetjük ezt az állatot is (csak fénykontroll). Az első kezelés alatt az egereket 200 µl PBS-ben levő 15 µg BPD/egér oldattal injektáljuk. Egy egeret használunk a kezeléseket során kontrollként.

A kezelés után azonnal sötétbe helyezzük az állatokat 1 óra időtartamra (mindkét alkalommal), majd egyenként műanyag tárolókba helyezzük őket és így tesszük a fénykamrába és fénnel kezeljük őket. Az egyes egereket a fénykamrából különböző időpontokban vesszük ki: sorrendben 15, 30, 45, 60 és 75 perc elteltével. A bőr felületére juttatott fénydózis sorrendben 27, 54, 81, 108 és 135 J/cm². A második alkalommal ugyanezeket a fénydózisokat használjuk, azonban az első nap nagyobb fénydózsist kapott állatok a második napon kisebb dózist kapnak. A kontrollegér mind a két alkalommal 60 perces besugárzást kap. A besugárzás alatt az egereket végig megfigyelés alatt tartjuk a kényelmetlen helyzetre utaló jelek, illetve vakaródzás észleléséhez. A második fénykezelés után az állatoknak naponta figyeljük a bőrkülalakját és általános viselkedési mintáit két héten keresztül.

A kezelés után két héttel vérmintát veszünk az állatokból szívpunktúrával, melyet halotán anesztézia alatt végzünk. Ezután az állatokat elpusztítjuk és autopsiának vetjük alá. Lépüket, májukat és veséiket lemérjük (súlymérés).

A BPD-vel beinjektált egerek jól viselik a kapott fénydózisokat (27, 54, 81, 108 és 135 J/cm²) és az ismételt kezelést is. Mindkét kezelési napon normálisan viselkednek a fény alatt, a kényelmetlen érzés bármilyen tünete nélkül, csupán alkalmasszerű vakaródzás jelentkezik, melynek a bőrben levő drog aktiválódása lehet az oka. Durva változás nem figyelhető meg az ege-

rek bőrében sem közvetlenül a fénykezelés után, sem a kétételes, ezt követő periódus elteltével. Viselkedéssbeli eltérések sem észlelhetők. Meglepő módon a fénykontrollgér az egyetlen egér, melyen a kényelmetlen érzés tünetei megfigyelhetők (nyugtalanság és vakaródzás). Így ezt az állatot fény alatt csupán 60 percig tartjuk (az eredetileg tervezett 75 perctől eltérően).

Az egerek száma túl kevés ahhoz, hogy határozott következtetéseket vonjunk le a kezelés belső szervekre, mint a májra, lépére és vesékre kifejtett hatásáról, azonban ebben a tesztsoportban, melyet a kettős kezelés után két héttel vetünk vizsgálat alá, a durva morfológia

és a súly normális. A teljes testsúly és a megfelelő belső szervi súlyok a 2. táblázatban láthatók.

A 3. táblázat az egérvér-paramétereket mutatja a kezelés után két héttel, ideértve a fehérvérsejtszámot (WBC), a vörösvértestszámot (RBC), a hemoglobint (HB), a hematokritértéket (Hct), az átlag alaki testtérfogatot (MCV) és a vérlemezkesszámot (PLT). A kezelés után két héttel meghatározott vérmorfológia a 4. táblázatban látható. Az összes érték a normális határok közé esik. A vérlemezke-aggregáció valamelyest hozzájárulhat a vérlemezkesszám enyhe csökkenéséhez és a magasabb WBC-számhoz.

1. táblázat

	1. nap (15 µg/cgér 0,68 mg/kg)		2. nap (20 µg/cgér 0,9 mg/kg)	
Egér szám	BPD mg/kg	fény J/cm ²	BPD mg/kg	fény J/cm ²
1	0,75	27	1,0	135
2	0,71	54	0,95	108
3	0,71	81	0,95	81
4	0,63	108	0,87	54
5	0,71	135	0,95	27
6	0	108	0	108

2. táblázat

	Súly (g)			
Egerek	Teljes test	Máj	Lép	Vesék
Drog + fény	22	1,105	0,077	0,172 (1)
	23	1,190	0,106	0,343
	24	1,208	0,094	0,380
	25	1,348	0,108	0,396
	21	0,958	0,078	0,310
Csak fény	22	1,125	0,05	0,371

3. táblázat

Egér szám	WBC 10 ⁶ /ml	RBC 10 ⁹ /ml	HB g/l	Hct	MCV fl	PLT 10 ⁶ /ml
1	4,0	7,11	122	0,352	49,5	328
2	14,7*	7,76	126	0,382	49,2	274
3	8,2	7,46	124	0,365	48,9	119
4	7,6	7,65	123	0,364	47,6	438
5**	2,9	6,47	108	0,316	48,8	134
6***	5,3	5,97	109	0,297	49,8	388

* A vérlemezke-aggregátum hozzájárulhat ehhez a számhoz.

** Néhány kettős térfogatú heparinnal hígított vér adatai.

*** Kontrollfény csupán

4. táblázat

% WBC			
Egér szám	Granulociták	Limfociták	Monociták
1	9	90	1
2	11	88	1
3	19	78	3
4	36	62	2
5	7	92	1
Normál (tartomány)	12–15	65–85	N/A

2. példa

Farmakokinetikai (PK) vizsgálatok

A fénykezelés alatt a plazmában levő BPD szintjének meghatározásához a következő vizsgálatot végezzük el. Tizennégy Balb/c egeret (22 ± 1 g súlyú) injektálunk 200 μ l PBS-ben levő liposzómás BPD-vel (20 mg/kg) egerenként. Vérmintákat szívpunkttúrával nyerünk 15 perc és 2 órás intervallumon belül az injektálás után. Néhány egér esetében a fénykezelés az injektálás után 15 perccel kezdődik meg. A plazmában levő BPD koncentrációját a fentiekben leírtak szerint határozzuk meg. Az eredményeket az 5. táblázatban és a 2. ábrán mutatjuk be.

Ezeket az adatokat a fénykezelés időzítése hatásának tesztelésére használjuk. Az első példában leírt, a kezelés után két órával, azaz az egyórás fénykezelés végén (108 J/cm²) a plazma BPD-szintje 2,44 μ g/ml. Ugyanebben a példában a fénykezelés elkezdésekor a plazma BPD-szintje 4 μ g/ml. A bőrfotoszenzitivitás ilyen alacsony szinteken levő további becsléséhez az egereket az injektálás után korábban vetettük fénykezelés alá, azaz 15 perc elteltével, amikor a plazma BPD-szintje 6,32 μ g/ml. Azonban a kezelés után 15 perc elteltével megkezdett fénykezelésnek alávetett állatok majdnem azonnal kényelmetlenül érzik magukat, és 30 perces kezelés (54 J/cm²) után elpusztulnak. Ez azt jelzi, hogy a körülbelül 6,5 μ g/ml-es induló plazma-BPD-szint és a körülbelül 50 J/cm² teljes testbesugárzás letális az egerekre. Azonban, ahogy az 1. példában bemutatjuk, ha a plazmaszintek alacsonyabbak, ugyan-ezen fény dózis egyértelműen ártalmatlan.

5. táblázat

Egér szám	BPD-dózis (mg/kg)	Az injekciózás után eltelt idő	Plazma- koncentráció (μ g/ml)
1	0,87	15 perc	6,32
2	0,83	20 perc	4,68
3	0,95	1 óra 23 perc	3,26
4	0,91	1 óra 24 perc	2,92
5	0,91	1 óra 32 perc	2,98
6	0,87	1 óra 38 perc	1,80
7	0,87	1 óra 42 perc	3,22
8	0,83	2 óra 5 perc	2,44

3. példa

A BPD transzkután aktiválása

Tizennégy egeret (22 ± 1 g súlyú) használunk ebben a vizsgálatban. Tizenkét egeret injektálunk 20 μ g (0,9 mg/kg) liposzómás BPD-vel (200 μ l-ben) és a fénykezelés előtt 1 órára sötétbe helyezzük őket. Az egereket egyenként 30 perces, 1 órás vagy másfél órás fénykezelésnek vetjük alá, ami sorrendben 54, 108 és 162 J/cm² bőrfelszíni fény dózist jelent. A fénykezelés után azonnal vérmintákat veszünk. A megfelelő időpontokban két BPD-vel injektált, azonban fénykezelésnek nem alávetett egértől vérmintákat nyerünk. Két további egeret tesztelünk az injektálás után egy órával.

Ezen vizsgálat célja a BPD-aktiváláshoz szükséges szövetbe való fény penetráció meghatározása. Azt feltételeztük, hogy a vérben levő BPD lényeges fotodegradációja a BPD lényeges aktiválását jelzi.

A plazma-BPD-koncentrációt ezután fluoreszcenciával határozzuk meg. A fénynek kitett és ki nem tett kontrollegerek plazmájában a változatlan BPD-koncentrációkat összehasonlítjuk. Az eredményeket (melyeket a 6. táblázatban és a 3. ábrán mutatunk be) azt jelzik, hogy az 54–162 J/cm² fény dózisok által fotodegradált BPD 36–76%-os. A fotodegradáció ilyen mértéke azt jelzi, hogy elegendő fény hatolt be a szövetekbe és fejtett ki aktiváló hatást, és így fotodegradálta a BPD-t a véredényekben. Fontos, hogy ezek a fénybesugárzási és a drog dózisok nem okoznak fényérzékenységet, ami megerősíti az 1. példában talált biztonságot. Továbbá nem figyelhető meg akut hatás a vérparaméterek esetében (7. táblázat) sem.

6. táblázat

Csoport	Fény dózis J/cm ²	Injektálás utáni idő	A plazmában levő BPD μ g/ml	Átlag $\pm$ SD	Fotodegradálódott BPD (%)
0 h–C	0	1 h	1,428 1,058	1,243 $\pm$ 0,262	–
30 perc–C	0	1½ h	0,618 1,242	0,930 $\pm$ 0,441	–
1 h–C	0	2 h	0,646 1,242	0,944 $\pm$ 0,421	–

6. táblázat (folytatás)

Csoport	Fénydózis J/cm ²	Injektálás utáni idő	A plazmában levő BPD µg/ml	Átlag±SD	Fotodegradálódott BPD (%)
1½ h–C	0	2½ h	0,724 0,656	0,690±0,048	–
30 perc	54	1½ h	0,566 0,626	0,596±0,042	36%
1 h	108	2 h	0,258 0,344	0,301±0,061	68%
1½ h	162	2½ h	0,191 0,145	0,168±0,033	76%

7. táblázat

BPD mg/kg	Fény J/cm ²	Az inj. utáni idő	Vérparaméterek					
			WBC 10 ⁶ /ml	RBC 10 ⁹ /ml	HB g/l	Hct	MCV fl	Pl.T 10 ⁶ /ml
0	0	–	4,5	6,58	113	0,326	49,5	417
0	0	–	2,3	7,53	127	0,370	49,1	399
0	0	–	6,0	7,61	132	0,378	49,7	498
0	0	–	7,3	7,64	133	0,382	50,0	613
0,87	0	1 h	5,5	7,61	124	0,368	48,4	608
0,87	0	1½ h	4,4	6,77	117	0,329	48,7	428
0,93	0	2 h	11,4	7,79	129	0,382	49,1	475
0,87	0	2½ h	3,9	7,68	129	0,372	48,5	447
0,95	54	1½ h	7,0	7,28	127	0,363	49,9	613
0,95	108	2 h	8,5	7,53	131	0,378	50,1	440
0,93	162	2½ h	4,9	7,17	116	0,353	49,2	506

Az ebben a példában kapott adatokat összehasonlítjuk a korábban publikált vizsgálatok [Photochem. Photobiol. (1991), 53:281–286] adataival, miután a fénydozimetriát újrászámoltuk ugyanazt a fotométert használva, mint amit ebben a vizsgálatban használtunk. A korábban publikált vizsgálatokban DBA/2 egereket (borotvált és depilált) injektáltak 4 mg/kg, és lokálisan 153 J/cm² széles spektrumú fénykezelésnek vetették alá (a fényintenzitás 170 mW/cm²) az injektálás után 3 órával. A 2. ábrából való extrapolálás maximális 2,987±312 (SD) µg/ml plazmakoncentrációt eredményezne a 3 óra esetében (egy 30 perces fénykezelés kezdete). Eredményként azonban nem figyelhető meg fénykezelés után azonnal bőrelváltozás. A fénykezelés utáni első 24 órában az egerek súlyos bőnekrózisos tüneteket mutattak, ami a 96. óráig fejlődött, és melyet egy gyógyulási periódus követett. Végül a sérülések begyógyultak, és a szőrzet újránőtt.

A jelen leírásban a fénykezelés kezdetén a plazma BPD-koncentrációja 3 µg/ml érték fölötti, és nem figyelhető meg bőrelváltozás sem azonnal, sem a fénykezelést követő kéthetes időszakban. A jelen és a korábbi vizsgálatok közötti különbség a következőket foglalja magában: 1. magasabb maximális plazmakoncentrációt a ma-

gasabb BPD-dózisnak köszönhetően (4 mg/kg, illetve 0,9 mg/kg), 2. az injektálás és a fénykezelés közötti hosszabb idő (3 óra, illetve 1 óra), ami több BPD-felhalmozódást tesz lehetővé a bőrben (a BPD nyilvánvalóan 5 óráig halmozódik fel a bőrben), és 3. a nagyobb fényintenzitás (170 mW/cm², illetve 30 mW/cm²). Az adatok azt sugallják, hogy ezeket a tényezőket figyelembe kell venni az egész test besugárzására vonatkozó terápiás lehetőség meghatározásánál.

4. példa

In vitro BPD-aktiválás egérvérben

A szövetekbe behatoló fény mennyiségének meghatározásához egérvérrel végzett in vitro vizsgálatokat hajtunk végre. Ugyanazt a fényforrást használjuk, így a fény spektruma is azonos. A fény dózisát úgy választjuk meg, hogy az in vivo kísérletek dózisaihoz hasonlítanak.

A frissen nyert heparinizált egérvérhez liposzómás BPD-t adunk az 1 µg/ml koncentráció eléréséhez, ezután 0,85 µl azonos mennyiségű vért osztatunk el 35 mm átmérőjű Petri-csészékben, melyeket fénykamrában helyezünk el és vörös fényel kezelünk. A Petri-csészéket a fénykamrában csupán alulról világítjuk

meg. A fény intenzitása 35 mW/cm^2 . Három különböző fénydózist használunk – ami 30 perces, 1 órás és másfél órás besugárzási időket von maga után – sorrendben 63, 126 és 189 J/cm^2 . A duplikát Petri-csészéket alufóliával letakarjuk. A besugárzást követően a vért azonnal összegyűjtjük a Petri-csészéből. Ezután a plazmát centrifugálással elkülönítjük. A kontroll-, nem besugárzott mintákat a fénnel kezelt mintáknak megfelelő időpontokban dolgozzuk fel.

A besugárzott és a fénnel nem kezelt vérből elkülönített plazmában levő BPD-koncentrációkat fluoreszcenciával határozzuk meg. Az eredményeket a 8. táblázat és a 4. ábra szemlélteti. A BPD körülbelül 51–83%-a lebomlik az alkalmazott fénydózis hatására.

Az in vitro BPD fotodegradáció mértékét az in vivo lebomlással hasonlítjuk össze, annak meghatározása céljából, hogy valójában mennyi fény hatol át a szövetekbe és éri el a véráramban levő BPD-t. Amikor a vizsgálatokban a fotodegradált BPD mennyiségeit a lebomlás százalékában fejezzük ki a fénnel nem kezelt plazmában jelen levő változatlan BPD-mennyiségekhez vi-

szonyítva, az in vitro és in vivo meghatározott százalékok viszonylag hasonlóak (9. táblázat, 5. ábra). Azonban, amikor a lebomlott BPD mennyiségeit μg lebomlott BPD/ml plazmaértékként fejezzük ki, nyilvánvalóvá válik, hogy a bőrfelszínre juttatott fénydózis körülbelül 65%-a in vivo valójában eléri a véredényekben levő BPD-t (9. táblázat, 6. ábra).

8. táblázat

Idő	Fénydózis (J/cm^2)	BPD-dózis ($\mu\text{g/ml}$)	Fotodegradált BPD (%)
0 óra	0	0,760	–
$\frac{1}{2}$ óra	0	0,806	–
$\frac{1}{2}$ óra	63	0,394	51
1 óra	0	0,810	–
1 óra	126	0,220	73
$1\frac{1}{2}$ óra	0	0,830	–
$1\frac{1}{2}$ óra	189	0,144	83

9. táblázat

In vitro			In vivo		
Fény (J/cm^2)	Fotodegradált (%)	Dózis ($\mu\text{g/ml}$)	Fény (J/cm^2)	Fotodegradált (%)	Dózis ($\mu\text{g/ml}$)
63	51	0,412	54	36	0,334
126	73	0,590	108	68	0,643(?)
189	83	0,686	162	76	0,522

A plazmában levő BPD fénykezelés alatti szintjének meghatározásához a következő vizsgálatot végezzük el.

A korábban elvégzett vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a vérben levő BPD aktiválásához terápiás lehetőség létezik az egész test besugárzása révén. Miután az egereket vörös fénnel kezeljük ($600\text{--}900 \text{ nm}$) egy órával a $0,9 \text{ mg/kg}$ BPD injektlása után, a $27\text{--}135 \text{ J/cm}^2$ fénydózisok közé eső tartományban (a fény intenzitása a bőr szintjén körülbelül 30 mW/cm^2), az egerek nem mutatnak semmilyen, a bőr fényérzékenységre utaló jelet a kezelés utáni két hétben. Továbbá nem találhatók toxicitásra utaló jelek sem a máj, a lép és a vesék esetében, sem a vérparaméterekben bekövetkező változások két héttel a kezelést követő vizsgálatkor. A plazma megközelítő szintje a fénykezelés alatt $2,5$ és $4 \mu\text{g/ml}$ érték között alakul.

A BPD legmagasabb plazmakoncentrációja (közvetlenül a beadás után $6,3 \mu\text{g/ml}$), valamint az 54 J/cm^2 fényintenzitás együttesen letális az egerekre. Az in vivo fénykezelés 36–76%-os BPD-fotodegradációt eredményez a vérben. Az egérvérben levő BPD in vitro fotodegradációjával való összehasonlítás azt jelzi, hogy a bőrfelszínre juttatott fénydózis 65%-a bejut a szövetekbe és eléri a véredényekben levő BPD-t. Ezen adatok korábban publikált vizsgálatok eredményeivel való

összehasonlítása azt jelzi, hogy a bőrfotoszenzitivitást a maximális plazmakoncentráció, az injektlással kapcsolatos fénykezelési idő és a fény intenzitása határozza meg.

5. példa

Kifejlett hím DBA/2 és Balb/c egereket injektlunk intravénásan, sorrendben P815 és L1210 sejtekkel, melyeket 1 órán keresztül (liposzómás) BPD-vel (100 ng/ml) előinkubáltunk. Az állatok injektlása előtt közvetlenül további $2 \mu\text{g}$ BPD-t juttatunk a sejteket tartalmazó injekcióstűkbe. Ez közvetlenül az injektlás után $1 \mu\text{g}$ BPD/ml egérplazma-koncentrációt eredményez (feltételezve, hogy az egér teljes vérmennyisége 2 ml). Egy egércsoportot (borotvált és depilált) azonnal vörös fénnel való kezelésnek vetünk alá ($600\text{--}900 \text{ nm}$) a fénykamrában, ami másfél óráig tart (162 J/cm^2); a másik csoportot kontrollként sötétben tartjuk.

A fénnel való kezelés után azonnal vérmintákat veszünk szívpunkttúrával halotán anesztézia alatt. A fénnel kezelt és a kontrollállatok plazmájában levő BPD-koncentrációkat fluoreszcenciával határozzuk meg. Az egérvérben levő klónenikus tumorsejtek számát a vérminták 10% szarvasmarhasérumot tartalmazó tenyésztőközegben való tenyésztésével határozzuk meg, határhígításos vizsgálati eljárást alkalmazva.

A kezelés után a kontroll- és a vizsgálati csoportból származó egereket két hétig figyeljük a bőrváltozások és az általános viselkedési változások észlelése céljából. Az eredményeket a 10. és 11. táblázatokban összegezzük.

10. táblázat
L1210 sejtekkel injektált Balb/c egerek
1 óra BPD-liposzómákkal

Kezelés	A plazmában levő BPD-koncentráció	
	ng/ml	%
Sötét kontroll	126,45	100
Fénynek kitett	52,23	41
Fotodegradált %		59

A túlélősejtek a vérben (3 egér/csoport átlaga):
Sötét kontroll: 234 L1210 sejt/2 ml vér/egér
Fénynek kitett: 21 L1210 sejt/2 ml vér/egér

11. táblázat
P815 sejtekkel injektált DBA/2 egerek

Kezelés	A plazmában levő BPD	
	ng/ml	%
Sötét kontroll	94,09	100
Fénynek kitett	58,19	62
Fotodegradált %		38

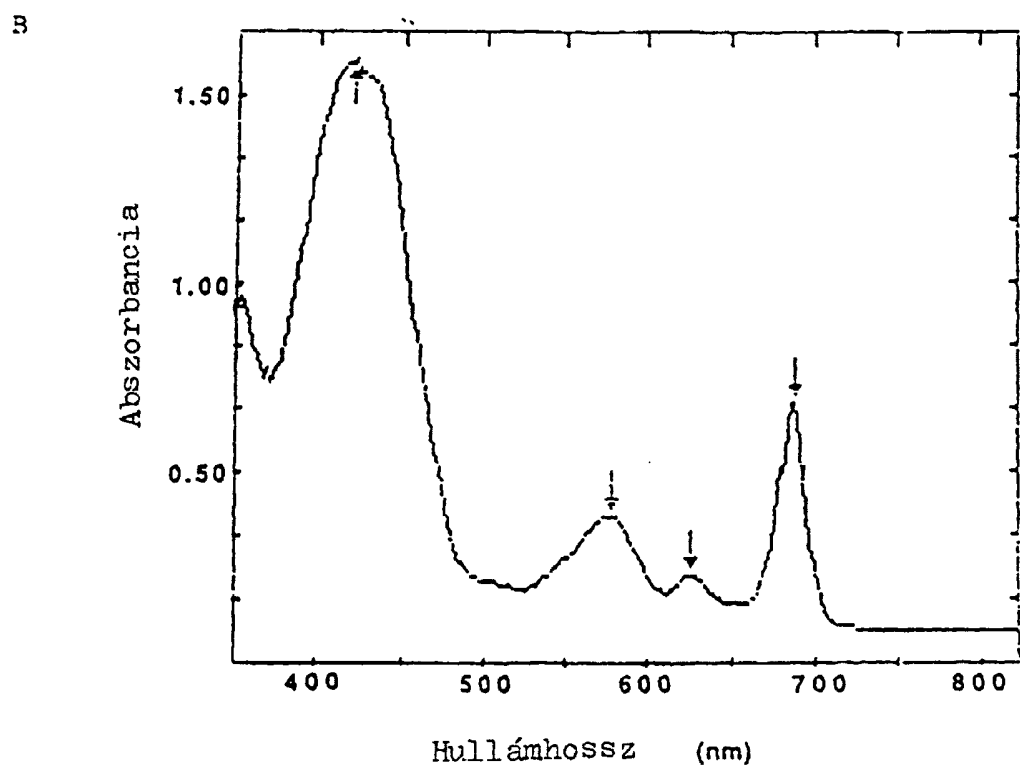
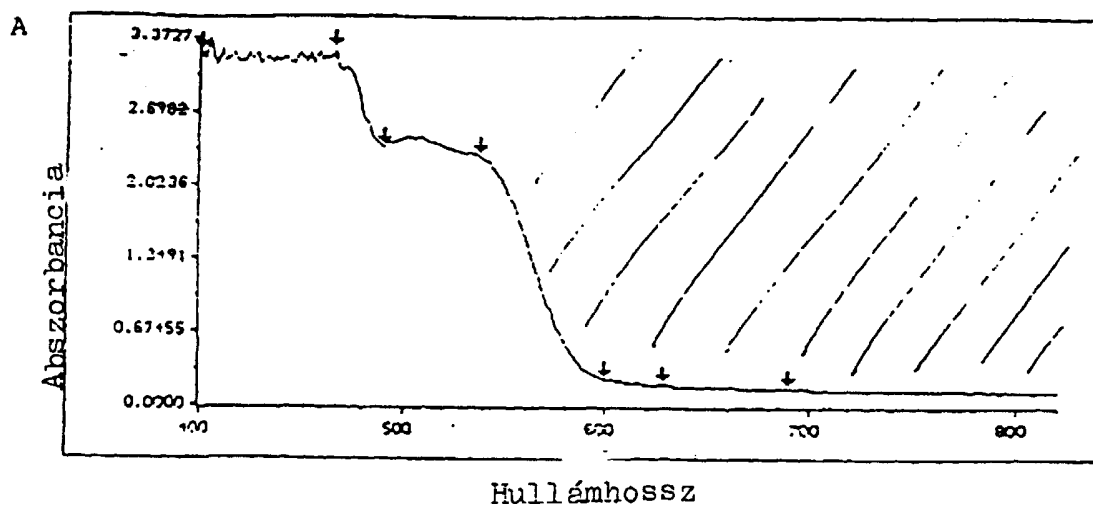
A túlélősejtek a vérben (3 egér/csoport átlaga):
Sötét kontroll: 50 P815 sejt/2 ml vér/egér
Fénynek kitett: 8 P815 sejt/2 ml vér/egér

A korábbi példákban bemutatott eredmények azt demonstrálják, hogy az egész test vörös fénnel való besugárzása a BPD-vel való injektálás után a vérben levő BPD aktiválását eredményezi. Eredményként a BPD egy része fotodegradálódott, és ugyanakkor a BPD-vel előkezelt tumorsejtek nagy száma megsemmisült. A kezelés után nem figyelhető meg sem a bőr fotoszenzitivitásában, sem az állatok viselkedésében változás (a maximális megfigyelési időszak két hét). Az eredmények azt jelzik, hogy létezik egy olyan terápiás lehetőség, mellyel a vér eredetű fertőző anyagok terápiás szabályozása befolyásolható a véredények és a bőr károsítása nélkül.

A találmányt közvetlen leírással és példákkal szemléltettük. Ahogy fent említettük, a példákat csupán példának szántuk és nem a találmány korlátozása céljából adtuk meg. Továbbá a tudomány e területén képzett szakember számára a specifikációk és igénypontok áttekintése után észrevehető, hogy a találmány igénypontjainak szempontjaira vannak megfelelő alternatívák. A feltalálók ezen megfelelő alternatívákat a találmány igénypontjainak ésszerű körébe tartozónak tartják.

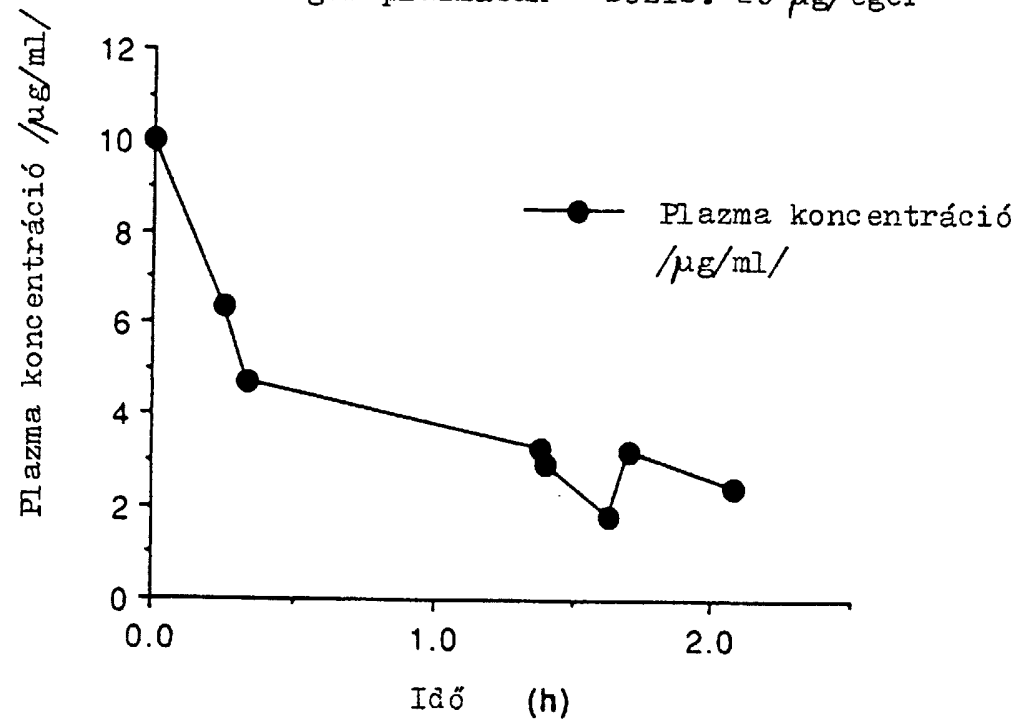
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fényérzékenyítő szer alkalmazása egy élőlény véráramában levő célsejtek transzkután besugárzással történő elpusztítására vagy gyengítésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a célsejtek olyan aktivált sejtek, amelyek a nem célsejtekhez képest gyors osztódásra képesek; vagy vírust, parazitát vagy mikroorganizmust tartalmaznak.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fényérzékenyítő szer egy klorin, bakterioklorin, ftalocianin, porfirin, benzoporfirin, purpurin vagy merocianin.
4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a klorin klorin e6, a porfirin BPD vagy nátrium-porfimer és/vagy a célsejtek leukémiás sejtek.
5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a BPD BPD-MA.
6. A fényérzékenyítő szer prodrugjának alkalmazása egy élőlény véráramában levő célsejtek transzkután besugárzással történő elpusztítására vagy gyengítésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.
7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a prodrug δ -aminolevulinsav.
8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az élőlény egy emlős.
9. A 8. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az emlős egy ember.
10. Az előző igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a fényérzékenyítő szer koncentrációja a véráramban 0,01–10 $\mu\text{g/ml}$.
11. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a fényérzékenyítő szer koncentrációja a véráramban 0,01–4 $\mu\text{g/ml}$.
12. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a fényérzékenyítő szer koncentrációja a véráramban 0,01–2 $\mu\text{g/ml}$.
13. Az 1. vagy a 3. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a célsejtek leukémiás sejtek.



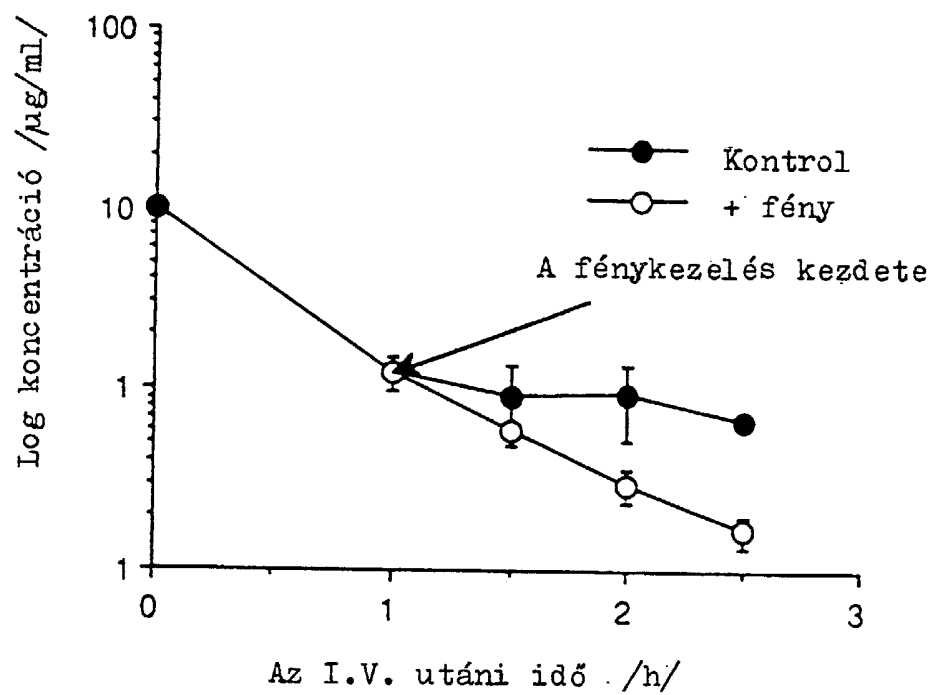
1. ábra

Liposzómás BPD az egér plazmában - Dózis: 20 $\mu\text{g}/\text{egér}$



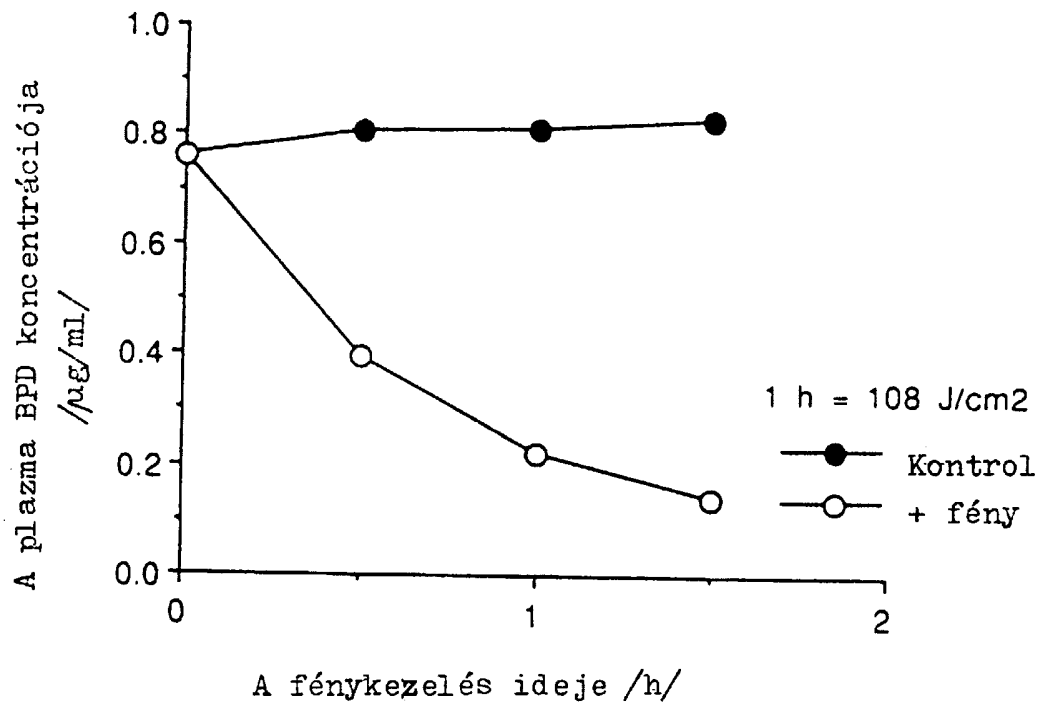
2. ábra

A BPD in vivo fotoinaktiválása - egér model



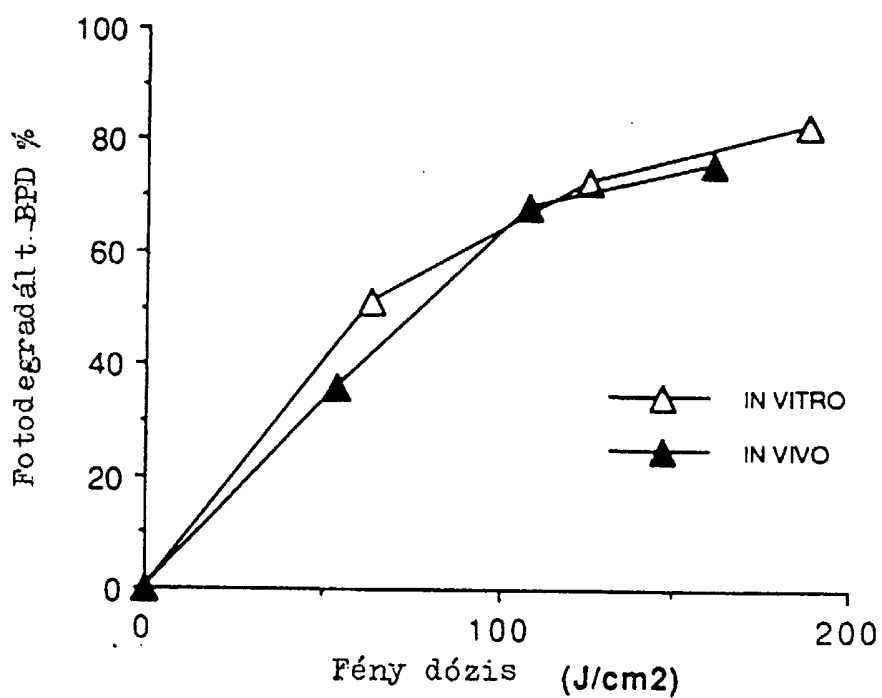
3. ábra

Az egér vérben levő BPD in vitro fotodegradációja



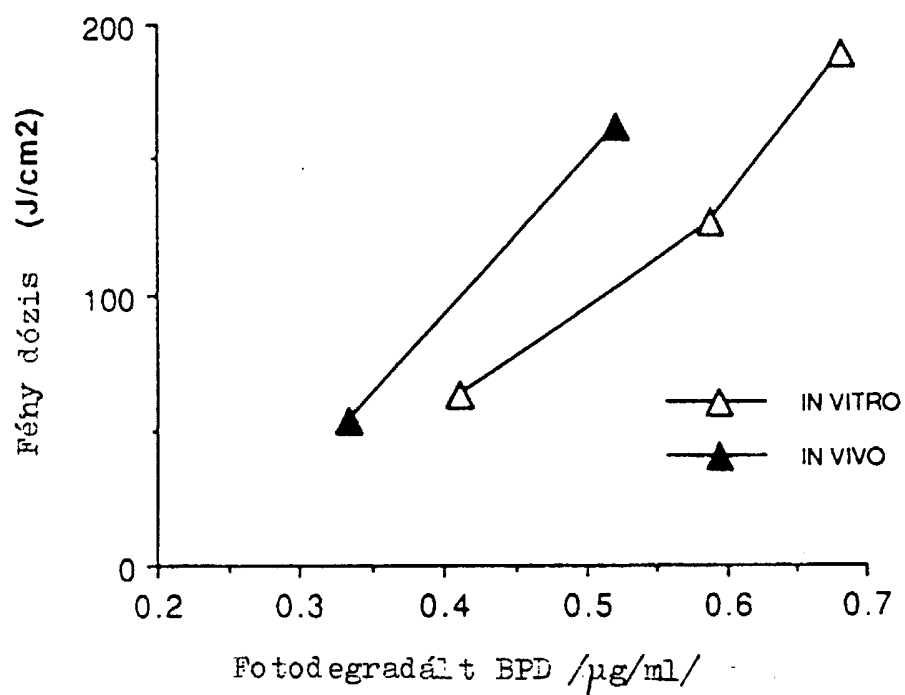
4. ábra

- Az egér vérben levő BPD fotodegradációja



5. ábra

Egér vérben levő BPD fotodegradációja



6. ábra