

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3997**

(51) Int.Cl.⁵: **C12P 17/10,
A61K 31/33,
A61K 31/085**

(21) Paraiškos numeris: **IP1583**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 10**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 06 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 89/05599, 1990 12 08 SU 4895765, 1991 06 11**

(31,32,33) Prioritetas: **285151, 1988 12 12, US 335007, 1989 04 07, US 351331,
1989 05 03, US**

(72) Išradėjas:
**Blaik Phillip Halling, US
Debra Ann Witkowski, US**

(73) Patent savininkas:
FMC CORPORATION, 1735 Market Street, Philadelphia, Pennsylvania 19103, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Protoporfirinų gavimo būdas ir jų panaudojimas

(57) Referatas:

Aprašyti specifinis fermentinio protoporfirinogeno virsmo protoporfirinu inhibitorius ir farmacinė kompozicija pieno liaukos naviko ląstelių numarinimui, apšvitinant tas ląsteles šviesa, kuri suaktyvina ten dalyvaujantį tetraepirilą, patobulinti ta prasme, kad minėtas ląsteles veikia junginiu, slopinančiu fermentinį protoporfirinogeno virsmą protoporfirinu IX, veikiant nurodytose ląstelėse protoporfirinogenoksidazei ir tuo pačiu iššaukiant protoporfirino IX susidarymą jose. Be to, aprašytas protoporfirino IX gavimo būdas, auginant eukariotinius mikroorganizmus algae, dalyvaujant protoporfirinogenoksidazės inhibitoriui.

Šis išradimas yra susijęs su specifiniu fermentinio protoporfirinogeno virsmo protoporfirinu IX, veikiant ląstelėse esančiai protoporfirinogenoksidazei, inhibitoriumi ir jo panaudojimu farmacinėse kompozicijose, skirtose pieno liaukos naviko ląstelių suardymui, diagnozavimui ir lokalizavimui, bei protoporfirino IX gavimo būdu.

Gerai žinomas būdas, kai, norint iššaukti ląstelių irimą, į pieno liaukos naviką įvedamas hematoporfirino darinys arba mišinys porfirinų, kurie taip pat yra hematoporfirino dariniai, pavyzdžiui, preparatas "Photofrin II", po to veikiant tam tikro bangos ilgio šviesos spinduliais. Tokiam fotodinaminės terapijos metodui skiriama serija straipsnių, sudarančių specialų žurnalo Photochemistry and Photobiology, 1987, 46 t., Nr.5 (toliau sutr. P&P 46-5) leidinį. Straipsniuose nurodoma, kad fotodinaminė terapija plačiai taikoma, gydant įvairius vėžinius susirgimus (tame skaičiuje bronchų, šlapimo pūslės, stemplės, plaučių, odos, galvos organų, kaklo, smegenų, storosios žarnos, o t.p. akies vidaus ir ginekologinius vėžinius susirgimus). Tvirtinama, kad minėta porfirininė fotosensibilizacija yra lydimą biocheminių efektų, kaip skersinių proteino ryšių membranose susidarymas, lipidų peroksidinimas, lizosomų ir mitochondrijų apvalkalų skaidymai, eilės fermentų aktyvumo sumažėjimas ir porfirino įsisavinimo ląstelėmis padidėjimas (P&P 46-5, 695 psl.). Porfirininį preparatą, kaip įprasta, įveda injekcijų keliu (pvz., į veną ar pilvo ertmę); tipinė dozė - 2 mg preparato "Photofrin" vienam kūno masės kilogramui.

Be to, porfirininį preparatą galima įjungti į liposomą ir įvesti injekcijos būdu (pvz., į pilvo ertmę), kaip tai nurodyta straipsnyje Spikes ir kt. "Fotodinaminis porfirinų elgesys modelinėse audinių ląstelių ir navikinėse sistemose" (Photodynamic behavior of Porphyrins

in *Moda Cell, Tissue and Tumour Systems*) rinkinyje "Navikų ir kitų susirgimų fotodinaminė terapija (Photodynamic Therapy of Tumour and others Diseases), redaguotame Jori ir Perria: Paduja, leid. Libreria Pogretto, 1985, psl. 45-53, o t.p. ir aukščiau paminėtame specialiaame leidinyje.

Specialioje literatūroje kalbama apie tai, kad įvedus protoporfiriną į tokias ląsteles, kaip, pvz., žmogaus kraujo eritrocitai arba leukemija sergančių pelių ląstelės, pastebimas ryškus fotosensibilizacijos efektas; žiūr.: Dabbleman ir kt. "Biochimica et Biophysica Acta, 1978, 511 t., 141-151 psl.; Kessel, *Cancer Research*, 1982, 42 t., Nr.5, 1703-1706 psl. Keselio straipsnyje tvirtinama, kad iš visų išbandytų fotosensibilizuojančių reagentų protoporfirinas - pats aktyviausias. Tačiau kai Kesselis ir kiti tyrinėtojai, pvz., Berenbaumas su bendradarbiais (žiūr.: *Br.C. Cancer*, 1982, 45 t., 571-581 psl.) leido porfiriną gyvuliams, pastebimo protoporfirino kiekio navikuose neaptiko, o tai liudija, kad vykstant kraujotakai, įvestas panašiu būdu į organizmą protoporfirinas gali būti greitai išneštas.

Aktyvusis junginys, skirtas naudoti fotodinaminėje terapijoje arba žinomuose navikų diagnozavimo ir lokalizavimo metoduose, pagal vieną iš šio išradimo aspektų yra ne porfirinas arba ne tik porfirinas.

Skirtingai nuo paprasto porfirino, duotasis junginys minėtose ląstelėse duoda impulsą fermentinei protoporfirinogeno hematogenezei, tuo pačiu sužadindamas endogeninio protoporfirino IX susidarymą ląstelėse. Autoriai nustatė, kad tokie reagentai, kaip kai kurie herbicidiniai junginiai, stabdantys fermentinį porfirinogenų perėjimą į chlorofilą augalų ląstelėse, taip pat stabdo ir fermentinį porfirinogeno pasikeitimą pieno

liaukos ląstelių struktūroje. Autoriai mano: minėtas šių reagentų slopinantis poveikis, tikriausiai, turi įtakos ir protoporfirinogeno virsmui į protoporfiriną IX, veikiant fermentui (protoporfirinogenoksidazė, EC 1.2.3.4.) tokiu būdu, kai protoporfirinogenas nebevirsta protoporfirinu IX normaliu keliu, o vietoj to oksidinasi ląstelių viduje, (pvz., plazmoje) neįprastu fermentiniu procesu (pvz., organelos apvalkalėlyje), ko pasekoje protoporfirinas IX kaupiasi tose srityse, kur jis neprieinamas normaliam virsmui į hemą; veikiant ląsteles šviesa, susikaupęs tokiu būdu protoporfirinas IX sukelia ląstelių irimo efektą, panašų į tą, kuris buvo stebimas aukščiau aprašytos fotodinaminės terapijos atveju.

Atitinkantys šiam išradimui aktyvūs junginiai, slopinantys fermentus, yra specifiniai protoporfirinogenoksidazės inhibitoriai ta prasme, kad jie funkcionuoja ne kaip paprasti fermentų nuodai, panašiai kaip reagentai, iššaukiantys denatūraciją arba tarpgrandinių jungčių susidarymą (pvz., kaip reagentai sulfihidrido pagrindu); jie nėra visų pirma tokiais veikiančiais į oksidavimo sąlygas preparatais, kaip elektronų akceptorai ir, vadinasi, aktyvūs junginiai, atitinkantys šiam išradimui, turi neigiamesnį redoks-potencialą, negu -500 mV ir dar neigiamesnį, būtent, lygų -800 mV, išmatuotą, pvz., tinkamame duotam junginiui tirpiklyje įprastu metodu: ciklinės voltametrijos metodu arba poliarografijos metodu). Vertinga tai, kad aktyvus junginys nėra tetrapirolas, ir kad jo rodiklis I_{50} protoporfirinogen-oksidadei yra mažiau, nei 1 μM , pvz., mažiau, nei 0,3 μM ; būtent, I_{50} apytikriai lygus 0,1, 0,03 ar 0,01 μM ar dar mažiau.

Yra tinkamas toks fermentą slopinantis aktyvus junginys, kuris pasižymi padidintu pajėgumu suardyti augalinių preparatų plazmalemą (plasmalemma). Vienas iš tokio

pajėgumo tyrimo metodų aprašytas Holingo ir Piterso straipsnyje "Išplovimo eksperimentas" Plant Physiology, 1987, 84 t., 1114-5 psl. Pagal šį tyrimą (smulkiau jis aprašytas A priede) tinkamiausi reagentai rodo bent 50% bendrą išplovimą, esant apdirbimo lygiui 100 μ M, geriau esant apdirbimo lygiui 1 μ M ir mažiau, pvz., 100 nM. Labai aktyvių preparatų, kaip 1-(4-chlor-2-fluor-5-propargiloksifenil)-3-metil-4-difluormetil- Δ^2 -1,2,4-triazolinas-5 arba laktofenas (žiūr. žemiau), bendras išplovimo laipsnis viršyja 90%, koncentracija - 100 nM.

Kita metodika, nustatanti preparato pajėgumą suskaldyti augalinės medžiagos plazmolemą, yra vadinama "Pažaliavimu, sukkelto apšvietimu, slopinimo tyrimai", smulkiai aprašyta žemiau Priede B. Pagal tą metodiką nustato preparato pajėgumą nuslopinti pažaliavimą išblyškusių tamsoje mikroorganizmo kultūrų Clamydomonas reinhardtii (mikroorganizmų algae tipas, kuris auga tamsoje, nesudarydamas chlorofilo). Turima omenyje, kad masė algae išbala, nes joje yra šviežios, nepažaliavę ląstelės, bet šviesoje vėl suformuoja chlorofilą. Daugelis tinkamų aktyvių junginių, naudojamų pagal šį išradimą, pajėgūs nuslopinti apšvitinimo sukeltą pažaliavimą bent jau 50%, esant naudojamų junginio koncentracijai 10^{-5} M, dar geriau 10^{-6} M ir mažiau, pvz., 10^{-7} M. Be to, tas junginys gali būti toks, kuris nurodyto tyrimo eigoje sudaro išskylantį ir paviršių produktą, kurio absorbcijos maksimumas yra ties 405 nm, o tai viršyja maksimumą chlorofilui, kuris duotoje sistemoje yra 669 nm, pvz., išskylantis produktas rodo prie 405 nm maksimumą, kuris 2, 3 ar 4 kartus viršyja maksimumą prie 668 nm.

Tarp fermentus slopinančių aktyvių junginių, kuriuos galima panaudoti šio išradimo įgyvendinimui, yra kelių tipų (A-D) herbicidai.

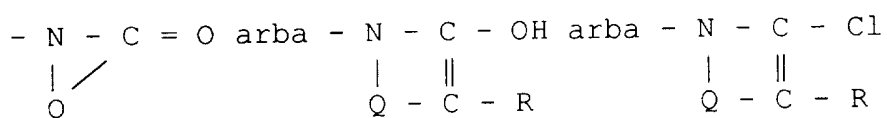
A. Aril-heterocikliniai herbicidai, kurių bendra formulė:

Ph - NHet,

5

kur Ph - pakeistas fenilas, geriau 2,4-dipakeistas fenilas, dar geriau 2,4,5-tripakeistas fenilas, o NHet - 5 ar 6-naris heterociklinis žiedas (su 1-4 azoto atomais žiede), kurio formulė:

10



15 kur Q reiškia heterociklinio žiedo uždarančią grupę, o

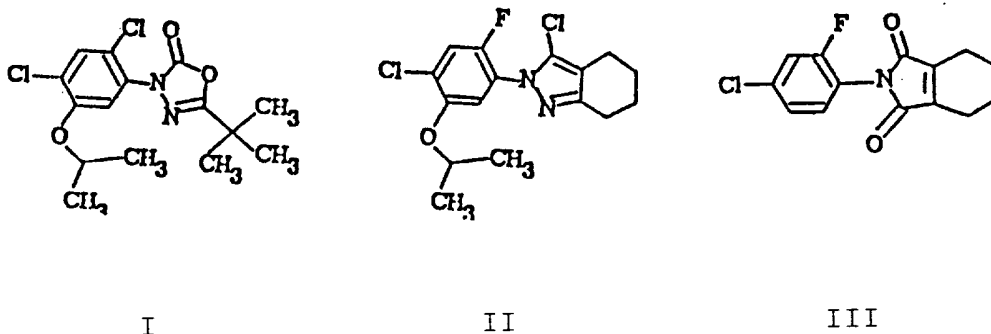
R - vandenilis arba jį pakeičianti grupė.

20

Ši junginių klasė apima ir tokius preparatus, kurie Wakabajasi (Wakabayashi) ir kt. straipsnyje (žiūr. J. Pesticide Sci., 1986, 11 t., 635-460 psl.) apibrėžti kaip herbicidų klasė ciklinių imidų pagrindu, ir šio straipsnio 1 psl. pateikti tokie junginiai:

25

30



35

I junginys - tai herbicidas ariloksidiazolo pagrindu, būtent 2-tret.-butil-4-(2,4-dichlor-5-izopropoksifenil)- Δ^2 -1,3,4-oksidadiazolin-5-onas. Kiti 2-alkil-4-(2,4,5-tripakeistas fenil)- Δ^2 -1,3,4-oksidadiazolin-5-

onai, kuriuos galima panaudoti pagal šį išradimą, charakterizuoti, pvz., JAV patentuose Nr.Nr. 3 385 862, 3 836 539, 3 876 413.

- 5 II junginys - tai herbicidas aril-tetrahidroindazolo pagrindu, būtent 3-chlor-2-(4-chlor-2-fluor-5-izopropoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-indazolas.
- 10 III, IV ir V junginiai - tai herbicidai aril-tetrahidroftalimido pagrindu. Kiti aril-tetrahidroftalimidai, kuriuos galima panaudoti pagal šį išradimą, charakterizuojami, pvz., JAV patente Nr. 4 439 229 (nuo 4 psl. 25 eilutės iki 5 psl. 20 eilutės).
- 15 Kiti tinkami Ph - NHet tipo herbicidai yra:
- aril-trialinonai, kurie aprašyti JAV patentuose Nr.Nr. 4 318 731, 4 398 943, 4 404 019, 4 702 945, 4 705 557, 4 702 763, 4 761 174, o taip pat tarptautinėse paraiškose Nr.Nr. WO 85/01637, WO 85/04307, WO 87/00730, WO 87/03782, WO 86/04481 ir WO 88/01133;
- 20 aril-tetrazolinonai, kurie aprašyti JAV patente Nr. 4 734 124, o t.p. tarptautinėse paraiškose Nr.Nr. WO 85/01939 ir WO 87/03873;
- 25 aril-triazindionai, kurie aprašyti JAV patentuose Nr.Nr. 4 755 217 ir 4 766 233, o t.p. tarptautinėje paraiškoje WO 86/00072;
- 30 aril-hidantoinai, kurie aprašyti JAV patente Nr. 4 427 438;
- aril-urazolai, kurie aprašyti JAV patente Nr. 4 452 981;
- 35 aril-heksahidropiridazinai, kurie aprašyti JAV patente Nr. 4 619 687.

B. Aril-heterocikliniai uretanai, kurie aprašyti JAV patente Nr. 4 521 242.

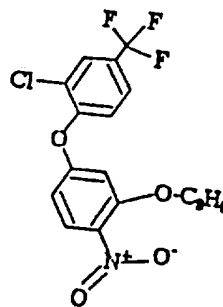
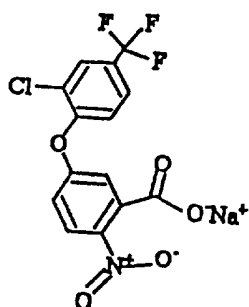
5 C. Herbicidai paprasto fenilo eterio pagrindu iš tų, kurie turi para-halogen- arba para-nitro-fenoksifenilinę struktūrą, būtent, tokie kaip šie prekyboje esantys preparatai:

5-(2-chloro-4-(trifluorometil) fenoksi)-2-nitro-N-metanesulfonilbenzamidai (fomesafen) metil 5-(2,4-dichlorofenoksi)-2-nitrobenzoatas (bifenox)

natrio 5-(2-chloro-4-(trifluorometil) fenoksi)-2-nitrobenzoatas (acifluorfen) 2-chlor-1-(3-etoxy-4-nitrofenoksi)-4-trifluorometil-benzenas (oxyfluorfen)

10

15



20 Kiti tinkami ir prekyboje esantys herbicidai paprastų difenilinių eterių pagrindu yra šie junginiai:

"Laktofen": 1-(karboetoksi)-etil-5-(2-chlor-4-trifluorometil-fenoksi)-2-nitrobenzoatas;

25

"Fliuorogliukofen": (karboetoksi)-metil-5-(2-chlor-4-trifluormetilfenoksi)-2-nitrobenzoatas;

30 "Fromesofen": 5-[2-chlor-4-(trifluormetil)-fenoksi]-N-metilsulfonil-2-nitrobenzamidai;

"Chloronitrofen": 2,4,6-trichlor-(4-nitrofenoksi)-benzenas;

"Chlorodifen": 2-nitro-1-(4-nitrofenoksi)-4-trifluormetil-benzolas;

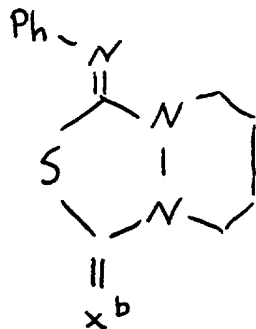
"Nitrofen": 2,4-dichlor-1-(4-nitrofenoksi)-benzenas;

"Chlometoksifen": 4-(2,4-dichlorfenoksi)-2-metoksi-1-nitrobenzenas.

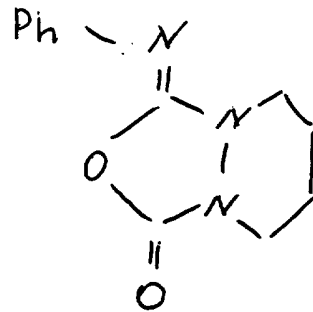
Be to, dar vienu tinkamu paprastu difenilo eteriu yra oksim-O-acetatas 5-(2-chlor-4-trifluormetilfenoksi)-2-nitroacetofenonas.

D. Herbicidai aril-pirazolų pagrindu, kurie aprašyti JAV patentuose Nr.Nr. 4 563 210, 4 496 390 ir 4 459 150, o taip pat Vokietijos paraiškoje Nr. 3 530 327 AI.

E. Junginys, kurio formulė:



arba



kur x - deguonis arba siera, o Ph reikšmė tokia, kokia buvo nurodyta aukščiau; šie junginiai aprašyti Europos patento paraiškoje Nr. 273417, o t.p. kataloge Derwent Abstracts (žiūr. Nr. 87-040449).

Aktyvų junginį galima vartoti kaip sterilią kompoziciją, kuri yra reagentas, ištirpintas arba disper-

guotas farmacijoje naudojamoje terpėje, pvz., vandeniame izotoniniame tirpale, tokiame kaip sūrus vanduo (0,9% NaCl) arba pasūdytas Dulbecco buferinis tirpalas, kurio koncentracija yra 2,5 mg/ml eilės. Arba aktyvus junginys gali būti įjungtas į tokią liposominę sistemą, kurią galima gauti fosfolipidinėje terpėje, kaip tai aprašyta 1659-1660 psl. žinyne Remington's Pharmaceutical Science, 17-me firmos "Mack Publishing Co" leidinyje. Pavyzdžiui, analogiškai receptūrai, kurią aprašė Jori su bendr. (žiūr.: Br.J. Cancer, 1983, 48 t., 307 psl.), galima ištirpinti 51,6 mg dipalmitoilidifosfatidilcholino 10-je ml 1 mM reagento tirpalo mišinyje chloroformo su metilo spiritu (tūriniu santykiu 9:1) su tolimesniu tirpiklio pašalinimu (prieš tai kruopščiai sumaišius) 30°C temperatūroje, vakuume. Rezultate gaunama kieta medžiaga, kurią vėl galima pervesti į suspenduotą būklę 10-je ml 0,01 M fosfatinio buferinio tirpalo, turinčio 150 mM NaCl, kurio pH=7,4 su tolimesniu drumsto tirpalo apdorojimu ultragarsu 50°C temperatūroje 30 min.

Fermentus slopinančius reagentus, galima sujungti ar surišti su tinkamais monokloniniais antikūnais, specifiskai veikiančiais auglių (MABs), panaudojant surišimo techniką, gerai žinomą šios srities specialistams, ir reagentas, slopinantis fermentus, pristatomas į konkretų auglio pažeistą plotelį.

Pageidautina naudoti tokius fermentus slopinančius reagentus, kaip tirpias vandeny druskas arba rūgštinius junginius, sudarančius tirpias vandeny natrio ar kalio druskas, t.y. tokius, kaip sulfamidas, aprašytas Tarptautinėse paraiškose WO 87/037873 (pvz., reagentas 6c žemiau pateiktame 6 pavyzdyje) o t.p. WO 85/001939, WO 87/037873, arba jo vandeny tirpi druska, arba atitinkama karboksi rūgštis arba jos vandeny tirpi druska, pvz., natrio druska, žinoma "Acifluorfenio" pavadinimu.

Fermentus slopinančius aktyvius junginius, pagal šią išradimą, galima įjungti į įprastus farmacijos preparatus, tokius kaip tabletės (pvz., presuotos tabletės, ant kurių užtepta cukraus pasta ir/arba sirupas), žvakutės, kapsulės (pvz., kietos želatininės kapsulės), suspensijos, tirpalai, milteliai ar ampulės. Tokiuose preparatuose aktyvusis komponentas gali būti mišinyje su farmacijoje vartojamais kietais ar skystais nešikliais, kurie esant pageidavimui, gali būti maisto produktai. Pavyzdžiui, tai gali būti kietas produktas, kaip kukurūzų krakmolas arba skystas, kaip vanduo, arba maistinis ar mineralinis aliejus, arba tirpiklis: dimetilsulfoksidas ir pan. Galima vartoti fermentus slopinančių aktyvių komponentų mišinius, pvz., aktyvaus komponento 6c, nurodyto 6 pavyzdyje, mišinį su "Acifluorfeniu" apytikriai vienodais kiekiais. Skiriamą dozę galima nustatyti įprastu eksperimentiniu keliu, gerai žinomu duotos srities specialistams, pagal eksperimento, aprašyto preparatui "Fotofrin" (Photophrin), metodiką Daferti straipsnyje "Piktybinių auglių fotodinaminė terapija (FDT)", žiūr.: CRC Critical Reviews leidinyje Geneology Hematology, 1984, 2 t., 2 leid., 83-116 psl.

Išradimą iliustruoja šie pavyzdžiai:

1 pavyzdys

HeLa ląstelės (linija žmogaus navikinių ląstelių, paprastai naudojamų navikų tyrimams, išvesta iš kultūrų banko American Type Culture Collection), esančios logaritminio augimo fazėje (išaugintos 37°C temperatūroje per 5 paras 1 l talpos falkoninėse kolbose audinių kultūroms), buvo išplautos buferiniame fosfatiname druskos tirpale (BFDT). Vėliau prie jų pridėjo 0,25% tripsino tirpalo 2 ml BFDT. Po kelių minučių preparatą atsargiai ištraukė iš kolbos ir patalpino į stiklinę su

100 ml 25 mM HEPES tirpalo minimalioje pagrindinėje terpėje (MEM), pridėjus prie MEM 10% (svorio dalys) neaktyvuotos veršelių plazmos, 1,1 ml 200 mM glutamino tirpalo 0,85% druskos tirpale, o t.p. 11.000 vienetų penicilino/11.000 kg streptomicino.

Gautą ląstelinę kultūrą, vėl pervestą į suspenduotą būklę, porcijomis po 5 ml patalpino į 50 ml talpos fal-konines kolbas audinių kultūroms ir (išskyrus kontro-linį bandinį), sumaišė su aktyviu junginiu. Nurodytas porcijas 3 paras išlaikė tamsoje, 37°C temperatūroje. Po to audinių kultūras ištraukė ir ekstrahavo žalioje šviesoje tokiu būdu:

Nuo kolbos dugno ląsteles pakėlė, pridėdami 0,8 ml 0,25% tripsino tirpalo BFDT. Po 1 val. trukusio inkubacinio auginimo tamsoje, ląsteles ir terpę išėmė iš kolbos, patalpino į apvaliadugnį centrifugavimo mėgin-tuvėlį ir, norėdami suardyti ląsteles ir suteikti gali-mybę ekstrahuoti, atliko du užšaldymo - atšildymo cik-lus. Ląstelių suspensijos tyrimai po šios ardančios operacijos nerodė nesuardytų ląstelių.

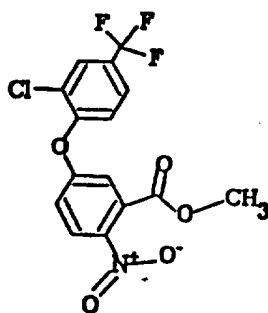
Po to į kiekvieną mėgintuvėlį įpylė po 10 ml šarminio acetono tirpalo (90% acetono: 10% 0,1 N NH_4OH) ir cent-rifugavo, norėdami pašalinti proteina ir ląstelių gaba-lėlius. Į iškilusią paviršiuje medžiagą pridėjo po 50 ml vandens, o po to - po 0,5 ml sotaus vandeninio NaCl tirpalo. pH reguliavo iki 6,8, įlašindami lašais 2 M KH_2PO_4 tirpalo. Po to užpildė C8 Baker Prop. tipo kolo-nėlę acetono - vandeniniu ekstraktu. Kolonėlę išdžio-vino ir kiekvieną plovė 2 ml vandens. Tetraapirolus išplovė $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ mišiniu santykiu 90:10; mišinio tūris 2x1,5 ml. Po to buvo atlikta ekstraktų kiekybinė ana-lizė spektrofлуorimetru.

Nagrinėjame eksperimente buvo panaudoti šie aktyvūs junginiai:

- 5 A. 5 - aminolevulino rūgštis, žinoma kaip tarpinis produktas tetrapirolo sintezėje.

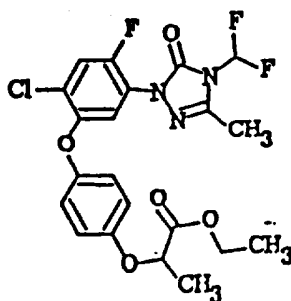
Aktyvus junginys A buvo naudotas kaip sterilizuotas filtravimu 250 mM vandeninis tirpalas (pH=6,5). Aktyvūs junginiai B, C, D ir E (žiūr. formules žemiau) buvo naudoti kaip 50 mM tirpalai acetone. Į kontrolinį bandinį taip pat buvo pridėta 0,2% (tūrio dalys) acetono. Į audinių kultūras įvedinėjo tokius

15 B. Herbicidas, kurio formulė:



25

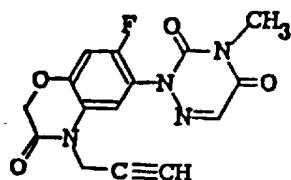
C. Herbicidas, kurio formulė:



35

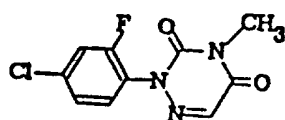
D. Herbicidas, kurio formulė:

5



10 E. Herbicidas, kurio formulė:

15



20 kiekius nurodytų aktyvių komponentų, kad būtų gautos koncentracijos, nurodytos žemiau 1 lentelėje. Tokioje pat lentelėje pateikti ir gauto protoporfirino IX tetrapirolo (Proto IX) kiekiai.

1 lentelė

25 Tetrapirolo susikaupimas apdorotose HeLa ląstelėse

Aktyvus komponentas	Aktyvaus agento koncentracija, μM	Fluorescentinė emisija 400/630 s	Proto IX kiekis, pikomoliai
A	5 000	41 842	4.2
B	100	12 921	1.3
C	100	33 477	3.5
D	100	10 551	1.1
E	100	8 967	0.9
Kontrolinis bandinys		2 795	0.3

2 pavyzdys

HeLa ląsteles logaritminėje augimo fazėje augino 6 pa-
 ras šešiose 1 l talpos falkoninėse kolbose audinių kul-
 5 tūroms 37°C temperatūroje, po to išplovė buferiniu fos-
 fatiniu druskos tirpalu (BFDT). Vėliau prie jų pridėjo
 0,25%-nio tripsino tirpalo buferyje (BFDT) ir po kele-
 tos minučių ląsteles atsargiai ištraukė ir patalpino į
 stiklinę su 110 ml 25 mM HEPES tirpalo minimalioje
 10 pagrindinėje terpėje (MEM), pridėjus 10% (tūrio dalys)
 neaktyvuotos veršelių plazmos, 1,1 ml 200 mM gliutamino
 tirpalo 0,85%-niame druskos tirpale, o t.p. 11.000 vie-
 netų penicilino/11.000 µg streptomicino.

15 Gautą ląstelinę kultūrą, vėl pervestą į suspenduotą
 būklę, porcijomis po 5 ml patalpino į 50 ml talpos
 falkonines kolbas audinių kultūroms su herbicidu arba
 be jo; inkubacinis apdorojimas tamsoje 37°C tempera-
 tūroje vyko 4 paras, be to, analogiškai 1 pavyzdžiui,
 20 herbicidą pridėjo praskiestame acetono tirpale. Acetona
 taip pat pylė ir į kontrolinius bandinius, kad acetono
 koncentracija juose būtų 0,2% (tūrio dalys). Herbicido
 kiekis buvo toks, kad būtų gaunamos koncentracijos, nu-
 rodytos žemiau 2 lentelėje.

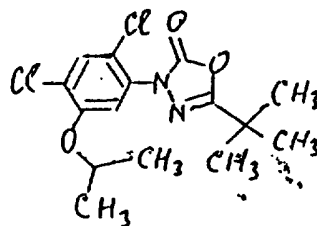
25

Apdorojimui naudojo tokius aktyvius komponentus:

B. Kaip 1 pavyzdyje.

C. Kaip 1 pavyzdyje.

30 F. Herbicidas, kurio formulė:



35

Ekstrahavimą vykdė tokiu būdu. Terpę iš kiekvienos kolbos patalpino į stiklinius apvaliadugnius mėgintuvėlius, be to, ląsteles, prilipusias prie falkoninių kolbų dugnų, išlaisvino, pridedant 0,5 ml 0,25% tripsino tirpalo BFDT; išlaikius keletą minučių 37°C temperatūroje, nurodytą ląstelių kultūrą iš kolbos nupildavo ir sujungdavo su ląstelių terpe.

Vėliau iš kiekvienos ląstelių suspensijos atskyrė lygias porcijas po 100 μ l, norėdami nustatyti ląstelių kultūros tankį. Likę 5,4 ml ląstelių kultūros suspensijos 30 min. buvo apdorojama ultragarsu, norint suardyti ląsteles.

Po to į kiekvieną mėgintuvėlį įpylė po 10 ml šarminio acetono tirpalo (90% acetono:10% NH_4OH) ir centrifugavo, norėdami pašalinti proteinę ir ląstelių gabalėlius. Į iškilusią paviršiuje medžiagą pridėjo po 50 ml vandens, o po to – po 0,5 ml sotaus vandeninio NaCl tirpalo. pH reguliavo iki 6,8, įlašindami lašais 2 M KH_2PO_4 tirpalo.

Produkta ekstrahavo iš terpės vanduo/acetonas, pakraudami į C8 Baker Prop. kolonėlę. Kolonėlę pradžioj džiovino, o po to plovė 3 ml metilo alkoholio ir vandens (90:10) mišiniu. Analogiškai 1 pavyzdžiui, visos ekstrahavimo operacijos buvo atliekamos tokiose sąlygose, kad protoporfirinas pilnai būtų apsaugotas nuo jį sužadinančio šviesos poveikio, t.y. žalioje šviesoje arba tamsoje, pvz., induose su balta danga. Po to nustatinėjo ekstraktų fluorescencijos parametrus spektrofluorimetru CPEX.

Susikaupusio protoporfirino (Proto IX) kiekybinius rodiklius nustatinėjo, pasitelkdami iš anksto rastus gesimo koeficientus. Rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Augimo sulėtėjimo vidutiniai rodikliai ir Proto IX susikaupimas

5

Aktyvusis junginys	Aktyvaus komponento koncentracija	Augimo sulėtėjimas %	Proto IX kiekis pikomoliais	Proto IX santykinis kiekis
B	100	99	5.20	2 364
F	100	106	2.71	1 232
C	100	52	4.41	2.005
C	10	-15 ⁺	0.57	259
C	1	-26 ⁺	0.19	86

Pastabos:

+ Neigiama rodiklio "augimo sulėtėjimas" reikšmė sako, kad augimas vistik vyksta

10

++ Vidutinė reikšmė 10-čiai ląstelių

+++ %, lyginant su kontroliniu bandiniu

15

Kitas šio išradimo aspektas - protoporfirino gavimo būdas. Pagal jį tamsoje (arba šviesoje, nesužadinančioje Proto IX), augino eukariotų klasei priklausančius algae mikroorganizmus, parinkdami terpę, turinčią aukščiau aprašytus aktyvius junginius, slopinančius fermentinį protoporfirinogeno perėjimą į Proto IX. Terpę ir algae mikroorganizmus, arba ir tuos, ir kitus toliau apdorojo, norėdami ekstrahuoti Proto IX ir atskirti jį nuo chlorofilo, karotenoidų, suardydami ląstelines audinius ir pan. Atskyrimą galima atlikti bet kuriuo įprastu būdu, pvz., panaudojant skystos fazės chromatografiją, tame tarpe ir skysčių chromatografiją su atvirkščia faze, arba ištirpinant tirpiklyje, o taip pat

20

25

nusodinant Proto IX, pervedus jį į chelatinį junginį su metalu, pvz., geležim, cinku ar magniu, po to (esant reikalui), regeneruojant Proto IX, kaip tai daroma pagal žinomą chelato veikimo praskiesta rūgštimi metodiką.

Operacijas visose atskyrimo stadijose atlieka esant apšvietimui, neiššaukiančiam Proto IX sužadavimo, pvz., žalioje šviesoje, kaip tai aprašyta A Priede, pavadintame "Apdirbimas tamsoje", arba pilnoje tamsoje. Geležies chelatas nejautrus šviesai, taigi, naudojant šį junginį, galima dirbti šviesoje.

Algae mikroorganizmus geriau auginti ląstelių kultūros suspensijos pavidalu 15-30°C temperatūroje. Aktyvaus junginio - inhibitoriaus koncentracija gali, pvz., būti nuo 10^{-5} iki 10^{-7} M. Tinkamų algae mikroorganizmų pavyzdžiai: Scenedesmus sp., Chlamydomonas reinhardi, Englena sp., Bumilleriopsis filiformis.

3 pavyzdys

Mikroorganizmo Clamydomonas reinhardi (laukinė atmaina) kultūras augino nerūdyjančio plieno rezervuare, pvz., 300 l talpos, naudodami žemiau aprašytą kultivacinę terpę. Į kultūrą pridėjo 1-(karboetoksi)-etil-5-(2-chlor-4-trifluormetilfenoksi)-2-nitrobenzoato (taip vadin. "Laktofen", techninis fenileterinis herbicidas) tirpalo acetone, užtikrindami aktyvaus komponento koncentraciją 10^{-5} M ir galutinę acetono koncentraciją, lygią 0,1%. Mikroorganizmų išauginimui mišinį palikdavo ramybėje 4-7 paroms 25°C temperatūroje, atsargiai mechaniskai ir/arba aerodinamiškai pamaišydami. Kaip ir kitas operacijas, rezervuaro turinio filtravimą atlikdavo tamsoje: filtratą analizuodavo, nustatydami jame protoporfiriną IX.

Vienas iš protoporfirino IX nustatymo analizės metodų susideda iš reakcijos rezervuaro turinio (visą laiką esančio tamsoje) filtravimo ir acetono pridėjimo į filtratą. Vėliau šį mišinį ekstrahavo petrolio eteriu.

5 Po to vandens-acetono terpę ekstrahavo dietilo eteriu, kuri iš nuosėdų pašalindavo garinimu. Tas nuosėdas tirpino metilo alkoholyje, ir protoporfirino IX nustatymui panaudojo atvirkštinės fazės chromatografiją.

10 Be to, galima panaudoti ir duoto junginio nustatymo metodiką, aprašytą 1 ir 2 pavyzdžiuose.

Terpės sąstatas

Druskos	Molinė koncentracija x 10 M	Koncentratas %	Koncentrato ml/l
(Na citratas) 6H ₂ O	1,7	10	5
Metallų pėdsakai	kaip nurodyta žemiau		10
FeCl ₂ •6H ₂ O	0,37	1	1
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,36	5,3	1
MgSO ₄ •7H ₂ O	1,2	10	3
NH ₄ NO ₃	3,7	10	3
KH ₂ PO ₄	2,2	10	3
K ₂ HPO ₄	1,7	10	3
CH ₃ CO ₂ Na	7,5	10	10

15 Mišinio koncentratas, turintis metallų pėdsakus:

	mg/l
H ₃ BO ₃	100
ZnSO ₄ •7H ₂ O	100
MnSO ₄ •4H ₂ O	40
CoCl ₂ •6H ₂ O	20
NaMoO ₄ •2H ₂ O	20
CuSO ₄	4

Kaip alternatyva mikroorganizmų Clamydomonas reinhardi pritaikymui yra pritaikymas kultūros Sendesmus sp., išaugintos aukščiau nurodytoje terpėje, kur natrio acetatas pakeistas gliukoze.

5

4 pavyzdys

Šis pavyzdys analogiškas 3 pavyzdžiui, išskyrus tai, kad vietoje "Laktofeno" naudojamas 1-(4-chlor-2-fluor-55-propargiloksifenil)-3-metil-4-difluormetil- Δ^2 -1,1,4-triazolin-5-nas.

10

5 pavyzdys

15 Rodiklio I_{50} nustatymas

Protoporfirinogenas IX (Protogenas IX)

Preparato Proto IX tiekėjas buvo firma "Porphyrin Products" iš Logeno miesto, Jutos štato, JAV. Šį preparatą išskyrė gryname pavidale ir aprašė Fuesleris su bendradarbiais (T.P. Fuesler et all.: Plant Physiol., 1981, 67 t., 246-249 psl.). Šviežią Protogeną IX gaudavo, redukuodami Proto IX, panaudojant Na/H amalgamas, kaip tai aprašė Jacobs ir Jacobs (N.J. Jacobs and J.M. Jacobs: Enzyme, 1982, 28 t., 206-219 psl.), dirbę su 300 μ M koncentracijos išgrynintu Proto IX.

20

25

Augalinė medžiaga

30

35

Agurkų daigus (Cacumis sativus L., Wiskonsin SMR 18) augino užtemdytoje daiginimo kameroje vermikulite, sudrėkintame skystomis firminėmis trąšomis (9-45-15). Daigus augino 25°C temperatūroje, esant santykiniam oro drėgnumui 80-90%. Daigus apšviesdavo dozuoto intensyvumo 25 μ E/m² trūkčiojančia šviesa su (PAR), naudodami firmos "General Electric" šviesos šaltinį Bright Stick,

valdomą elektroniniu taimeriu, per 60 min. ciklą apšviečiant daigus 1 min. Tokiu būdu buvo gautas augalinis audinys, sugebantis pagreitintai sintetinti chlorofilą, suvedant iki minimumo rezervinio krakmolo kiekį ir pradinio chlorofilo lygį.

Chloroplastų izoliavimas

Išsiskiriantys chloroplastai buvo izoliuojami pagal metodą, kurią aprašė T.P. Fuesleris su bendradarbiais (žiūr.: Plant Physiol., 1984, 75 t., 662-664 psl.) išskyrus tai, kad galutinėje valymo stadijoje plasticidus centrifugavo per 40% (tūr. dalys), o ne per 45% idėklą iš Perco II medžiagos. Po to chloroplastai vėl buvo pervedami į koloidinę būklę buferiniame tirpale, turinčiame 0,5 M manitolo, 20 μ M TES', 10 μ M HEPES, 1 μ M etilendiamintetraacto rūgšties, 1 μ M MgCl, 1% (masės/tūrio) jaučio serumo albumino ir 1 μ M ditioeritritolo, esant pH=7,7 ir galutiniam proteino kiekiui 2 mg/l.

Protoporfirinogen-oksidazės bandiniai

Bandiniai buvo paruošti taip, kaip tai aprašė Jacobs ir Jacobs (J.M. Jacobs and N.J. Jacobs: Arch. Biochem. Biophys. 1984, 229 t., 312-319 psl.). Chloroplastų suspensijos pavyzdžiai (po 0,2 ml) buvo preliminariai 15 min. apdoroti tamsoje, esant skirtingoms acifluorfen-metilo (AFM) koncentracijoms arba, kontrolinio bandinio atveju, esant acetono koncentracijai 0,2% (tūrio dalys). Po to 50 μ l šviežiai paruošto apie 15 nM konc. preparato "Protogen" įpylė į suspensiją, kad prasidėtų reakcija. Bandinių paruošimas baigėsi tuo, kad buvo įvesta 2,75 ml fluorometrinės medžiagos, kurią pasiūlė Jacobs ir Jacobs (J.M. Jacobs and N.J. Jacobs: Enzyme 1982, 28 t., 206-219 psl., susidedančios iš 1% (tūrio dalys) tvin-20 (polioksietilensorbitano monolauratas),

50 mM tris-HCl ir 1 mM etilendiamintetraacto rūgšties pH=8,5, be to, 1 mM ditioeritritolo buvo pakeista 5 mM gliutatio. Po to suspensiją analizavo tiesioginio skaitymo metodu spektrofluorimetru SPEX Fluorog-2, ap-
5 rūpintu fluorescencijos indikatoriumi drumstiams biologiniams pavyzdžiams. Susidariusio Proto IX kiekį nustatinėjo pagal priklausomybės tarp kiekybinės Proto IX emisijos prie 630 nm ir sužadavimo prie 400 nm grafiko standartinę kreivę, beje, ši kreivė buvo gauta grynam
10 Proto IX fluorometrinėje terpėje.

Norėdami kiekybiškai nustatyti nefermentinio oksidavimo iki Proto IX laipsnį aukščiau aprašytame bandinyje, paruošė tokių pat bandinių, išskyrus tai, kad vietoj aktyvių chloroplastų suspensijos panaudojo suspensiją,
15 kurioje chloroplastai buvo pervesti į neaktyvią būklę, 15 min. šildant 85°C temperatūroje. Atskaičius Proto IX kiekį, gautą tokiu būdu, iš jo kiekio, gauto dalyvaujant aktyviems chloroplastams kaip tik ir gauname
20 Proto IX kiekį, susidariusį fermentiniu keliu. Rezultatai grafiškai pavaizduoti Fig. 1, kur LSD - mažiausia skirtumo reikšmė (bendrai priimtas žymėjimas).

Fig. 1 matome, kad rodiklis I_{50} (koncentracija, užtikrinanti 50%-nį slopinimą) sudaro mažiau nei 0,1 μM , pvz., apie 0,03 M.
25

Bandymas, kaip veikia 10 μM AFM į fermentinį Proto IX virsmą magneziniu Proto IX chloroplasto suspensijoje (dalyvaujant ATP), neparodė jokio slopinančio AFM poveikio į šį virsmą.
30

6 pavyzdys

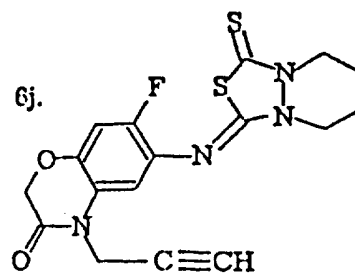
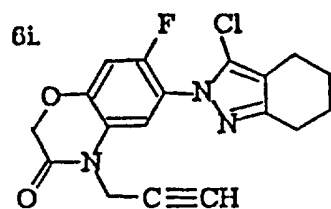
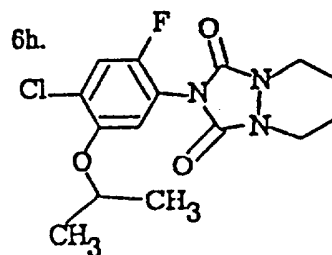
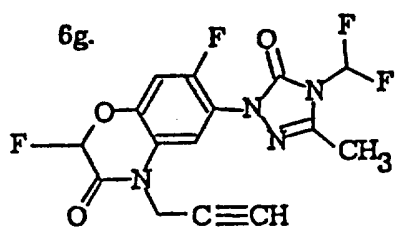
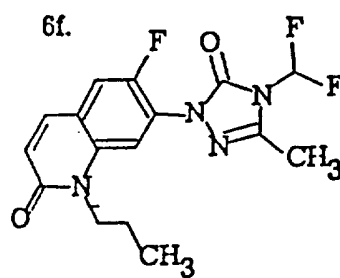
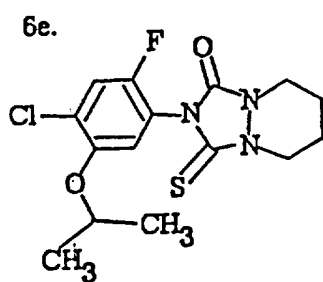
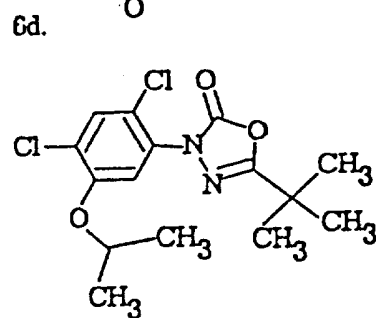
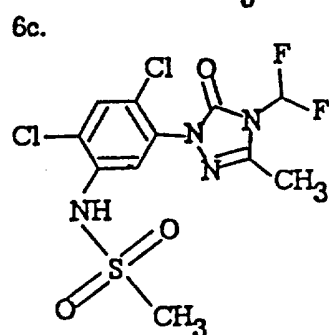
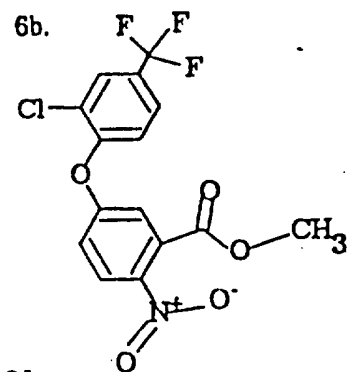
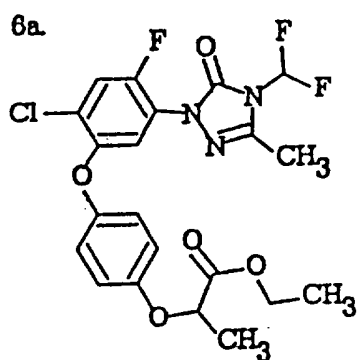
35 Pagal šį pavyzdį fermentus slopinantys aktyvūs komponentai buvo pridėti į maistą pelių, kurios yra navikų nešiotojos, tuo tarpu į kelių kontrolinių pelių maistą

jokių preparatų ne pridėjo. Po to pelės numarindavo, iš-
imdavo inkstus, žarnyną, antinksčius, kepenis, navikus
ir analizuodavo juos, nustatydami Proto IX kiekį. Buvo
panaudoti šie fermentus slopinantys aktyvūs junginiai:

5

žiūr. 23 psl.

Bandymams buvo panaudojamos DBA/2 Ha linijos pelės,
 kurioms nulinę dieną į dešinią petį suleisdavo poodinį
10 navikinį preparatą SMT-F. Pirmą dieną po to pelės
gaudavo specialų maistą graužikams: Purina Rodent Chow
5001 Mash be priedų. Toliau 2-10 parų pelės gaudavo tą
patį maistą su tiriamo fermentus slopinančio aktyvaus
junginio 2 promilių priedu (kontrolinės pelės gaudavo
15 tą patį maistą, bet be priedų). Priedą įvesdavo į
maistą, įmaišydami nedidelį kiekį tiriamo aktyvaus jun-
ginio tirpalo acetone. Dešimtą parą pelės numarindavo,
išskyrus pelę, paveiktą aktyviu junginiu, pažymėtu 6j:
šiā pelę numarindavo jau septintą parą. Gyvulėlių
20 audinius palikdavo nakčiai 4°C temperatūroje, kad at-
šaltų, po to drėgmę pašalindavo sugeriamuoju popieriumi
ir nustatydavo kiekvieno audinio pavyzdžio masę. Vėliau
iš audinių ruošė homogeninę suspensiją 5-se ml (žarnyno
ir kepenų audiniams - 10 ml) acetono ir 0,1 N NH₄OH
25 mišinyje, kur tūrinis jų santykis 9:1. Po to homo-
geniniai preparatai buvo centrifuguojami, esant 1500 g,
ir išplautos į paviršių medžiagos buvo analizuojamos
SPEX FA112 spektrofluorometru. Proto IX optimalūs yra
sužadinimas prie 400 nm ir emisija esant bangos ilgiui
30 630 nm. Proto IX susikaupimą nustatinėjo pagal fluores-
centinį blykstelėjimų skaičių 1 g audinio per sekundę.
Rezultatai pateikiami žemiau 3 lentelėje (kiekvienam
preparatui reikšmės yra vidutinės pelių porai, išskyrus
bandymus su aktyviais junginiais 6f, 6h, 6i ir 6j, kai
35 bandymams ėmė tik vieną pelę.



3 lentelė

Fluorescentinių blykstelėjimų skaičius ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$) 1 gramui audinio preparatui Proto IX

5

Aktyvus junginys	Navikas	Kepenys	Inkstai	Antinksčiai	Žarnynas	Naviko masė sureagavusi į poveikį, mg
6a	1203	4291	10817	6572	5870**	143
6b	1520	1261	2441	2529	5577**	90
6c	14336	2739	16186	13790	9937**	157
6d	2006	1581	12865	443	5565**	294
6e	836	876	915	1331	2069**	165
6f	449	1170	661	5611	1157	69
6g	166	803	606	1984	466	250
6h	298	914	585	2259	584	192
6i	932	1510	4014	36940	3454	20
6j	1251	538	315	491	572	11
Kontrol.	239	536	494	1504	233	200
						424**

Pastabos:

10 * Lentelės duomenis reikia skaityti su koeficientu $\times 10$.

** Matavimai atlikti pavyzdžiams, praskiestiems šarmi-
niu acetonu (3 dalys acetono 1 daliai pavyzdžio).

15 Nurodyti 4 lentelėje duomenys atitinka Proto IX koncentracijoms atitinkamuose audiniuose. Matavimo vietas: Proto IX mikro gramai (μg) vienam g audinio.

4 lentelė

Aktyvus junginys	Navikas	Kepenys	Inkstai	Antinksčiai	Žarnynas
6a	11	39	99	60	54
6b	14	12	22	23	51
6c	131	25	148	126	91
6d	18	14	117	4	51
6e	8	8	8	12	19
6f	4	11	6	51	11
6g	2	7	6	18	4
6h	3	8	5	21	5
6i	9	14	37	337	32
6j	11	5	3	4	5
Kontrol.	2	5	5	14	2
					4

5 Aukščiau cituojamame Dougherty straipsnyje nurodoma, kad porfirino koncentracija to paties tipo (SMT-F) navike po 10 mg/kg hematoporfirino injekcijos tos pačios linijos DBA/2 pelėms yra 3,6 µg/g. Kitoje mokslinėje publikacijoje (Moan et al: P P 46-5, 713-721 psl., žiūr. pavyzdį 2 pieš., 716 psl.) nurodoma, kad CH/Tif tipo navikams 12 µg/g eilės porfirino koncentraciją, kurią DBA/H₂ linijos pelėms užtikrina 25 mg/kg fotofrino II (Photofrin II) injekcija į pilvo sritį, plačiai naudoja, norėdami suteikti jautrumą šviesai, fotodinamiškai gydant ir diagnozuojant vėžinius susirgimus.

Pelės suėsdavo tokius maisto su aktyviu junginiu kiekius: 6a) 22 ir 35 g; 6b) 37 ir 35 g; 6c) 25 ir 22 g;

6d) 41 ir 32 g; 6e) 40 ir 44 g; 6f) 27 g; 6g) 33 ir 40 g;
6h) 36 g; 6i) 10g; 6j) 20 g.

5 Vykiant eksperimentus, aprašytus 6 pavyzdyje, su gyvūnėliais, nesančiais navikų nešiotojais, buvo naudojamas aktyvus junginys (jeigu nenurodyta kitaip), kuris šiame pavyzdyje pažymėtas 6c, ir operacijų seka buvo tokia:

10 a) nustatant aktyvaus junginio rodiklį LD_{50} jis pasirodė besąs virš 2600 mg/kg (t.y., mg aktyvaus junginio 1 kg kūno masės) žiurkėms, kai tą rodiklį nustatinėjo po 14 dienų, vieną kartą gyvūnams suėdus porciją kukurūzų aliejaus su 15% aktyvaus junginio ir virš 700 mg/kg pelėms, kai tą rodiklį nustatinėjo po 14 dienų, vieną
15 kartą gyvūnams suėdus to paties aliejaus su 5% aktyvaus junginio.

20 b) Tiriant sąstatus be aktyvaus junginio, skirtus injekcijoms į pilvo ertmę, buvo aptikta, kad pelės gali atlaikyti 0,5 ml dozės injekcijas mišinio iš lygių dalių dimetilsulfoksido ir vandens.

25 c) Bandant aktyvų junginį, įvedama injekcija į pilvo ertmę mišinyje iš 60% kukurūzų aliejaus ir 40% dimetilsulfoksido buvo nustatyta, kad pelės gali atlaikyti dozę 100 mg/kg.

d) Su pelėmis buvo atlikti tokie eksperimentai:

30 1) per 8 dienas kasdien sumaitinama dozė 50 mg/kg (naudojant 1% aktyvaus junginio acetone tirpalą),

35 2) per 8 dienas kasdien suleidžiama į pilvo ertmę 50 mg/kg dozė 1%-nės aktyvaus junginio mineraliniame aliejuje dispersijos, paruoštos tirpinant aktyvų junginį dimetilsulfoksido laše ir sumaišant gautą tirpalą su mineraliniu aliejumi,

3) per 8 dienas kasdien užtepama ant odos 50 mg/kg 1% dimetilsulfoksido tirpalo dozė,

4) per 8 dienas maitinama standartiniu maistu, pridėjus 2 promiles nuo maisto masės aktyvaus junginio,

5) per 4 dienas kasdien suleidžiama į veną 50 mg/kg 2%-nio dimetilsulfoksido dozė.

Po to pelės, su kuriomis atlikti eksperimentai, numarindavo ir nustatydavo Proto IX susikaupimą jų audiniuose.

Kitame eksperimente Fisher 344 linijos žiurkės patinėlių per 24 dienas šėrė maistu su 5 promilėmis aktyvaus junginio 6c, po to gyvūną numarindavo. Tos žiurkės audiniuose buvo pastebėti padidinti Proto IX kiekio lygiai, palyginus su kontroliniu gyviu, beje, žymesnis lygių padidėjimas buvo inkstų, žarnyno, skrandžio ir galvos smegenų audiniuose, tuo tarpu raumenų audiniuose pastebėtas tik nežymus lygio pakilimas.

Visuose aukščiau aprašytuose eksperimentuose žiurkės ir pelės buvo laikomos standartiniame apšvietimo režime: 12 val. šviesoje ir 12 val. tamsoje.

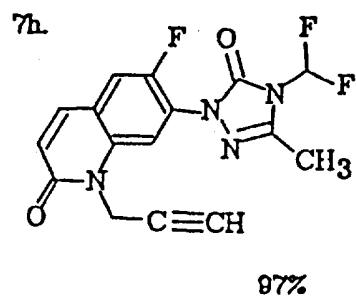
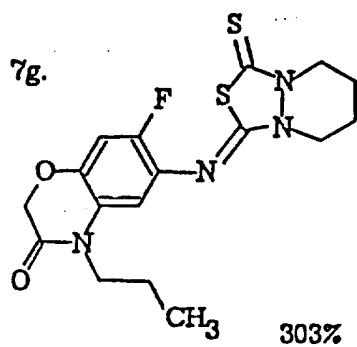
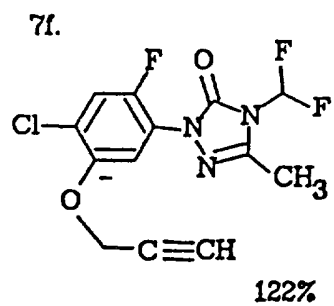
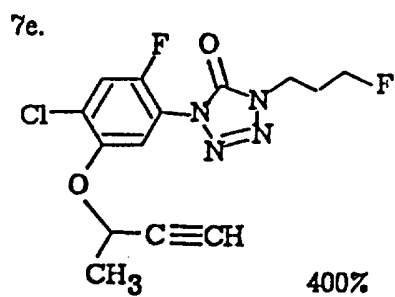
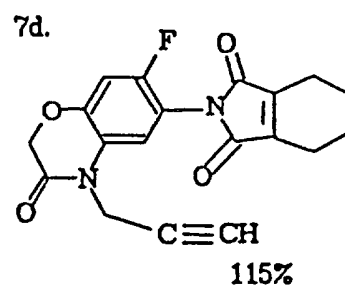
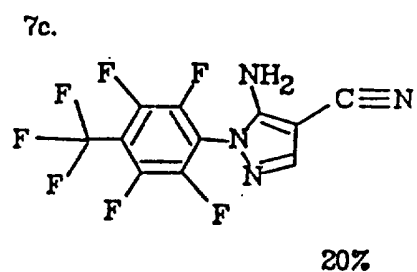
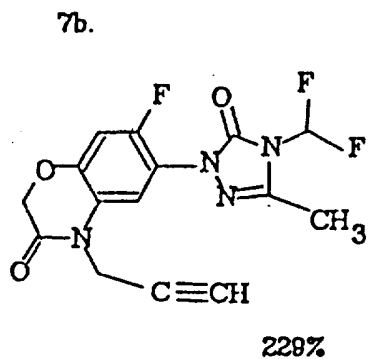
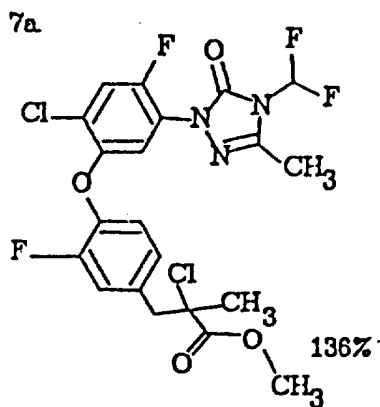
7 pavyzdys

Atliekant seriją eksperimentų pagal 1 ir 2 pavyzdžius, HeLa kultūros ląsteles inkubavo, dalyvaujant žemiau išvardintiems 100 μ M koncentracijos įvairiems vaistiniams aktyviems junginiams. Rodikliai %-tais, kurie pateikiami po kiekvieno vaistinio aktyvaus junginio žymėjimo, rodo, kad dalyvaujant duotam vaistiniam aktyviam junginiui, susidariusio Proto IX kiekis padidėja, lyginant su tuo kiekiu, kuris susidaro to paties eksperimento kontroliniame pavyzdyje.

6-me pavyzdyje panaudoti aktyvūs junginiai turi tokias reikšmes: 6a) 337%; 6b) 336%; 6c) 297%; 6d) 1200%; 6e) 1210%; 6f) 280%; 6g) 326%; 6h) 431%; 6i) 544%; 6j) 469%; kitų aktyvių junginių formulės ir atitinkamos procentinės reikšmės tiems junginiams pateiktos žemiau. (žiūr. 29 psl.)

8 pavyzdys

- 10 Šiame pavyzdyje fermentus slopinanti aktyvų junginį 6c iš 6 pavyzdžio sumaitino žiurkėms su įskiepytu naviku, po to navikinę zoną apšvitino šviesa, tuo būdu iššaukdami naviko rezorbciją.
- 15 Būtent, trims Sprague Dawley linijos žiurkėms, kurių masė vidutiniškai po 120 g, 6 dienų periodui buvo paskirtas maisto racionas su 2 promilių aktyvaus junginio priedu. Trečią parą ant kiekvienos žiurkės dešinės užpakalinės kojos implantavo chondrosarkomą, įleidami
- 20 0,3 ml navikinių ląstelių suspensijos (1 milijonas navikinių ląstelių). Šeštą parą nuskuto kiekvienos žiurkės dešinės užpakalinės kojos plaukų dangą ir matavo kiekvieno naviko dydį. Toliau naviko pažeistą sritį ir aplinkinę odą švitino nešiluminėmis dozėmis šviesos,
- 25 kurios bangos ilgis 630 nm, energijos srovės tankis 270 Dž/cm. Kitą dieną pasirodė, kad 2 žiurkės žymiu laipsniu išsigelbėjo nuo savo navikų (t.y., naviko masė daugiau neapčiuopiama), o trečios žiurkės navikas beveik rezorbavosi. Visoms žiurkėms oda apie navikus ir raumenų ląstelės truputį pabalo ir atrodė lyg patinę, bet žymiai mažiau, negu tai būna naudojant preparatą Photofrin II fotodinaminėje terapijoje.
- 30



A priedas

Bandymas nustatyti išplovimo procentinį rodiklį

- 5 Bandymo eigoje, nustatant išplovimo procentinį rodiklį, naudojo sėklaskiltes, surinktas iš tamsoje sudaigintų agurkų daigų. Pirmoje stadijoje sėklaskilčių masę apdorojo tamsoje vandeniniu tirpalu (dalyvaujant buferiniam junginiui), turinčiu cukrų su radioaktyviais žymėtaisiais atomais. Po to matavo cukraus, kurį įsisavino sėklaskiltės, kiekį pagal žemiau aprašytą skaičiavimo metodiką. Visą sėklaskilčių masę dalino į dvi porcijas. Viena iš tų porcijų apdorojo tamsoje vandeniniu tirpalu (dalyvaujant buferiniam junginiui), kuriame yra tiriamas junginys, o kitą lygiai taip pat apdorojo tamsoje tuo pačiu tirpalu, tik be tiriamojo junginio (kontrolinis bandinys). Pamerktos į nurodytus vandeninius tirpalus sėklaskiltės 16 val. buvo švitinamos šviesa, po to jas atskyrė nuo vandeninių tirpalų, kuriuose matavimo ir skaičiavimo metodu nustatinėjo medžiagos su radioaktyviais žymėtaisiais atomais kiekius. Gauti rezultatai buvo po to pateikti kaip išplovimo procentinis rodiklis (IPR), paskaičiuojamas pagal formulę:

25

$$\text{IPR} = (S_T - S_C) / S,$$

- kur S , S_T ir S_C - atitinkamai medžiagos su radioaktyviais žymėtaisiais atomais skilimų skaičiai (vienai sėklaskiltei):

30

- a) toje medžiagoje, kurią įsisavino sėklaskiltės jų pradinio apdirbimo metu,
- 35 b) vandeniniame tiriamojo junginio tirpale po švitinimo ir
- c) kontroliniame vandeniniame tirpale po švitinimo.

Panaudotos medžiagos, o t.p. bandymo sąlygos, nustatant IPR, detaliau charakterizuojamos toliau.

Augalinės medžiagos

5

Vermikulite, sudrėkintame prekyboje turimomis trašomis 9-45-15, buvo sudaigintos agurkų sėklos *Cocumis Salivus* L., rūšis *Wisconsin SMR*, iš kurių inkubacinėje kameroje 25°C temperatūroje, esant santykiniam oro drėgnumui 80-90% tamsoje išaugino daigus. Po 5 parų nuo pasėjimo momento iš po blyškių, tamsoje išaugusių daigų ūglių surinko sėklaskiltes ir išplovė jas 1,0 mM CaCl_2 tirpale. Visas tas operacijas atliko žalioje šviesoje.

15

Buferinis tirpalas

Tirpale yra 1 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2,0 mM kalio fosfato; jo pH sureguliuotas iki 6,5 (kaip ir naudojant NaOH).

20

Cukrus su radioaktyviais žymėtaisiais atomais

Ta cukraus rūšis yra 3-O-metil-3[11-14C]-gliukozė su specifiniu aktyvumu 10,9 GBk/mM; tiekėjas: firma "Amersham Corp." Arlingtono miestas, Ilinoiso valstija, JAV.

25

Pradinis apdorojimas

180-230 vienetų išplautų sėklaskilčių supylė į plačiagurklę 250 ml talpos Erlenmėjerio kolbą su putų poliuretano kamščiu, į kurią įpilta 50 ml buferinio tirpalo ir įdėta cukraus su radioaktyviais žymėtaisiais atomais toks kiekis, kad jo koncentracija tirpale būtų 600 nM. Tamsoje ant besisukančio įrenginio 24 val. bėgyje kolbą kratė 125 min.⁻¹ dažniu. Po to sėklaskiltes iškrovė ant neiloninio tinklo ir 3 kartus plovė 1 mM CaCl_2 tirpalo porcijomis, kurių kiekviena – 20 ml. Cukraus su radioaktyviais žymėtaisiais atomais įsisa-

vinimą nustatinėjo, ištirpindami 3 pavyzdžius, kurių kiekviename buvo po 5 sėklaskiltes, audinių tirpiklyje (markė NCS, firmos "Amersham Corp." gamyba) ir sumarinį suvartojimą paskaičiuodavo skysčio scintiliacijos spektrometre.

Buvo nustatyta, kad suvartojimo nustatymo eksperimentas ekvivalentiškas analogiškiems nustatymams, sudeginant atrinktus sėklaskilčių bandinius savireduktoriuje.

Apdirbimas panaudojant tiriamą junginį, o taip pat kontrolinis apdirbimas

Penkias sėklaskiltes paliko plaukioti 3 ml buferinio tirpalo, įpilto į 35 mm diametro plastmasinę Petri lėkštelę su dangteliu, paviršiuje. Po to ten įpylė tokį tiriamo junginio (jo tirpalo acetone) kiekį, kad būtų užtikrinta reikiama (apie kurią buvo pasakyta aukščiau) tiriamo junginio koncentracija buferiniame tirpale. Acetono kiekis buferiniame tirpale sudarė 0,1% (tūrio dalys) kaip kontroliniame bandinyje, taip ir tirpale su tiriamu junginiu. Plaukiančios sėklaskiltės 16 val. sukosi ratu verpete, kuris susidarė kratant lėkšteles 90 min.⁻¹ dažniu besisukančio kratančio įrenginio paviršiuje.

Švitinimas šviesa

Petri lėkšteles su sėklaskiltėmis, plaukiančiomis tirpalų paviršiuje, 16 val. švitino keturių fluorescencinių lempų GE F20T12-CW šviesa, esant duotam intensyvumui 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ spektrinėje fotosintezės srityje (SFSS), be to, minėtą intensyvumą matavo sėklaskilčių paviršiuje, kai lėkštelės tuo metu buvo nenutrūkstamai kratomos.

Skystyje esančios medžiagos su radioaktyviaisiais žymėtaisiais atomais kiekio matavimas .

5 Visą skystį atskyrė nuo sėklaskilčių; skysčių scintiliacijos spektrometru nustatinėjo skilimų skaičių.

Tamsa

10 Iki švitinimo šviesa stadijos, visas kitas apdorojimas buvo atliekamas žalioje šviesoje, kurią skleidė fluorescentinis šaltinis, t.y. šviesoje, praėjusioje per žalia atskiriantį plastmasinį šviesos filtrą, praleidžiantį 450-600 nm bangos ilgio šviesą.

15 B priedas

5 lentelė

Terpė kultūroms

20

M terpė

Druskos	Moliaringumas	Koncentratas	ml koncentrato 1-nam litrui
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1.2 \times 10^{-3} \text{M}$	10%	3
NH_4NO_3	$3.7 \times 10^{-3} \text{M}$	10%	3
KH_2PO_4	$2.2 \times 10^{-3} \text{M}$	10%	3
K_2HPO_4	$1.7 \times 10^{-3} \text{M}$	10%	3

Mišinio, turinčio metalų pėdsakus, koncentratas

25

H_3BO_3	100 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 mg/l
$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg/l
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg/l
CuSO_4	4 mg/l

A terpę kultūroms ruošė, pridėdami į M terpę 10 ml/l 10% vandeninio natrio acetato tirpalo (koncentracija $7,5 \times 10^{-3}$ M).

- 5 Visus komponentus pylė į distiliuotą vandenį aukščiau nurodyta tvarka, po to juos 15 min. apdorojo autoklave $1,05 \text{ kg/cm}^2$ slėgyje.

10 Konservuoto preparato kultūrų auginimui šviesos poveikyje atsarga

Užkonservuotas y-I kultūros akseniškai pervesdavo į skystas kultūras A arba M terpėje, geriau A terpėje, Erlenmejerio kolbose, uždarytose poliuretano kamščiais, 15 25°C temperatūroje tokio ciklo sąlygomis: 14 val. apšvietimo ir 10 val. tamsos. Konservuotas kultūras inkubavo (be papildomo aeravimo) ant besisukančio kratančio įrenginio, dirbančio 125 min^{-1} dažniu. Apšvietimo intensyvumas kultūros sluoksnio lygyje sudaro 20 $120 \text{ } \mu\text{E/kv.m.s}$ (SOFs). Tokiose sąlygose kultūros yra pusiausinchroninio augimo režime iki tol, kol jos nepereina į stacionarinę fazę, turinčią $(2-4) \times 10$ ląstelių viename ml.

- 25 Kultūrų auginimas be šviesos (kultūros, auginamos tamsoje)

7,5 ml šviesoje išaugintų ląstelių, esančių stacionarinėje kultivavimo fazėje iš konservuotos kultūros, 30 pernešė į Erlenmejerio kolbą su 750 ml A terpės. 3-4 paras ląsteles inkubavo tamsoje, aeruodami per įgilintą aeracinį vamzdį 25°C temperatūroje. Per tą laiką turėjo įvykti 7-8 ląstelių y-I kultūros skilimai, netenkant viso matomo chlorofilo ir esant ląstelių 35 koncentracijai $(2-3) \times 10$ vnt./ml.

Ląstelių paruošimas bandinių tyrimams

Ląsteles išskirdavo iš 750 ml šviežiai paruoštos, tamsoje išaugintos kultūros, centrifuguodami apie 5 min. 20°C temperatūroje prie mažų apsisukimų (apie 2000 min⁻¹). Tas ląsteles atsargiai vėl pervesdavo į suspenduotą būklę 50 ml A terpės. To suspensijos bandinyje (0,25 ml) nustatinėjo ląstelių judrumą, o užfiksavę 1%-niu vandeniniu gliceraldehido tirpalu - skaičiavo ląstelių kiekį 1-me ml. Dažniausiai ląstelių skaičius būna 5x10⁷ vnt./ml. Ląstelių kultūrų porcijas po 1 ml, turinčias po 10 vnt. ląstelių, patalpina į indus bandymams, pvz., į falkonines lėkšteles, skirtas audinių kultūroms, su 24 duobutėmis. Šioje stadijoje ląstelės yra nusidažiusios geltona spalva ir yra labai judrios.

Tiriamą junginį tirpino tinkamame tirpiklyje, pvz., acetone, etilo spirite, dimetilsulfoksido ar vandenyje (geriausia - acetone), kad gaunama koncentracija 1000 kartų viršytų galutinę. Penkių ar dešimties µl mikrošvirkšto pagalba į kiekvieną duobučių porą įleisdavo po 1 µl minėto tiriamo tirpalo. Ant kiekvienos lėkštelės analogiškai ruošė 4 kontrolines duobutes be tiriamo junginio. Lėkšteles audinių kultūroms uždengdavo permatomais plastmasiniais dangteliais ir 13-16 val. augino kameroje 25°C temperatūroje, esant apšvietimui 70-90 µE/kv.m.s. Jei duobučių turinys geltonavo, tai jį išimdavo taip, kaip tai aprašyta žemiau punkte "Rezultatų įvertinimas". Jeigu gi bandomųjų duobučių turinys pasirodė permatomas ar blyškiai-žalsvas, tai prieš jį išimant talpino ant besisukančio kratančio įrenginio, dirbančio 125 min⁻¹ dažniu ir 2 val. švitino šviesa, kurios intensyvumas apie 600 µE/kv.m.s.

Rezultatų įvertinimas

Į kiekvieną bandomąją duobutę pildavo 250 μ l 10% vandeninio natrio dodecilsulfato tirpalo ir 1 ml metilo spirito, po to duobutės turinį rūpestingai permaišydavo. Gautus mišinius laikė tamsoje 3-4 val. Lėkšteles su augalinėmis kultūrom 5 min kambario temperatūroje apdorojo centrifūgoje su mažais apsisukimais (apie 2000 min^{-1}). Išplaukiančią iš paviršių medžiagą nuimdavo ir analizuodavo 35 modelio Bekmano (Beckman) spektrofotometru bangos ilgio intervale 350-800 nm (nustatant protoporfiriną IX, kuriam sistemoje su minėtu tirpalu charakteringas chlorofilo sugėrimo pikas ties 668 nm), o t.p. ties 720 nm, panaudojant drumstumo foninį rodiklį.

Duomenų analizė

Pažaliavimo rodiklį kiekvienai duobutei gaudavo, išskaičiuodami iš reikšmės, gautos ties 668 nm reikšmę, gautą ties 720 nm. Atitinkami dydžiai yra vidutiniai kiekvienai tiriamojo junginio koncentracijai, o t.p. kontroliniam bandymui. Procentinį slopinimo rodiklį nustato pagal formulę:

25

$$Q=100 \times (1-k), \text{ kur}$$

k - vidutinės pažaliavimo rodiklio reikšmės kiekvienai konkrečiai koncentracijai santykis su kontrolinio bandinio vidutine pažaliavimo rodiklio reikšme.

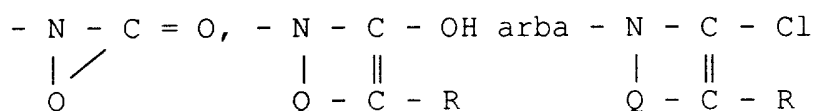
30

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

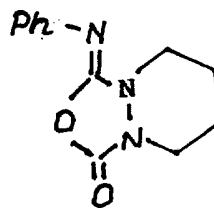
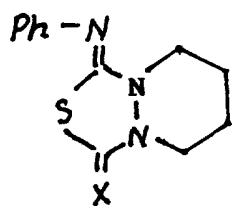
1. Specifinis fermentinio protoporfirinogeno virsmo protoporfirinu IX, veikiant protoporfirinogenoksidazei pieno liaukos naviko ląstelėse, inhibitorius, tuo pačiu iššaukiantis protoporfirino IX susidarymą tose ląstelėse, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis nėra tetrapirolo darinys, o yra aril-heterociklinis junginys, kurio formulė

Ph-NHet,

kurioje Ph - pakeistas fenilas, o N-Het - 5- ar 6-naris heterociklinis žiedas, kurio formulė:



kurioje Q yra heterociklinio žiedo uždaranti grupė, o R yra vandenilis arba jį pakeičianti grupė; aril-heterociklinis uretanai; fenileteris; arilpirazolas arba junginys, kurio formulė:



arba

kurioje X - deguonis arba sieros, o Ph reikšmė yra tokia, kaip nurodyta aukščiau.

2. Inhibitorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto junginio I_{50} protoporfirinogenoksidazei yra mažiau už 1 μM .

3. Inhibitorius pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo redoks-potencialas yra neigiamesnis už -500 mV.
- 5 4. Inhibitorius pagal bet kurią iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra 1-(4-chlor-2-fluor-5-propargiloksifenil)-3-metil-4-difluormetil- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-as.
- 10 5. Inhibitorius pagal 1-4 punktus, skirtas pieno liaukos naviko ląstelėms suardyti, veikiant ląsteles šviesa ir dalyvaujant tetrapiolui.
- 15 6. Inhibitorius pagal 1-4 punktus, skirtas pieno liaukos navikinėms ląstelėms diagnozuoti ir lokalizuoti, padidinus porfirino kiekį tokiose ląstelėse ir tiriant pieno liaukos ląsteles po apšvitinimo šviesa, aktyvuojančia porfiriną, bei matuojant fluorescenciją, kurios šaltiniu yra navikas.
- 20 7. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jos sudėtyje yra junginys pagal bet kurią iš 1-4 punktų, kuris yra specifinis fermentinio protoporfirinogeno virsmo protoporfirinu IX inhibitorius, iššaukiantis tuo pačiu protoporfirino IX susidarymą pieno liaukos naviko ląstelėse, ir farmaciškai priimtina terpė-nešiklis.
- 25 8. Farmacinė kompozicija pagal 7 punktą, skirta pieno liaukos naviko ląstelėms suardyti, veikiant ląsteles šviesa ir dalyvaujant tetrapiolui.
- 30 9. Farmacinė kompozicija pagal 7 punktą, skirta pieno liaukos naviko ląstelėms diagnozuoti arba lokalizuoti, didinant porfirino kiekį šiose ląstelėse ir tiriant pieno liaukos ląsteles po apšvitinimo šviesa, aktyvuojančia
- 35

porfiriną, be matuojant fluorescenciją, kurios šaltinis yra navikas.

10. Protoporfirino IX gavimo būdas, b e s i s k i r i a n-
5 t i s tuo, kad jį išskiria iš eukariotų klasei pri-
klausančių algae mikroorganizmų, išaugintų terpėje, ku-
rioje yra inhibitoriaus pagal 1-4 punktus.

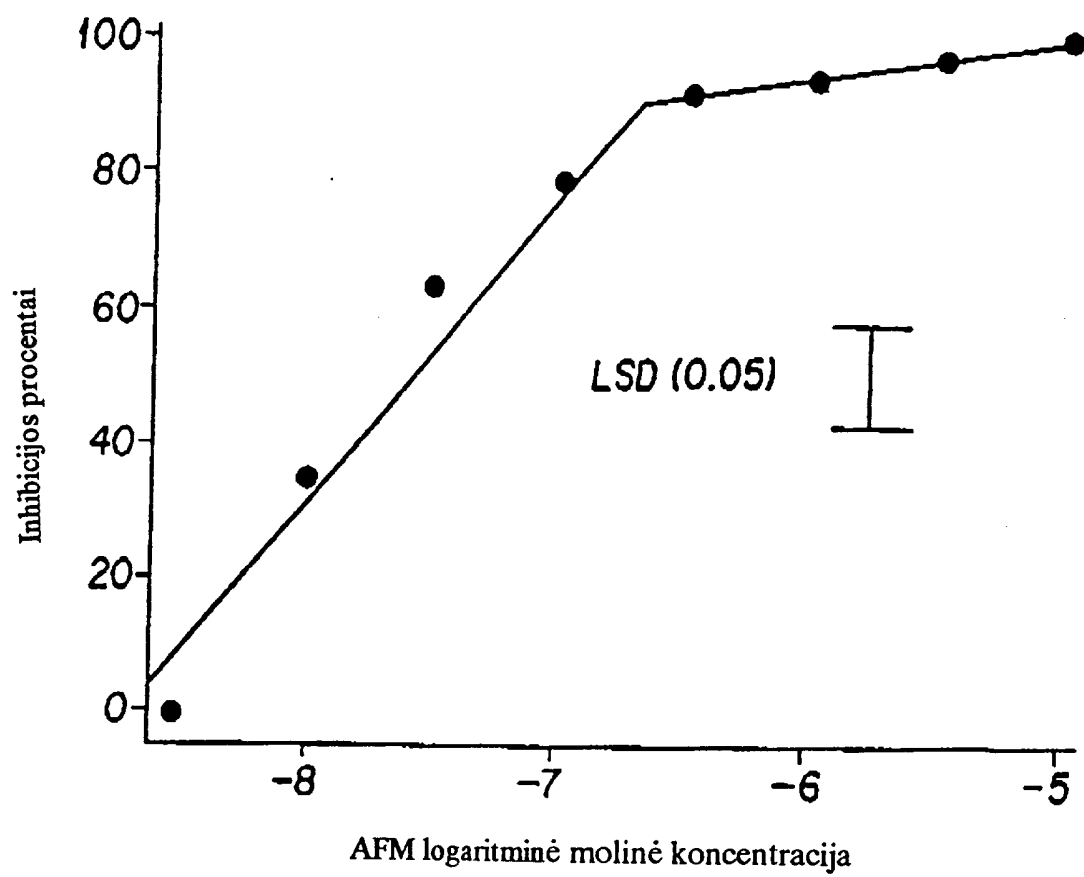


FIG. 1