

PO101076

Eljárások és eszközök az immunválasz módosítására

KIVONAT

A találmány eljárást biztosít egy antigénre adott immunválasz módosítására egy emlősben egy beültethető eszközt alkalmazva, mely az antigént szabályozott módon mutatja be az immunrendszer sejtjeinek. Az eszköz egy porózus mátrixot tartalmaz, mely egy perforált, de egyébként nem áteresztő fedőréteggel vagy fállal van körülvéve.

A találmány továbbá a fenti eszközt alkalmazva immunsejtek kinyerésére és monoklonális és poliklonális antitestek előállítására is vonatkozik.

jellemző a bra: Ø



72

70101076

Eljárások és eszközök az immunválasz módosítására

A találmány általánosságban egy antigénnel szembeni immunválasz módosítási eljárására vonatkozik egy emlősben, egy beültethető eszközt alkalmazva, mely az antigént ellenőrzött módon mutatja be az immunrendszer sejtjeinek. Egy mesterséges környezet létrehozásával utánózva egy nyirokcsomó összetételét és szerepét, és az eszközön belül az antigén biológiai hozzáférhetőségét módosítva, egy erőteljes válasz váltható ki egy antigénnel szemben, vagy egy meglévő immunválasz csökkenthető.

Egy antigénre adott immunválasz kiváltása és a válasz nagysága az antigén, a különböző típusú immunsejtek és a kostimuláló molekulák, ide értve a citokineket és kemokineket, összetett kölcsönhatásától függ. Az immunsejteknek az antigénnel való találkozásának időzítése és nagysága és a kostimuláló környezet tovább módosíthatja az immunválaszt. A testen belül ezek a különböző sejttípusok és további faktorok alkalmas módon a nyirokszövetek, mint például nyirokcsomók közelébe szállítódnak. A folyamatban résztvevő számos sejttípus közül az antigénprezentáló sejtek, úgymint makrofágok és dendritikus sejtek szállítják az antigént a perifériáról a lokális, szervezett nyirokszövetbe, feldolgozzák az antigént, és az antigén peptideket bemutatják a T-sejteknek, valamint kostimuláló molekulákat szekretálnak. Tehát ha az antigén lokalizált lépcsőzetes módon, optimális koncentrációgradiens mellett és megfelelő, kostimuláló molekulá-

kat tartalmazó környezetben eléri a nyirokszerveteket, a kiürülő nyirokcsomóban egy válasz váltódik ki.

Ilyen módon egy testbe bevitt, például vakcinázás segítségével bevitt idegen antigén egy kívánt erőteljes immunválaszt eredményezhet vagy lehetséges, hogy nem eredményezi ezt. A vakcinázáshoz használt antigének legyengített és inaktivált baktériumokat és vírusokat és ezek alkotórészeiből állnak. A vakcinázás sikere részben az antigén típusától és mennyiségétől, az immunizáció helyétől, és a vakcinázás idején az immunrendszer állapotától függ. Nem mindegyik antigén azonosan immunogén, és a gyengén immunogén antigének esetében létezik néhány hozzáférhető alternatív lehetőség, mely megnöveljük az immunizáció hatékonyságát. Míg a kísérleti állatokban számos módszer áll rendelkezésre az immunválasz kialakulásának fokozására, mint például az antigén konjugálása egy jobban immunogén hordozó fehérjéhez vagy biomolekulához (például kulcslyuk kagyló hemocianinhoz), vagy az adjuvánsok, mint például Freund-adjuváns vagy alum alkalmazása, az emberi vakcinázásokhoz ezek a technikák és adjuvánsok nem vehetők igénybe. Tehát számos betegség esetén, mely egyébként megelőzhető lenne vakcinázással egy fertőző ágenssel való találkozás előtt, vagy terápiás vakcina esetében, mely egy meglévő betegséget okozó ágenssel vagy sejttel, mint például rákkal szemben hatásos immunválasz kialakulását indukálja, a vakcinázást a beteg nem veheti igénybe.

Szivacs implantátum vizsgálatokat hajtottak végre emlősökben egy úgynevezett steril tályogot létrehozó idegen test által vonzott immunsejtek populációjának mérésére, és a vonzott sejtpopuláció további tanulmányozására a szivacsokat az implantáció



előtt vagy után antigénnel töltötték meg. Vallerá és munkatársai [Cancer Research 42, 397-404 (1982)] tumorsejteket tartalmazó szivacsokat ültettek be egérbe, hogy megvizsgálják 16 napon át a vonzott sejtek összetételét, és úgy találták, hogy már egy korai időpontban is citotoxikus sejt prekursorok voltak jelen, és a citotoxicitás a 16. napon érte el a csúcsát. Kimutatták, hogy a korábban tumorsejtekkel immunizált egerekbe beültetett, tumorsejteket tartalmazó szivacsok esetében a citotoxikus sejtek sokkal gyorsabban jelennek meg a szivacsban. Egyik esetben sem mutattak citotoxicitást a lépből, nyirokcsomókból vagy peritoneumból származó sejtek, mely azt valószínűsíti, hogy a tamponban lévő antigénnel szembeni válasz erősen lokális jelelő.

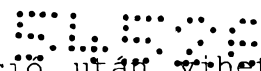
Jenski és munkatársai [J. Immunol. Methods 85, 153-161 (1985)] hasonló körülményeket használtak a sejtes immunválasz helyreállítódásának követésére antigénnel feltöltött szivacsok implantálásával olyan egerekben, melyek szubletális besugárzás után szingén csontvelő transzplantátumokat kaptak. Az immunitás helyreállítódását a szivacsokban a helyreállítódott sejtek citotoxikus T-limfocita aktivitásának mérésével határozták meg bizonyos időn át. Zangemeister-Wittke és munkatársai [J. Immunol. 143, 379-385 (1989)] tumor-immunis egerekbe beültetett szivacsokba injektáltak egy tumor vakcinát, és nyomon követték a másodlagos immunválasz létrejöttét a szivacs helyén. Semmilyen kísérő hatás sem jelentkezett az a beültetett szivacs közelében lévő nyirokcsomókban.

Chen és munkatársai [Cancer Research 54, 1065-1070 (1994)] T-sejteket gyűjtöttek besugározott tumorsejtekkel töltött szivacs

implantátumokból, hogy kimutassák, hogy ezeket a sejteket arra használhatóak fel, hogy adoptívan átadják az antitumor aktivitást. A szivacsból visszanyert, ezen kívül a regionális nyirokcsomókban és lépben lévő tumor-reaktív citotoxikus T-sejtek gyakoriságát mérték a tumorsejttel töltött szivacs-implantátumokat kapott állatokban. A szivacsok négyszer nagyobb gyakoriságban tartalmaztak tumorsejt-reaktív citotoxikus T-sejteket, mint a nyirokcsomók, és ötvenszer többet, mint a lép.

Míg jelentős kutatások folynak ezen hatásos és megfelelő vakcinák hiányának pótlására, a terápiás módszerekkel és anyagokkal kapcsolatos akadályok fennmaradtak. Ezért kívánatos lenne egy olyan módszer vagy módozat kifejlesztése, mely megoldaná a jelenlegi immunterápiával és hasonlóan a kezelési eljárásokkal, úgymint a profilaktikus és terápiás vakcinázással kapcsolatos problémákat, és ezáltal lehetővé tenné új, hatékony és eredményes stratégiák kifejlesztését az egészséges emlősök immunizálási és azok immunizálási hatékonyságának javítására, akikre az immunterápia gyógyító hatású. Továbbá az a képesség, hogy egy bizonyos antigénnel vagy az antigének sorozatával szembeni immunválaszt szuppresszálni tudunk, előnyös lehet például az allergiák kezelésében és a transzplantációs kilökődés megelőzésében. Ezért a találmány ezek és hasonló célok elérésére irányul.

A találmány értelmében eljárást biztosítunk egy antigénnel szembeni immunválasz módosítására egy emlősben úgy, hogy az emlős testébe egy porózus mátrixot tartalmazó, perforált, de egyébként nem áteresztő tartályt tartalmazó eszközt ültetünk be. Az antigén, amely ellen immunválaszt akarunk kiváltani, az eszköz porózus mátrixában található. Az antigén az eszközben benne



lehet az implantáció előtt, vagy az implantáció után vinnék be; az implantáció során az eszköz mátrixában már benne lévő antigént olyan biológiailag nem hozzáférhető formában biztosíthatjuk, mely az implantációt követően válik biológiailag hozzáférhetővé. Az eszköz az immunrendszer sejtjeit vonzani fogja, hogy azok találkozzanak az eszközben lévő antigénnel, és a találkozás módosítja az antigénre adott immunválaszt. A perforált tartály diffúziós gátként működik, az eszközben tartja az eszközön belüli immunsejtek által termelt citokinek és más kostimuláló faktorok nagy mennyiségét, melyek a többi immunsejtekkel való találkozásakor az eszközben fokozzák a kívánt immunválasz kialakulását. A perforációk lehetővé teszik az immunsejtek be- és kilépését. A kívánt immunválasz magában foglalhat sejtközvetített, nyálkahártya- és humorális immunitást, és egészséges emlősöknél és azoknál alkalmazható, akikre az immunterápia gyógyító hatású lehet.

A találmány alkalmazásakor például egy találmány szerinti eszközt az emlősbe történő beültetés előtt látunk el kis mennyiségű antigénnel. Előnyösen az antigént az eszköz porózus mátrixába az emlősbe való beültetés után három nappal visszük be, vagy az akkor válik az eszközben biológiailag hozzáférhetővé. Az antigénnel szemben egy erőteljes immunválasz indukálódik majd az emlősben.

Egy további megvalósítási módban az eszköz biológiailag lebomló anyagokból áll, melyek idővel végül a testben lebomlanak. Alternatív lehetőségként az eszköz a testből eltávolítható, miután a kívánt célt elértük.

Legtágabban szemlélve a találmány egy olyan ⁵emlős immunizálásra szolgáló eszközre terjed ki, mely a következők jellemzik: egy perforált, de egyébként nem áteresztő tartályban lévő porózus mátrix; az eszköz továbbá tartalmaz egy antigént, mely biológiaiilag hozzáférhető formában van a mátrixban az implantáció előtt, vagy biológiaiilag hozzáférhetővé válik a mátrixban az implantációt követően, vagy az antigént az implantáció után visszük be. Az eszközben lévő antigén hozzáférhetősége úgy szabályozható, hogy az antigént biológiaiilag nem hozzáférhető formában biztosítjuk, úgymint lassú felszabadulású készítményként, mint például amelyet a mikrogömbök, mikrokapszulák vagy liposzómák biztosítanak, melyek a lebomlás során az antigént kibocsátják az eszköz mátrixába.

Egy további megvalósítási módban a találmány szerinti eljárást és eszközt egy antigénnel szembeni immunválasz csökkentésére vagy leszabályozására alkalmazhatjuk egy emlősben, az eszközben egy bizonyos antigént nagy koncentrációban alkalmazva, ez az adott antigénre adott immunválasz szuppresszióját és az antigénre adott immunválasz kialakulásának gátlását okozza. Citokineket és más kostimuláló molekulákat is biztosíthatunk az eszközben.

A találmány szerinti eljárások és eszközök további alkalmazásai közé tartozik az immunsejtek összegyűjtése az eszközből, is újra bevitele a testbe adoptív immunterápia biztosítása céljából, az aktív immunizálás és az immunrendszer helyreállítására. További alkalmazások közé tartoznak a poliklonális antitestek (immunszérum) és monoklonális antitestek előállításának javított eljárásai, ide értve a humán monoklonális antitestek előállítását is humán immunsejteket hordozó állatokban.



Ahogy az a következőkben nyilvánvalóvá válik, az itt leírt találmányt alkalmazva egy nyirokszövet összetételét és szerepét utánzó mesterséges környezet előállításával, és az eszközben lévő antigén biológiai hozzáférhetőségének módosításával egy antigénnel szemben erőteljes válasz kialakulása érhető el. Bizonyos antigéneknél eltérő körülmények között egy meglévő immunválasz negatív irányba szabályozható.

Az ábrák rövid ismertetése:

Az 1. ábra a találmány szerinti eszközben lévő sejtpopuláció változásának időbeli lefolyását mutatja 9 napon át, miután egy emlős bőre alá ültettük be.

A 2. ábra az eszközben jelenlévő sejtek számának és típusának elemzését mutatja be a beültetés után négy nappal, anélkül, hogy az eszköz antigént tartalmazott volna.

A 3. ábra az eszközben lévő különböző sejttípusok populációiban bekövetkezett változást mutatja a beültetés utáni 4., 7. és 10. napon, bevitt antigén nélkül.

A 4. ábra az eszközbe bevitt antigén hatását mutatja a CD3-pozitív sejtekre (T-sejtek), a CD80-pozitív sejtekre (B-sejtek), és a CD14-pozitív sejtekre (makrofágok, az antigénprezentáló sejtek reprezentatív alcsoportjaként) az eszközben, a beültetés utáni 3., 7. és 10. napon. Az antigént az eszközbe a beültetést követő 4. napon vittük be.

Az 5. ábra a CD4 (helper T-sejtek) és CD8 (citotoxikus T-sejtek) pozitív sejtek expressziójában bekövetkezett változás elemzését mutatja be egerek lépeiben, egy olyan eszköz beültetése után tíz nappal, mely nem vagy különböző mennyiségű influen-

za-antigént tartalmaz, vagy a mancsokban antigénnel és adjuvánssal végzett immunizálás után.

A 6. ábra az egérből származó lép sejtek influenza antigénre adott proliferatív válaszának assayt ábrázolja, mely egerekbe antigént és adjuvánst vagy csak antigént tartalmazó eszközt ültettünk be, vagy a mancsot antigénnel és adjuvánssal immunizáltuk. A lép T-sejt proliferációt a gamma-interferon termeléssel mértük.

A 7. ábra influenza antigénnel és adjuvánssal mancsban immunizált egerek térdhajlati nyirokcsomóiból izolált T-sejtek gamma-interferon szekréciójának mértékét mutatja.

A 8. ábra a lép T-sejtek proliferatív válaszát mutatja, melyet a gamma-interferon szekréció mennyiségével mértünk olyan egerekben, melyeket influenza antigénnel és adjuvánssal vagy csak antigénnel immunizáltunk a találmány szerinti eszközt alkalmazva.

A 9. ábra a gamma-interferon szekréciós szinttel mért lép T-sejtek aktivációs szintjét mutatja adjuváns nélkül, ovalbumin különböző dózisaival immunizált egerekben, a találmány szerinti eszközt alkalmazva, és összehasonlítva az ugyanilyen dózistartományú, adjuvánssal együtt a mancsba injektált antigénnel immunizált állatok lépsejtjeinek proliferatív válaszaival.

A 10. ábra szintén gamma-interferon szekréciós szinttel mért lép T-sejtek proliferatív válaszát mutatja BCG adjuváns nélküli ovalbumin 0, 50 µg, 50 ng, 50 pg mennyiségével immunizált egerekben, a találmány szerinti eszközt alkalmazva, és összehasonlítva az ugyanilyen dózistartományú, Ribi adjuvánssal együtt a

mancsba injektált antigénnel immunizált állatok lépsejtjeinek proliferatív válaszaival.

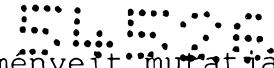
A 11. ábra a specifikus anti-antigén IgG2a választ mutatja be olyan állatokban, melyekbe a HIV gp120 peptid antigén különböző dózisait tartalmazó eszközt ültettünk be hasonló dózisú antigén és adjuváns mancsba adott injekciójával immunizált állatokkal.

A 12. ábra hasonló kísérletet mutat be, mint a 11. ábra, csak az első immunizálást egy emlékeztető injekció követett három héttel később, amikor a kezdeti immunizációs mennyiség 10 %-át adtuk be hasonló módon. Az állatokba beültetett eszközöket újra feltöltöttük az antigénnel.

A 13. ábrán összehasonlítjuk a HIV gp120 peptid elleni specifikus IgG2A antitestek kialakulását a találmány szerinti eszközzel Ribi vagy BCG adjuvánssal együtt vagy anélkül immunizált állatokban és ugyanezekkel az adjuvánssokkal, hagyományosan mancsban immunizált állatokban.

A 14. ábra a fajlagos IgG2a antitest szinteket ábrázolja különböző dózisú citokróm C antigénnel immunizált állatokban, a találmány szerinti eszközt alkalmazva adjuváns nélkül, vagy hagyományos mancs immunizálást alkalmazva Ribi adjuvánssal. A keringő IgG2A mennyiséget az egér szérumok sorozatos hígításaival mutattuk ki.

A 15. ábra az összes, influenza vírus specifikus IgG szintjét mutatja be, mely az egerek 0,1 µg vagy 10 µg influenza hemagglutinin fehérje fragmentummal (BHA) és a találmány szerinti eszközzel adjuváns nélkül végzett immunizációja után alakul ki, összehasonlítva ugyanilyen mennyiségű antigénekkal, melyeket Ribi adjuvánssal a mancsba adtunk be.



A 16. ábra egy T-sejt aktivációs assay eredményeit mutatja be gamma-interferon leolvasást alkalmazva. Az egereket influenza antigénnel immunizáltuk a találmány szerinti eszközt alkalmazva adjuváns nélkül, és összehasonlítottuk az adjuvánssal együtt beadott antigénnel végzett mancs-immunizálással, és szintén összehasonlítottuk egy beültetett porózus polimer mátrixban lévő antigénnel (mely nem egy perforált tárolóban van, mint a találmány szerinti eszköz esetében) végzett immunizálással.

A 17. ábra a fenti, egy nem rokon antigénnel (EBV) végzett kísérlet eredményeit mutatja be influenza ellen immunizált egerek lép sejtjeinek *in vitro* immunpróbája után, mely a találmány szerinti eszközzel végzett immunizálás után kialakult válasz specifikusságát jelzi.

A 18. ábra egy önmagában alkalmazott szivacs fehérje (marha szérum albumin) diffúziós tesztjének eredményeit ábrázolja a találmány szerinti eszközzel összehasonlítva.

A 19. ábra a találmány szerinti, influenza antigént tartalmazó vagy nem tartalmazó eszközből kivont sejtek fenotípusát ábrázolja, 4 nappal az egérbe történő beillesztés után. A kezeletlen egerekből származó perifériás vér limfociták ugyanilyen sejttípusaihoz tartozó értékeket is bemutatjuk.

A 20. ábra a találmány szerinti eszközben antigén nélkül megtalálható stimuláló citokinek mennyiségeit mutatja a szérumban lévő mennyiségükkel összehasonlítva.

A 21. ábra a citotoxikus T-sejt elicitáció mértékét mutatja be influenzával fertőzött célsejt lízissel mérve, a találmány szerinti influenza vírus vakcinát tartalmazó beültetett eszközt



alkalmazva, és olyan állatokkal összehasonlítva, melyeket szubkután influenza vírussal és adjuvánssal immunizáltunk.

A 22. ábrán összehasonlítjuk az influenza vírust tartalmazó találmány szerinti eszközzel immunizált egerekben az influenza vírus specifikus IgG1 mennyiségével mért humorális választ olyan egerekkel, melyeket vakcinával és adjuvánssal szubkután immunizáltunk.

A 23. ábra az influenza vírus vakcinát tartalmazó találmány szerinti eszközzel immunizált állatokban létrejött influenza-specifikus IgG1 affinitást mutatja összehasonlítva a vakcinával és adjuvánssal szubkután immunizált állatokkal.

A 24. ábra influenza vírussal immunpróbázott egerek túlélését mutatja influenza vírus vakcinát tartalmazó találmány szerinti eszközzel végzett immunizálás után, összehasonlítva a vakcinával és adjuvánssal szubkután immunizált egerekkel.

A 25. ábra a találmány szerinti eszközt alkalmazva, SCID egerekben létrejött influenza-specifikus humán IgG antitestek titerét ábrázolja, az intramuszkuláris immunizálással összehasonlítva.

A 26. ábra influenza antigén (a 25. ábránál leírt antigén) elleni szérum antitestek affinitását mutatja, az antigén intramuszkuláris beadásával keletkezett antitestekkel összehasonlítva.

A 27. ábra az immunválasz szuppresszálasát mutatja egy találmány szerinti eszközben lévő antigén nagy mennyiségeivel.

A 28. ábra a találmány szerinti eszköz alkalmazását mutatja be plazmid DNS-sel való immunizálásra.

A 29-31. ábra a találmány szerinti eszköz alkalmazását mutatja be egy poliszacharid antigénnel szembeni immunválasz létrehozására.

A 32. ábra a találmány szerinti eszköz alkalmazását mutatja be egy nagyon konzerválódott, és így gyengén immunogén antigénre, a ciklofolinre adott immunválasz kiváltására.

A 33. ábra a találmány szerinti eszköz alkalmazását mutatja be egy parazita antigénre adott immunválasz kiváltására teljes állatokat használva.

A találmány eljárást biztosít egy antigénre adott immunválasz módosítására egy emlősben egy beültethető eszközt alkalmazva, mely az antigént szabályozott módon mutatja be az immunrendszer sejtjeinek. Egy nyirokcsomó összetételét és szerepét utánzó mesterséges környezet létrehozásával és az eszközben lévő antigén biológiai hozzáférhetőségének manipulálásával, egy erőteljes immunválasz váltható ki egy antigénnel szemben, vagy egy meglévő immunválasz negatív irányba szabályozható. Az eszköz egy porózus mátrixot tartalmaz, azaz egy szivacs-szerű anyagot, mely egy perforált, de egyébként nem áteresztő fedőréteggel vagy fallal van körülvéve, illetve ez tartalmazza, melyre a leírásban tártályként hivatkozunk. A perforált tartály diffúziós gátként működik, hogy az immunsejt szekréción termékek nagy koncentrációban maradjanak az eszközön belül. Az antigén, mellyel szemben immunválaszt akarunk kiváltani, vagy negatív irányba kívánjuk szabályozni, az eszköz porózus mátrixában, azelőtt vagy azután van jelen, mikor az eszközt a bőr alá helyezzük. Egy erőteljes immunválasz kiváltására az antigén előnyösen körülbelül három nappal az eszköz beillesztése után biológiailag hozzáférhető az

eszköz mátrixában. Ez úgy érhető el, hogy az antigént körülbelül ebben az időben injektáljuk az eszközbe, vagy egy olyan eszközt használunk, amelyben a mátrix az antigénnek egy lassú felszabadulású formáját tartalmazza, mely körülbelül három nap múlva válik biológiailag hozzáférhetővé. Egy bizonyos antigénnel szembeni immunválasz negatív irányú szabályozására vagy szuppresszáására, az adott antigéntől függően, biológiailag teljesen hozzáférhető antigénnel látjuk el az eszközt, mielőtt azt az emlősbe beültetnénk. Abban a példában, ahol az antigént azután helyezzük az eszközbe, miután az eszközt beültettük, az antigént az eszközbe a bőrön keresztül egy fecskendőt és bőr-alatti tűt alkalmazva juttathatjuk be, az eszköz helyzetének megállapításával és a tűnek az eszközbe illesztésével. Az eszköz a helyén hagyható vagy eltávolítható a testből. Biológiailag lebomló anyagokból készíthető, mely idővel végül a testen belül felbomlik, vagy eltávolítható, miután a kívánt hatást elértük. Az antigén egy eszközbe később újra bevihető. Az antigén az eszközben önmagában vagy egy adjuvánssal vagy adjuvánssok kombinációjával együtt alkalmazható. Előnyösen adjuváns nélkül alkalmazzuk.

A találmány az immunterápia számos formájának javított eljárását kínálja, ahol egy kívánt immunválaszt alakítunk ki vagy megnövelünk egy antigénnel szemben, és ennek az ellenkezőjét, amelyben egy meglévő immunválasz vagy egy immunválasz kialakulásának képessége egy bizonyos antigénnel szemben szuppresszáható illetőleg meggátolható. Ezek vakcinázást, úgymint bizonyos antigénekkal szembeni egészséges emlősök vakcinázását és terápiás vakcinázási eljárásokat foglalnak magukban. Az immunválasz gát-

lását vagy szuppresszálasát alkalmazhatjuk egy emlősnél, mielőtt az az adott antigénnel találkozna, mint például egy leendő transzplantációs betegnél, egy olyan emlősnél, mely várhatóan egy allergénnek lesz kitéve, vagy egy olyannál, aki hajlamos egy exogén vagy endogén antigénre adott immunválasz kialakítására, mint például autoimmun betegségekben. Egy immunválasz szuppresszálasa hasznos lehet egy antigénnek való kitétel után, mint például egy antigénre adott allergiás vagy anafilaktikus választ adó emlősnél, vagy egy transzplantátum kilökődést elszenvedő személynél. A találmány szerinti módszerek és eszközök az immunitás összes formája felé irányulhatnak, ide értve a sejtközvetített, humorális és nyálkahártya-immunitást.

Az eszköz elrendezése és alkalmazási módszere serkenti az emlős nyirokszövet és különösen egy nyirokcsomó szerkezetét és funkcióját. A testben a bejutott idegen antigéneket az antigénprezentáló sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek veszik fel és dolgozzák fel, melyek belépnek a nyirokcsomókba, és az antigénből származó immunogén peptideket egy adott MHC antigénnel képzett konformációban mutatják be a T-limfocitáknak. A T-sejtek egy speciális csoportja (CD-4 Th2) segítséget nyújt a B-sejteknek, és segíti a nagy affinitású humorális válasz kialakulását. A B-sejtek az antigénekkal közvetlenül léphetnek kölcsönhatásba (különösen a több egységből álló antigének és a visszatérő antigének), és az immunizáló antigénre fajlagos antitesteket kiválasztó plazmasejteké differenciálódnak. Az antigénprezentáló sejtek is kibocsátanak citokineket, limfokineket és kemokineket, melyek szintén részt vesznek az immunválasz kialakításában. Az eszköz perforált tartály része egy

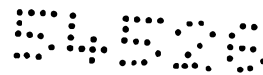
diffúziós gátat tart fenn, mely fenntartja az antigénnek és immunsejt szekréciós termékeknek a szintjeit az eszközön belül, de lehetővé teszi az immun- és más sejtek belépését az eszközbe és kijutását az eszközből. Úgy találtuk, hogy az antigén nagyon kis mennyisége elegendő egy erőteljes immunválasz kiváltására. Az eszközben jelenlévő antigén és az eszközben lévő immunsejtek és kostimuláló molekulák közötti kölcsönhatás tehát optimalizálható, hogy az antigénre adott immunválasz kialakulását fokozzuk, valamint hosszú ideig tartó immunitást biztosít a memóriasejtek populációjának termelésével.

A találmány szerinti eszköz beültetése az emlős testbe egy úgynevezett steril tályogot létesít, melyben az immunrendszer bizonyos sejtjei az idegen testhez vonzódnak, és a korlátozott számú perforáción keresztül belépnek. Az első pár nap múlva egy megnövekvő sejtpopuláció halmozódik fel az eszközben még antigén nélkül is. Amikor az eszközben lévő antigén biológiailag hozzáférhetővé válik, körülbelül a harmadik napon, és az immunrendszer mátrixban lévő sejtjei találkoznak az antigénnel, az antigénprezentáló sejtek felveszik és feldolgozzák az antigént, és bemutatják a T-limfocitáknak. Mivel az eszköz a perforált tartály útján korlátozza a külvilágnak való kitételt, az immunsejtek be tudnak lépni, de az antigén az eszközben marad, és koncentrációja magas marad, ahogy az eszközben lévő sejtek által szekretált kostimuláló faktorok koncentrációja is, hasonló módon, mint egy nyirokcsomóban. Miután a T-limfociták felkészülnek és aktiválódnak, elhagyhatják az eszközt a korlátozott számú perforáción át, és újra belépnek a keringésbe. Tehát az eszköz biztosítja az antigén szabályozott bemutatását az immunrendszer

sejtjeinek, és a citokinek és egyéb, egy erőteljes immunválasz kialakulásához szükséges faktorok mennyiségének fenntartását. Ahogy a további példákban látni fogjuk, az eszköz több nagyságrendű javulást biztosít egy bizonyos antigénre adott immunválasz kialakulásában.

Egy további elméleti megfontolás alapján, egy bizonyos antigén nagy mennyiségét tartalmazó találmány szerinti eszköz beépítése a fent leírtakkal ellenkező módon funkcionálhat, ahol ez negatív irányba szabályozhatja vagy szuppresszálhatja egy meglévő vagy potenciális antigénnel szembeni immunválaszt. A T-sejtek találkozása a nagy mennyiségben jelenlévő antigénnel nyilvánvalóan az antigén-specifikus T-sejtek apoptózist indítja be, így eliminálva az antigén-specifikus T-sejteket és a progenitorokat, hatásosan elnyomva a sejtközvetített választ és az antigén felé irányuló humorális választ is.

Az antigén stimulussal és citokinek (úgy mint IL-2, IL-4, γ -IFN, IL-12) hozzáadásával közvetített vagy egy immunis állapotban (azaz mielőtt az aktivációs állapot lecsökken) a T-sejteket további antigén stimulussal kitéve létrejött T-sejt hiperaktiváció a sejtek apoptózist, és az antigén specifikus repertoárból a reaktív klónok (B vagy T-sejtek) delécióját fogja kiváltani. Egy bizonyos antigén megfelelő koncentrációjának kiválasztása az immunválasz stimulálására vagy szuppresszálására egy találmány szerinti eszközt alkalmazva, egy gyakorlott szakember számára ismert vagy könnyen meghatározható. Egy bizonyos antigén immunogenitása és így egy bizonyos antigén immunszuppresszív és immunstimuláns dózisainak tartománya a



szakterületen ismert módszerekkel *in vivo* vagy *in vitro* meghatározható.

Továbbá a találmány szerinti eszközt alkalmazva létrehozható válasz túltesz a hagyományos immunizációs módszerekkel elérhető válaszon, mely módszerek általában az állatok esetében adjuvánsok alkalmazását foglalják magukban. Elméleti alapon úgy tűnik, hogy az antigén önmagában történő, szabályozott bemutatása az immunsejteknek, és az eszközben lévő kostimuláló faktorok optimális környezetet biztosítanak egy erőteljes immunválasz kialakításához, mely meghaladja azt, ami az adjuvánsok alkalmazásával elérhető.

Az immunizálás hatásos módszert kínál a megelőzésre számos fertőző betegség ágensével szemben, úgymint vírusok, például influenza, HIV, papillóma, hepatitisz, citomegalovírus, polio- és veszettségvírus; baktériumok, például *E. coli*, *Pseudomonas*, *Shigella*, szifilisz, mikobaktériumok, *Chlamidia*, *Rickettsiák*, és *Serratia marescens*; gombák, például *Aspergillus* és *Candida*; és protozoák és többsejtes paraziták, például *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Onchocerca*, és amőbák. Az immunizáció egy terápiás vakcina potenciális alkalmazását kínálja egy olyan egyed kezelésére, aki már egy fertőző betegségben szenved. Továbbá olyan nem fertőző betegségek előzhetők meg vagy kezelhetők az immunizáláson keresztül, mint a rák. Számos antigén azonban kevésbé immunogén, és az immunizáció nem bizonyul megfelelő stratégiának ezeknek a betegségeknek a megelőzésére vagy kezelésére. Az adjuvánsok, úgy ahogy szokásosan alkalmazzuk az állatok immunizálására, nem alkalmasak az immunválasz megnövelésére. Továbbá egy egyed vagy beteg immunrendszere lehet, hogy nem működik op-



timálisan ahhoz, hogy képes legyen egy olyan antigénnel szemben immunválaszt létrehozni, mely különben egy erőteljes immunválaszt hoz létre egy egészséges egyedben. Ezek a helyzetek a találmány szerinti eszköz alkalmazásának lehetőségét nyújtják egy erőteljes immunválasz stimulálására ott, ahol hagyományos immunizációs eljárásokkal egy ilyen válasz nem lehetséges.

Az immunválasz szuppresszálása is kívánatos lehet bizonyos állapotok, mint például allergiák kezelésére vagy a betegek arra történő előkészítésére, hogy idegen antigénnel találkozzanak, mint például a transzplantátumok esetében. Feltételezzük, hogy a nem megfelelő immunválaszok az alapvető kórokai számos autoimmun és más betegségeknek, mint például az I-es típusú diabétesznek, a reumatoid arthritisznek, szklerózis multiplexnek, uveitisnek, szisztémás lupus erythematosusnak, myasthenia gravisnak és a Graves betegségnek. Egy találmány szerinti, a gyanús antigént tartalmazó eszköz beültetésével egy egyedbe, az antigén felismerésére aktivált T-sejtek belépése kiválthatja az apoptózist, és ezek a sejtek eliminálódnak az immunrendszerből. A progenitor antigén-specifikus sejtek eliminációja lehetővé tudja tenni az idegen antigének transzplantációját kilökődés nélkül.

A találmány további alkalmazásai poliklonális antitestek (immunszérum) és monoklonális antitestek a laboratóriumi állatokban történő jobb előállítási eljárásait és az így létrejött kívánt típusú antigének kinyerését foglalja magában. Az egyik megvalósítási módban egy csak kis mennyiségben hozzáférhető antigén elleni poliklonális (immunszérum) és monoklonális antitestek előállítására szolgáló eljárást lehet végrehajtani a találmány szerinti eszközzel. A ritka antigén kis mennyiségével lát-



hatjuk el az eszközt abból a célból, hogy az állatot immunizáljuk, majd ezután a lépsejteket összegyűjtjük. Ez az eljárás a jelenlegi, a ritka antigénnek közvetlen lépbe juttatásából álló fárasztó és megjósolhatatlan kimenetelű eljáráshoz képest javított módszert kínál. Továbbá az emlékeztető immunizálás szükségessége elkerülhető a találmány szerinti eszköz alkalmazásával, és az immunválasz sokkal gyorsabban hozható létre. Az állatok immunizálásához szükséges lerövidült idő lehetővé teszi a monoklonális antitestek gyorsabb létrehozását is. Egy másik megvalósulási az immunsejtek egy állatnak az eszközben biztosított antigénnel végzett immunizálása után az eszközből gyűjthetők össze módon a hibridómák előállításához. Ezt az eljárást arra is alkalmazhatjuk, hogy humán monoklonális antitesteket hozzunk létre úgy, hogy egy találmány szerinti eszközt ültetünk be egy egyedbe, az eszközt antigénnel töltjük fel, és ezután a hibridómák előállításához összegyűjtjük az immunsejteket az eszközből. A fent említett poliklonális antitesteket (immunszérum) és monoklonális antitesteket diagnosztizáláshoz, alapkutatásra, képalkotásra és/vagy kezelésre alkalmazhatjuk. Egy másik megvalósulási módon humán monoklonális antitestek hozhatók létre a találmány szerinti eszközt alkalmazva, melyet egy súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egérbe ültettünk, a következő módon. Először, humán perifériás vér limfocitákat injektálunk egy SCID egérbe, ahol a humán limfociták benépesítik az egér immunrendszerét. Miután a találmány szerinti, kívánt antigént tartalmazó eszközt beültettük, mely antigén körülbelül három nappal a beültetés után válik biológiailag hozzáférhetővé, majd az eszközből összegyűjtöttük a sejteket, olyan humán B-limfociták állnak ren-

delkezésünkre, melyeket ezután a kívánt antigén elleni humán antitesteket szekretáló hibridómák készítésére alkalmazhatunk.

A találmány szerinti eszköz egy további alkalmazása abból áll, hogy az immunsejteket összegyűjtjük egy emlősből, és később újra bevisszük az emlősbe. A sejtek az eszközből úgy nyerhetők ki, hogy például a beültetett eszközből kiszívjuk, vagy az eszköz testből történt eltávolítása után a polimer mátrixot feloldjuk, majd a sejteket tárolás után, például lefagyasztva, az emlősbe egy későbbi időpontban visszavihetjük. Ez különösen hasznos lehet azoknál az emlősöknél, amelyek a teljes testre kiterjedő besugárzáson esnek át. A találmány szerinti eszköz antigén nélkül is beültethető és hat-tíz napig bent tartható, majd ezt követően az eszköz és tartalma eltávolítható, és a benne lévő sejtek fagyasztással tartósíthatók. A sugárkezelést követően az emlős rendelkezésére állhatnak a testbe visszavitt T-sejtek, ezáltal az immunrendszer helyreállítódik. Ennek az alkalmazásnak egy másik megvalósulási módjában kostimuláló faktorok, mint például az immunsejtek proliferációját kiváltó citokinek vihetők be az eszközbe az összegyűjtés előtt, hogy megnöveljük az eszközben a sejtek hozamát. Egy másik megvalósítási módban az antigént tartalmazó eszközből összegyűjtött immunsejtek aktív immunizálásra használhatók, az eljárás során a sejteket tárolhatjuk, és később újra bevihetjük az emlősbe, például egy kemoterápiás kezelés vagy más kezelési eljárás után. Egy további megvalósulási módban az eszközből összegyűjtött T-sejteket fagyasztással tartósíthatunk, és egy későbbi időpontban egy antigénnek tehetünk ki (például egy rák antigénnek) a T-sejtek ex vivo szaporításá-



hoz, mielőtt a testbe bevinnénk az adaptív immunterápia céljából.

A találmány egy másik alkalmazási módjában az eszközt az eszközben lévő immunsejtek génekkel való transzfektálására alkalmazhatjuk. A transzfektált immunsejtek aktiválhatják az eszközben lévő immunsejteket és/vagy miután az eszközből kijutottak, a távolabbi szervekben lévő immunsejteket aktiválhatják. Például egy tumorspecifikus antigént vagy virális, bakteriális vagy parazita antigént kódoló DNS, RNS vagy cDNS helyezhető az eszközbe a megfelelő fehérje antigénnel együtt vagy anélkül. Az eszközbe bejutó antigénprezentáló sejtek transzfektálódhatnak a génnel, majd kifejezhetik az antigén-fehérjét és a testen belül perifériás helyekre vándorolhatnak, ahol az immunsejteket stimulálni fogják.

A találmány szerinti eszköz a gyakorlott szakember számára ismert eljárásokkal állítható elő, és a méret és az alak úgy változtatható, hogy az elrendezés lehetővé tegye azt, hogy az itt leírt módon működjön. Ahogy fentebb leírtuk, az eszköz egy diffúziós gátat biztosít a kis molekulák számára, így az eszközbe bevitt antigén és az eszközben lévő immunsejtek által szekretált citokinek és más faktorok számára, de lehetővé teszi az immunsejtek be- és kilépését az eszközbe és az eszközből. Tehát a fehérjék és más kismolekulák passzív diffúziója korlátozott, viszont az immunsejtek aktív mozgást hajtanak végre az eszközbe és az eszközből. Az egyik megvalósítási módban az eszköz a bőrön ejtett kis bemetszésbe történő kényelmes beillesztéshez és szükség esetén a későbbi letávolításhoz egy rövid csődarabból, biológiailag semleges műanyag csőből, mint például



szilikon csőből lehet kialakítani. Porózus polimer mátrixot, az- az egy szivacs-szerű anyagot illesztünk a cső furatába. A nyi- tott végeket vagy lezárjuk, vagy nem. A cső falába kisszámú lyu- kat készítünk. A kis lyukak számának formájának és méretének változatai a találmány oltalmi körébe tartoznak. Az antigént az antigénnek vagy az antigén biológiailag nem hozzáférhető alakjá- nak oldat vagy szuszpenzió formájában vihetjük be, az előállítás során a mátrixba beépítve, vagy a mátrixba injektálva a cső egyik végén vagy magának a csőnek a falán keresztül. Az antigént az eszköz mátrixában közvetlenül is biztosíthatjuk, erre a le- írásban úgy hivatkozunk, hogy biológiailag hozzáférhető vagy bi- ológiailag teljesen hozzáférhető forma, vagy olyan biológiailag nem hozzáférhető formában biztosíthatjuk, mely később válik bio- lógiailag hozzáférhetővé. Megfelelő, ha az antigént egy olyan készítménybe építjük, mely szabályozott felszabadulást, hosszan tartó felszabadulást vagy lassú felszabadulást biztosít, az ilyen eljárások és készítmények közé tartozik a mikrokapszulázás, a liposzómák és a mikrogömbök. Előnyösen az antigénre adott immunválasz stimulálása vagy növelése céljából a formulált antigén az eszköz mátrixában körülbelül három nappal a beültetés után válik biológiailag hozzáférhetővé. A megfelelő felszabadulású készítmények a szakterületen ismertek.

Egy másik megvalósítási módban az eszközt egy polimer mátrix anyagból az eszköz kívánt végleges formájában készítjük el, és egy át nem eresztő fedőréteget viszünk fel rá. A perforációt ezt követően végezhetjük el. Alternatív lehetőségként, egy bizonyos porozitású és bizonyos mértékben keresztkött polimer mátrixot extrudálhatunk az eszköz kívánt formájára, és ezután a külsejét

kezelhetjük egy szerrel, hogy az eszköz felszínén a polimer további keresztkötéseit hozzunk létre, hogy egy nem áteresztő fedőréteg vagy tartály hatásos alakját hozzuk létre. A fedőréteget ezt követően perforálhatjuk, és az antigént bevihetjük. Az eszköz felszínének fokozott polimerizációját úgy is elérhetjük, hogy a felszínt ultraibolya fénnel kezeljük, ha ultraibolya fénnel kezelhető polimert alkalmazunk. Az itt rendelkezésre bocsátott példákat a korlátozás szándéka nélkül mutattuk be, mivel egy gyakorlott szakember könnyedén tud majd egy fent említett tulajdonságokkal rendelkező megfelelő eszközt tervezni.

Az eszközben lévő anyagok a megfelelő természetben előforduló vagy szintetikus készítmények széles köréből választhatók ki. Az egyik megközelítési módban a polimer mátrix egy biológiailag kompatibilis mátrix, mint például hidroxilezett polivinil-acetát lehet. Egy másik mátrix a poliuretán, ez széles körben hozzáférhető. Egyéb alkalmas anyagok közé tartozik az etilén/vinil-acetát kopolimer, politejsav, poliglikolsav, polilaktid-glikolid kopolimer, kollagén, keresztkötött kollagén és zselatin.

Ahogy fentebb ismertettük, a perforált de egyébként nem áteresztő gátat vagy fedőréteget a polimer mátrix körül számos módon valósíthatjuk meg. Az egyik megvalósítási módban a polimer mátrix darabjait helyezzük egy biológiailag kompatibilis műanyag cső, mint például egy szilikoncső üregébe. Egy példában egy 2,5 cm-es csődarabot, melynek belső átmérője 0,15 cm és külső átmérője 0,2 cm egy megfelelő 2,5 cm-es előnedvesített hidroxilezett polivinil-acetát mátrix darabbal láttunk el. Más példákban a gátat vagy fedőréteget egy megfelelő természetben előforduló vagy szintetikus anyagból készíthetjük el, mint például műanyag vagy

más polimerből, keresztkötött kollagénből, polietilénből, szilikonból, latex gyantából, polisztirénből, akril gyantából, polivinil-pirrolidonból, és ezeknek az anyagoknak a kombinációiból. Egy kereskedelmi forgalomban hozzáférhető anyag a SILASTIC[®] szilikoncső a Dow Corning-től. Ezek a nem korlátozó jelelgű példák egyszerűen csak a találmányban felhasználható megfelelő készítmények körét példákon keresztül mutatják be.

A találmány szerinti eszköz előállításának nem korlátozó jelelgű példaként és összhangban az eszköz fent említett kívánt jellemzőivel, mely eszköz lecsökkenti a kis molekulák diffúzióját az eszközből, de lehetővé teszi az immunsejtek be- és kilépését, az eszközt a következőképpen állíthatjuk elő manuálisan. Egy 28,575 mm (1,125 hüvelyk) hosszú, 1,1938 mm (0,047 hüvelyk) külső átmérőjű és 0,5969 mm (0,0235 inch) szilikon csövet használhatunk a találmány szerinti eszköz nem áteresztő tartályaként. A lukakat kézzel fúrhatjuk egy 20-as méretű hipodermális tűvel az eszköz falán át, mely körülbelül 1,5875 mm 0.79375 mm (1/16 és 1/32 hüvelyk) átmérőjű lyukakat hoz létre. Húsz lyukat készítünk a csőben. Ezek a paraméterek az eszköz jellemzőinek csak útmutatóiként szolgálnak, és a gyakorlott szakember ismer más olyan paramétereket, melyekkel a fent ismertetett célok elérhetők, azaz a korlátozás nélküli sejt be- és kilépés, viszont az eszközön belüli kis molekulák, mint például citokinek diffúziójának csökkenése és korlátozása.

Egy találmány szerinti biológiailag lebontható eszköz olyan anyagokból álló mátrixot és tartályt tartalmazhat, melyekről tudjuk, hogy lassan bomlanak le a testben. Ilyen anyagok közé tartozik a zselatin, kollagén, keresztkötött kollagén,

politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, és más a szakterületen jártasak számára ismert anyagok. Tehát egy előnyben részesített, az immunválasz stimulálására szolgáló eszköz egy biológiailag lebomló tartályt, egy biológiailag lebomló mátrixot, és a mátrixon belül az antigén egy biológiailag lebomló lassú felszabadulású készítményét tartalmazza. Az említett készítmény az antigént körülbelül három nappal a beültetés után bocsátja ki; a mátrix és a tartály jelentősen az eszköz hasznos élete után, körülbelül a beültetés után 10 nappal kezd biológiailag lebomlani.

Az eszköz tartályának perforációit a számos módszer közül bármelyikkel elkészíthetjük, ide tartoznak a kézi és automatizált módszerek. A lyukak kis száma az optimális, előnyösen a csövön körülbelül 10 lyuk centiméterenként, bár ez valamennyire az eszköz méretétől és formájától függ majd. A fenti elméleti megfontolások szerint a perforáció szerepe az, hogy lehetővé tegye az immunrendszer sejtjeinek a bejutását az eszközbe, melyek ezután érintkezésbe lépnek az antigénnel és a kostimuláló molekulákkal, hogy aktiválódjanak, és hogy ezután lehetővé tegye az aktiválódott T-sejtek kilépését. Ezeket a célokat úgy kell elérni, hogy ugyanekkor a perforált eszköz tartalmazza és fenntartsa az immunsejtek által termelt antigén és kostimuláló faktorok, úgymint citokinek kívánt szintjét az eszközben. Ezek a feltételek a perforáció megfelelő számával és méretével érhetőek el, ahogy ezt lentebb a példákban bemutatjuk. Abban az esetben, ahol az eszközt egy csődarabból készítjük el, a cső végeit nyitva hagyhatjuk, hogy perforációként valamint befogadóhelyként működjön az antigén betöltésére szolgáló tű vagy más eszközök bevezetéséhez a beültetés előtt vagy a beültetés után.

Az eszköz egy olyan alkalmas helyen ültethető be a testbe, ahol könnyű a beillesztése és az antigén betöltése, és az eltávolítás úgy hajtható végre, hogy az a betegnek csak minimális kellemetlenséget okozzon. Egy alkalmas hely az alkar középső felszíne. Egy másik megvalósítási módban az eszközt biológiailag olyan mértékben lebomló anyagokból készítjük, mely eszköz a hasznos élete után lebomlik, és nem szükséges eltávolítani.

Egy immunválasz stimulálására a biológiailag hozzáférhető antigén az eszközben az implantáció időpontjában vagy előnyösen utána jelen lehet, ebben az esetben az időpont előnyösen körülbelül három nap a beültetés után. Az antigén egy biológiailag nem lebomló, lassú felszabadulással jellemezhető készítménye a beültetés időpontjában már benne lehet az eszközben, mely az antigént az eszköz mátrixába körülbelül három nappal a beültetés után bocsátja ki. Körülbelül három nappal a beültetés után, a sejtek megfelelő száma és típusa képes válaszolni az eszközben lévő antigén jelenlétére az ezekből a sejtekből szekretálódott citokinekkal és kostimuláló molekulákkal együtt, és a perforált tartály által biztosított diffúziós gát eredményeként bennmaradnak az eszközben, és az antigén ezt követő bevitele az eszközbe egy optimális immunválasz kialakulását indítja el.

Az eszköz, ha nem biológiailag lebomló anyagokból készítjük el a fentebb ismertetett módon, egy egyszerű műtéti eljárással eltávolítható, miután végrehajtotta a kívánt funkcióját. Általánosságban körülbelül 10 nap után az immunsejt populáció kilép az eszközből és az tovább nem működik. Másrésről, az eszközt újra feltölthetjük antigénnel egy későbbi időpontban azért, hogy beindítsuk az immunválaszt.

Ahogy fentebb leírtuk, az immunválasz kívánt stimulálásának vagy szuppresszáálásának magvalósításához fontos az eszközben lévő antigén biológiai hozzáférhetőségének időzítése, és ez az adott antigén jellemzőitől függ. Általánosságban az eszköz implantációjának időpontjában a biológiailag teljesen lebomló antigén nagy koncentrációja az antigénre adott immunválaszra szuppresszáoló hatással lesz. Szintén általánosságban, az eszköz beültetésének időpontjában a biológiailag teljesen lebomló antigén kis mennyisége az antigénre adott immunválaszra stimuláló hatással lesz. Ezek a körülmények az eszközben használandó adott antigén jellemzőitől függően, a találmány alkalmazhatóságának csökkentése nélkül változtathatók. Egy gyakorlott szakember képes felmérni egy adott antigén immunogenitását szokásos *in vitro* vagy *in vivo* eljárásokkal, és képes meghatározni az antigén megfelelő koncentrációját ahhoz, hogy a kívánt hatást elérje.

A találmány szerinti eszköz alkalmazási eljárása egy antigénre adott immunválasz fokozására vagy stimulálására arra szolgál, hogy immunsejtek, T- és B-limfociták populációját hozza létre, melyek az eszközben használt antigénnel szemben egy hatásos immunválaszt keltenek.

A találmány egy másik tárgya egy fajlagos antigénnel szembeni immunválasz negatív irányú szabályozása a fentebb említett eljárást és eszközt alkalmazva. Egy antigén nagy dózisainak a bevitelle az eszközbe, az eszközbe belépő és az antigénnel találkozó immunsejtekben apoptózist vált ki. Az olyan állapotok, mint a graft- és transzplantátum-kilökődés, megelőzhetők és kezelhetők, ha a recipienst a transzplantációt megelőzően vagy után a donor

antigént tartalmazó találmány szerinti eszközzel látjuk el. Azok közé az általános állapotok közé, melyek az immunválasz negatív irányba történő szabályozásával gyógyíthatók, a következők tartoznak: transzplantáció, melyben kívánatos, hogy a recipienst donor vérsejtekkel tegyük toleránssá, hogy a donor grafftal szemben a recipiens immunválaszát negatív irányba szabályozzuk, autoimmun betegségek, melyekben az autoantigénekkal szembeni tolerancia kívánatos, hogy korlátozzuk a patogén T-sejteket, és enyhítsük az endogén antigénekkal, mint például a rheumatoid arthritisnél a kollagénnel képzett immunkomplexek képződését, diabétesz, melyben kívánatos, hogy a diabetikus beteg toleráns legyen az inzulinnal vagy a GAD-dal szemben, és a myasthenia gravis, melyben a betegek toleránssá tehetők, hogy elkerüljük az acetilkolin receptorral szembeni immunválaszt. Továbbá az allergiákat és allergiás reakciókat jellemző immunválasz a beteg toleránssá tételével vagy deszenzitizálásával kezelhető az allergénre adott immunválaszért felelős immunsejtek apoptózisának indukálásával. A találmány szerinti eszközben az immunválasz szuppresszáására alkalmazható allergiák és antigének közé tartozik például a DERP-1 macska allergia allergén és az urushiol -módosított peptidek által okozott szömörce/tölgy allergiák.

A következő példákat a találmány előnyös megvalósítási módjainak teljesebb szemléltetése céljából mutatjuk be. Ezek azonban semmiképp sem értelmezhetők találmány oltalmi körének szűkítéseként.

1. példa

A találmány szerinti eszköz egy példáját készítettük el egy 2,5 cm hosszú szilikoncsövet használva, melynek belső átmérője 0,15 cm és külső átmérője 0,2 cm, mely hidroxilezett polivinil-acetát szivacs 2,5 cm hosszú darabjával van töltve. Az eszközt sterilizáció céljából foszfáttal pufferolt sóoldatot tartalmazó tartályba merítettük és autoklávoztuk. Nőstény BALB/c egereket (6-8 hetesek) Avertinnel elaltattunk. Az eszközt egy 0,5 cm hosszú háti középvonal bemetszésén keresztül illesztettük be az 1. napon. Néhány állatba 50 μ l, 1 mg/ml influenza antigént (FLUSHIELD® influenza vírus vakcina, trivalens A & B típusok; Henry Schein®-től vásárolva, Melville NY) vittünk be az eszközbe a beültetés utáni 2. napon úgy, hogy egy hipodermális tűt bőr alá illesztettünk az eszköz közelében, majd a tűt kitapogatva az eszköz egyik végébe vezettük.

Egy hipodermális tűt használva öt állatból folyadékot szívunk ki a beültetett eszközből a 2., 4., 7. és 9. napon a beültetés után, majd a folyadékban lévő sejteket összegyűjtöttük, mostuk és számoltuk. Ahogy azt az 1. ábrán bemutatjuk, az antigén nélküli eszközökkel beültetett állatokban a sejtpopuláció a 4. napon kezd el növekedni, és a 7. napon csúcsosodik. A 9. napon az eszközben lévő sejtek számának csökkenése azt jelzi, hogy az eszközbe vándorló sejtek az eszközből a perifériára vándoroltak. Amikor influenza antigént adtunk az eszközbe a beültetés utáni 2. napon, az eszközben jelenlévő sejtek száma a beültetés utáni 4. napon többször nagyobb volt (225 000 sejt), mint az antigén nélküli eszközben (60 000 sejt). Tehát az antigén jelenléte az eszközben fokozta az eszközben a sejtek felhalmozódását és/vagy kiváltotta az eszközben lévő sejtek proliferációját.

2. példa

Ebben a kísérletben a hozzáadott antigén nélküli eszközökben jelenlévő sejtek számát és fenotípusát határoztuk meg BALB/c egereket alkalmazva. Egy 1. példa szerinti eszköz beültetése után a sejteket mind az öt állatból az eszközből kiszívtuk, összegyűjtöttük, mostuk, és több csőbe szétosztottuk. Fluoreszcein izotiocianáttal vagy fikoeritrinnel jelölt, a következő markerekre specifikus monoklonális antitesteket adtunk hozzá: CD14, CD45/B220, CD11b, CD40, CD11c, CD80, CD86, CD62P, CD62E, CD3 és I-Ad, és miután 30–45 percen át 4°C-on inkubáltuk, a sejteket mostuk, és áramlásos citometriával meghatároztuk a fluoreszcencia mértani közepét. Az összehasonlításhoz kezeletlen, szingénikus egerek perifériás vér limfocitáinak fluoreszcenciáját határoztuk meg a specifikus antitestek ugyanolyan csoportját alkalmazva, és mindegyik antitestnél az eredményt az eszközből származó sejtek fluoreszcenciájának százalékos növekedésében ábrázoltuk a perifériás vér limfocitákhoz képest.

A 2. ábra az eszközből a beültetés után négy nappal kivont sejtek fenotípusát mutatja be. A T-sejtek (CD3, CD40), makrofágok (CD143, CD11b, II. osztályú MHC, CD80), dendritikus sejtek (CD40, CD11c, II. osztályú MHC, CD80) és B-sejtek (II. osztályú MHC, CD45/B20, CD11b) nagy sűrűségben történő vándorlása és felhalmozódása volt látható az eszközben.

3. példa

Az 1. példában leírt eszközben lévő sejtpopulációban az idő múltával bekövetkezett változásokat értékeltük ki a sejteket a beültetés utáni 3., 7., 10. napon összegyűjtve. Az első kísérletben nem volt antigén az eszközben. Mindegyik időpontban öt

egérbe beültetett eszközből sejteket szívtunk ki, összegyűjtöttük, és a CD3, CD8, CD80, CD44, CD11c, CD45R/B220-t és CD14 marker hordozó sejtek sűrűségét meghatároztuk a 2. példában leírt eljárást követve, az értékeket a kezeletlen egér perifériás vér limfociták százalékos növekedésében fejeztük ki.

A 3. ábra mutatja a számba vett sejt fenotípusokat a beültetés utáni 3., 7. és 10. napon. Mindegyik markernél nyilvánvaló volt a sejttípusok feldúsulása az eszközben a 3 és 7. napon, és a 10. napra a populáció kivándorolt az eszközből.

4. példa

Egy második kísérletben, melyet pontosan úgy állítottunk fel, mint az előbb, influenza antigént tettünk az eszközbe a beültetés utáni 2. napon. Ahogy a 4. ábrán bemutatjuk, a T-sejtek és az antigénprezentáló sejtek (CD3, CD80 vagy CD14) sűrűségét tovább növelte az antigén jelenléte az eszközben, továbbá ezeknek a sejttípusoknak a fennmaradását eredményezte a 10. napon. Az antigén hozzáadása lehetséges, hogy késleltette az immunsejtek elindulását az eszközből.

5. példa

Az influenza antigént tartalmazó eszköz beültetésének távolabbi hatását értékeltük ki az implantált állatok lépjeiben lévő CD4 és CD8 T-sejtek expressziójában bekövetkezett változást mérve. A fentebb leírt eljárást követtük, és a T-sejt fenotípusokat a 2. példa eljárásával határoztuk meg. Az eszközöket 0, 5, 10 vagy 50 µg influenza vakcinával láttuk el 2 nappal a beültetés után, és a lépeket 10 nappal az immunizálás után (12 nappal a beültetés) gyűjtöttük össze. A lépsejteket üveglemezek durva oldalai között óvatosan szétosztatva izoláltuk. A sejteket PBS-sel

mostuk, és a vörös vérsejteket Red Cell Lysis Buffer-ben (Sigma) 5 percig inkubálva kimerítettük. A CD4 és CD8 fluoreszcenciát áramlásos citometriával határoztuk meg a fent leírt módon. Kontrollként egy hagyományos, szokásos immunizációs eljárást követünk, melyben az egereket ugyanolyan mennyiségű antigénnel immunizáltunk a mancsukban, R-700 Ribi adjuvánssal, mely egy monofoszforil-lipid A-t és szintetikus trehalóz-dikrinomikolátot (MPLA + TDM) tartalmazó emulzió, és az Ibi ImmunoChem Research, Inc. gyártja. A kontroll egerektől szintén vért vettünk az immunizálás után 10 nappal.

Ahogy azt az 5. ábrán bemutatjuk, az eszközzel implantált egerek lépeiből származó T-sejtek a CD4 és CD8 molekulák megnövekedett sűrűségét mutatják az eszköz influenza antigénnel való feltöltését követően. A hagyományos módon, 50 µg antigénnel és adjuvánssal immunizált állatok lépjeiben a citotoxikus T-sejtek mennyisége azonos a találmány szerinti eszközben lévő 10 µg antigén által indukált T-sejt mennyiséggel. Továbbá az antigén nélküli eszköz szintén egy CD8 sejtszám növekedést mutat a lépben az eszköz által indukált steril gyulladás eredményeként. Figyelemreméltó, hogy az 50 µg antigénnel ellátott találmány szerinti eszközzel implantált állatokban a CD8 sejtek expressziójának veszteségét mutattuk ki. Ennek egyik magyarázata, hogy az antigén nagy dózisének beadása az eszközbe az antigén-specifikus sejtek apoptózist okozza. A rendkívül erős stimulus alkalmazása ingerlési hatást válthatott ki, és ennek végeredménye volt a teljes CD4+CD8+ T-sejtek eliminációja a kezelt egerek lépeiből. Ez felhasználható az immunválasz negatív

irányú szabályozására azokban az esetekben, melyekben az immunválasz káros, például a transzplantátum kilökődésnél.

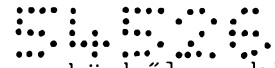
A találmány szerinti eszközt alkalmazva az immunizáció megnövekedett hatékonyságának magyarázata úgy foglalható össze, hogy az antigén mennyisége, mely aktuálisan eléri a nyirokcsomót egy állatban az antigénnek egy perifériás helyre történő injekcióját követően, több nagyságrenddel kevesebb, mint amit az immunizációkor beadunk. Tehát az immunizáció optimális dózisa a találmány szerinti eszközt alkalmazva egy pozitív immunválasz kiváltásához várhatóan lényegesen kisebb (azaz több nagyságrenddel kisebb), mint a hagyományos immunizálásban alkalmazott dózis.

6. példa

A találmány szerinti eszközzel biztosított influenza antigénre adott immunválaszok erősségét markerként lép T-sejtek gamma-interferon szekrécióját alkalmazva értékeltük ki. A gamma-interferon szekréció a Th1-típusú és CD8 citotoxikus T-sejt válasz egyik alapvető sajátossága, melyről tudjuk, hogy az intracelluláris patogének és a rák elleni védekezési eszköz. A fentebb leírt eszközöket egerekbe ültettük, és 5 µg influenza vakcinával láttuk el a beültetés utáni 3. napon. A kontroll csoportot a mancsban 50 µg antigénnel és Ribi adjuvánssal immunizáltuk. Az immunizálás után tíz nappal a lépsejteket úgy izoláltuk, mint az előző példában, szélesztettük, és a gamma-interferon termelést egy ELISA kitet (Endogen) alkalmazva mértük 1,4-180 µg/ml tartományba eső antigén mennyiséggel történő stimulálás után.

A 6. ábra azt mutatja, hogy az állatok immunizálása a találmány szerinti eszközben a 5 μ g antigénnel a T-sejt aktiváció hasonló mértékét hozza létre, mint egy 50 μ g-os immunizálás adjuvánssal, a mancsba. Tehát erős immunválasz érhető el adjuváns alkalmazása nélkül a találmány szerinti eszközt és jelentősen kisebb mennyiségű antigént felhasználva.

A gamma interferon szekréciót kiértékeltek ugyanazon állatok térdhajlati nyirokcsomóiból származó T-sejtekből, miután az izolált T-sejteket hasonló tartományba eső antigén-koncentrációknak tettük ki. Ahogy a 7. ábrán bemutatjuk, az antigénnel és adjuvánssal mancsban immunizált állatokból származó T-sejtek gamma-interferon szekréciója nem volt olyan erőteljes, mint amit a találmány szerinti eszköz alkalmazásával immunizált állatokból származó lép T-sejtek hoztak létre (összehasonlítva a 6. ábrával). Mivel a térdhajlati nyirokcsomók azok, melyek felelősek a mancs területének elvezetéséért, és így várhatóan az antigén jelenléte aktiválja azokat, ez az eredmény még jobban bemutatja azt a hatékonyságot, mellyel a találmány szerinti eszköz alkalmazható egy erőteljes immunválasz kiváltására anélkül, hogy adjuvánssra szükség lenne. Egy további értékelésben, az eszközben (melyet a 3. napon láttunk el antigénnel) fennmaradó sejt populációt vizsgáltuk meg a beültetés után 10 nappal a gamma-interferon szekrécióra az antigén kitevésre adott válaszban. A 8. ábra azt mutatja be, hogy nagyon kis mennyiségű gamma-interferon szekretálódik az influenza antigénnel végzett *in vitro* immunpróbára adott válaszban összehasonlítva a lépsejteknél feljegyzett válasz mértékével. Ez az eredmény arra utal, hogy az eszközön belüli immunizálással aktivált effektor sejtek



kivándoroltak a helyről. A 10. napra (amikor az eszközből a kiszívott folyadékot vettük) az effektor populáció nagy része kimerült. Az 1. és 3. ábra mutatja a B és T fenotípusú sejtek eltűnését az eszközből a 9. és 10. napra, igazolva a perifériás szervekbe történő kilépésük lehetőségét.

7. példa

Egy további kísérletben, mely specifikusan a találmány szerinti eszközzel indukált antigénre adott immunválasz erősségét vizsgálja a beültetést és az antigénnel való feltöltést követően, egy lépsejt proliferációs assayt hajtottunk végre. Ugyanazt a protokollt követtük, mint amit az előző példákban leírtunk. Az antigén ebben a kísérletben az ovalbumin volt; az eszközöket különböző mennyiségű, 10 pg-50 µg tartományba eső ovalbuminnal láttuk el; a kontroll állatokat mancsba adott injekcióval immunizáltuk ugyanolyan mennyiségű antigénnel és Ribi adjuvánssal.

A beültetés után tíz nappal az egereket fájdalommentesen megöltük, és a lépeket kivettük. Egy proliferációs assayt állítottunk össze 96 mérőhelyes lemezekben. Mérőhelyenként kétszázezer lépsejtet tettünk ki 180 µg/ml antigénnek 72 órán át 37°C-on, kontrollként ugyanilyen dózisú Epstein-Barr vírus antigént használtunk. Az antigénnek vagy a kontrollnak való kitevés után, a sejteket 6 órán át ³H-timidin impulzusokkal kezeltük, a jel beépülését mértük, és stimulációs indexként fejeztük ki. A 9. ábra azt mutatja, hogy az egerek immunizálása az ovalbumint tartalmazó eszközzel egy erőteljes antigén-specifikus lépsejt proliferatív választ eredményez. Választ mutattunk ki az antigén pikogramnyi mennyiségével immunizált állatokban. A hagyományos módon adjuvánssal immunizált állatokból származó lépsejtek csak

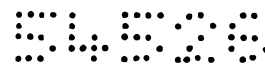


5-7 nagyságrenddel nagyobb antigén-koncentrációnál hoztak létre proliferatív választ. A kontrollra (Epstein-Barr vírus) adott jelentéktelen stimulus szintek azt jelzik, hogy az ovalbuminnal szemben kiváltott immunválasz nagyon specifikus.

Egy további kísérletben antigénként ovalbumint alkalmazva egereket immunizáltunk a találmány szerinti eszközt alkalmazva vagy mancson keresztül, 50 µg, 50 ng vagy 50 pg ovalbuminnal az eszközben önmagában, az eszközben BCG adjuvánssal, vagy mancson át Ribi adjuvánssal. Az ezekben a kísérleteken alkalmazott TheraCys(R) BCG (Bacille Calmette Guerin) adjuváns a *Mycobacterium bovis* egy legyengített törzsének fagyasztva szárított szuszpenziója, melyet a Connaugh Laboratories Limited készített a húgyhólyag karcinóma *in situ* kezelésére. Tíz nappal az immunizálás után a lépsejteket összegyűjtöttük, és különböző koncentrációjú antigénnek (1,4-180 µg/ml) vagy a kontroll Epstein-Barr vírus antigén hasonló mennyiségének tettük ki *in vitro*. 72 órás inkubálás után a sejteket ³H-timidin impulzusokkal kezeltük 6 órán át, és a jel beépülését stimulációs indexként fejezzük ki, és a T-sejt stimuláció és proliferáció mérésére használjuk.

A 10. ábra azt mutatja, hogy erőteljes antigén-specifikus T-sejt válasz érhető el az antigén kis dózisaival a találmány szerinti eszközt alkalmazva. Jelentéktelen stimulációs szinteket mutattunk ki, miután a lépsejteket a kontroll antigénnek tettük ki, mely továbbra is azt jelzi, hogy a válasz fajlagos az immunogénre.

8. példa



A HIV gp120 peptid (315-322. maradék, RIQRGPGRAFVTIGK) anti-gén elleni antigénspecifikus antigén-választ mértünk, miután nagyon kis dózisokat töltöttünk a találmány szerinti eszközbe. BALB/c egerereket immunizáltunk az eszközzel vagy mancsban Ribi adjuvánssal, különböző dózisú HIV peptidekkel. 10 nappal az immunizálás után vért gyűjtöttünk, és a peptiddel szembeni antitest titert meghatároztuk. Négy nappal később az állatokat a kezdeti immunogén 10%-ával emlékeztetőként újra beoltottuk, és egy második vérvételt végeztünk 10 nappal az antitest titer meghatározása után. ELISA-t alkalmaztunk az antigénspecifikus IgG2a alosztályú antitestek mérésére, és ezt egy rutin eljárás szerint hajtottuk végre. Röviden, mikrotitráló lemezeket foszfáttal pufferolt sóoldatban lévő antigénnel (1 g/ml) fedtünk 16 órán át 4°C-on. A lemezeket mostuk (50 mM Tris + 0,2% Twen20 PBS-ben, pH 7-7,5), és blokkoló pufferral (5% BSA oldat + 0,1% Tween-20 PBS-ben, pH 7,2-7,4) 4°C-on 16 órán át blokkoltuk. A lemezeket mostuk, és 100 µl szérummintát adtunk a mérőhelyekre 1:50 -es hígítással kezdve, és háromszor tovább hígítva. A mintákat két példányban teszteltük. Egy órás szobahőmérsékleten végzett inkubálást követően a lemezeket a fenti módon mostuk, és biotinilezett anti-egér IgG2a antitest oldatot (1 µg/ml) adtunk a lyukakba. Egy órás inkubálás és erőteljes, fenti módon végrehajtott mosás után 1:4000 arányban blokkoló pufferben oldott sztreptavidinnel konjugált torma peroxidázt adtunk a lyukakba. Harminc percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a szubsztrátot (100 µl/lyuk tetrametil-benzidin) hozzáadtuk. A lemezeket 30 percig inkubáltuk. 100 µl/lyuk 2N H₂SO₄-gyel állítot-



tuk le a reakciót. A lemezeket ELISA lemezleolvasót alkalmazva 450 nm-en olvastuk le.

A 11. ábra mutatja be a specifikus anti-HIV gp120 peptid IgG2a mennyiségeit, és azt jelzi, hogy egyetlen, találmány szerinti eszközzel végzett immunizáció egy erős antigénspecifikus antitestet (IgG2a) vált ki, míg egy hagyományos protokollt követő egyszeri mancsimmunizáció nem váltott ki választ. Egy második immunizálást követően (emlékeztető oltás) a mancsba, antitestválasz alakult ki a hagyományosan immunizált állatokban, viszont azokban az állatokban, amelyeket először a találmány szerinti eszközt alkalmazva immunizáltunk, majd emlékeztető immunizálást hajtottunk végre (az eredetileg beadott dózis 10%-ával) megnövekedett IgG2a szinteket, és az alacsonyabb antigén mennyiségeknél is szignifikánsan erőteljesebb választ mutattunk ki (12. ábra).

9. példa

A különböző adjuvánsoknak a találmány szerinti eszközzel történő immunizációval kiváltott immunválaszra gyakorolt hatását értékeltük ki a hagyományos mancs immunizációval összehasonlítva. BALB/c egereket immunizáltunk az eszközzel vagy mancson keresztül, HIV gp120 peptiddel (az előző példából) különböző dózisokban önmagában vagy Ribí vagy BCG adjuvánssal, a fentebb leírt módon. Az eszközt az immunogénnel három nappal a beültetés után láttuk el, és az antitest titereket 10 nappal az immunizálás után határoztuk meg. A gp120 peptid antigén specifikus IgG2a ELISA-ját hajtottuk végre az előző példában leírt módon. A Ribí vagy BCG adjuvánsokkal végzett hagyományos immunizálás a peptid-specifikus IgG2a alacsony szintjét hozta létre (13. ábra). Ezzel



szemben adjuváns nélkül, a találmány szerinti eszközt alkalmazó immunizálással (50 ng peptid) a peptid-specifikus IgG2a jelentősen magasabb szintje jött létre. A peptid bármelyik adjuvánssal együtt (Ribi vagy BCG) gyenge választ hozott létre. Ezek az adatok arra utalnak, hogy egy adjuváns hozzáadása egy már erős antigén stimulushoz az immunválasz elnyomását eredményezi. Lehetséges, hogy az adjuváns és antigén additív hatásának vagy szinergizmusának bizonyításához az immunizációs eljárásokat az antigén alacsonyabb tartományában (kevesebb, mint femtogramnyi dózis) valamint az adjuvánssok kisebb koncentrációinál kellene tesztelni.

Hasonló eredményeket kaptunk, amikor egy Herpes simplex vírus B glikoproteinjének 15-mer peptidjét (497-507: TSSIEFARLQF) teszteltük.

10. példa

A találmány szerinti eszközben lévő antigén által indukált humorális immunválasz erősségének további tesztelésére BALB/c egerekbe ültettük be az eszközöket, melyeket három nappal később különböző dózisú citokróm C-vel láttunk el. Kontrollként, ugyanennek az antigénnel különböző dózisait Ribi adjuvánssal együtt mancson keresztül adtuk be. Tíz nappal a beültetés után vagy tíz nappal a mancsimmunizálás után az állatoktól vért vettünk, és ELISA-t hajtottunk végre a szérumon olyan IgG2a-ra, mely specifikusan felismeri az antigént. Az eljárás hasonló volt ahhoz, melyet az előző eljárásban követtünk, kivéve, hogy az ELISA-t a szérum sorozatos, 1:50-től 1:16400-ig terjedő hígításain hajtottuk végre.



A 14. ábra azt mutatja, hogy a találmány szerinti eszközben alkalmazott antigén nagyon kis dózisaival az antigénnel szemben nagyon erős specifikus humorális immunválaszt értünk el. 50 femtogramm eszközben lévő antigénnel hasonló antitestválaszt érünk el, mint ami a hagyományos mancsimmunizációval adjuvánssal 5 ng antigént alkalmazva elérhető, ez egy négy nagyságrendes növekedés.

11. példa

A humorális válasz kialakulását tovább értékeltük antigénként a hemagglutinin fehérjét alkalmazva, melyet influenza A vírusból hasítottuk és tisztítottuk (törött hemagglutinin antigén vagy BHA). BALB/c egereket immunizáltunk a találmány szerinti eszközt használva 0,1 µg és 10 µg dózisokkal, melyekkel 3 nappal a beültetés után töltöttük meg az eszközt. A kontroll egereket hasonló mennyiségű antigénnel szubkután immunizáltuk a farok tövében, Ribi adjuvánssal. Az egerektől a 7., 14., 21. és 28. napon az immunizálás után vért vettünk, és egy ELISA-t hajtottunk végre a szérumon az antigén specifikus össz. IgG atitestre.

Ahogy a 15. ábrán bemutatjuk, erős humorális immunválaszt kaptunk 0,1 µg antigénnel, a HA-specifikus antitestek nagy koncentrációit elérve 2 héttel az immunizáció után. A hagyományos eljárás és adjuváns alkalmazásával immunizált egerek az antigén-specifikus humorális válasz alacsony szintjét fejezték ki a második héten, mely az immunizálás után 3 és 4 héttel megnövekedett. Az eszközzel immunizált egerek szérumában a BHA-specifikus antitest mennyisége 75-80%-kal magasabb volt, mint a hagyományos eljárást követve, az antigén nagyobb dózisaival, adjuváns jelenlétében elért szint. Ebben a kísérletben az esz-

közben lévő kis dózisú immunogén egy nagyobb humorális választ hozott létre, mint ami egy nagyobb dózissal elérhető. Mint a korábbi kísérletekben láttuk, az 5 μg -nál nagyobb dózisok az immunválasz szuppresszióját okozhatják, mely valószínűleg az apoptózis kiváltásának köszönhető, egy túlzott stimulációra adott válaszként.

12. példa

A találmány szerinti eszköz szivacsos mátrixa körül biztosított perforált, de egyébként nem áteresztő és biológiailag semleges fedőréteg vagy tartály fontosságát értékeltük ki úgy, hogy az egereket influenza antigénnel immunizáltuk vagy az ép, fentebb leírt eszközzel, vagy csak önmagában a szivacsos mátrixban, melyet a perforált cső mellé ültettünk be. Az antigéndózisoknak egy adott tartományát (0, 50 pg, 500 pg, 5 μg és 50 μg) értékeltük ki, és ezeket az eszközökbe, vagy csak a szivacsokba vittük be, három nappal a beültetés után. Kontrollként az antigének ugyanilyen mennyiségeivel immunizáltuk az egereket mancsban, Ribi adjuvánssal együtt. A beültetés vagy a mancsimmunizálás után tíz nappal a lépeket összegyűjtöttük az állatokból, és egy T-sejt proliferációs assayt hajtottunk végre a fent leírt módon, 0,1-180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tartományba eső antigén mennyiséggel. A specifitás kontrolljaként Epstein-Barr vírust alkalmaztunk *in vitro*. A ^3H -timidin beépülést stimulációs indexként fejeztük ki, mely a T-sejt stimulációt és proliferációt mutatja.

Ahogy a 16. ábrán bemutatjuk, az ép eszközzel immunizált állatok által kifejezett T-sejt aktiváció jelentősen erősebb választ mutat, mint amikor az antigén nem a perforált, de egyéb-



ként nem áteresztő tartályban lévő szivacsokban van jelen. A nem rokon antigénre adott válasz (18. ábra) minimális volt.

13. példa

A találmány szerinti eszköz szivacsos mátrixa körül biztosított perforált, de egyébként nem áteresztő és biológiailag semleges fedőréteg vagy tartály fontosságát egy diffúziós teszt végrehajtásával értékeltük ki. Kétszáz μg marha szérum albumint (BSA) injektáltunk az eszközbe vagy a szivacsba. Az eszközt és a szivacsot 1,5 ml PBS-t tartalmazó kémcsövekbe helyeztük. A mintákat különböző időpontokban vettük, és a BSA koncentrációt mértük.

Ahogy a 18. ábrán bemutatjuk, a szivacs a teljes tartalmát kibocsátotta 5 perces inkubáción belül. A találmány szerinti eszköz szabályozta az antigén kibocsátását, és az antigén több mint 65%-át több mint 960 percig megtartotta. Egy diffúziós gát fenntartását az antigén, citokinek, kemokinek és más kostimuláló molekulák nagy mennyiségeinek érintkezésben tartására az immunsejtekkel eszközön belül, az egyik olyan fontos mechanizmusnak tekintjük, mely az eszközt jelentősen jobbá teszi a hagyományos immunizációs eljárásokhoz képest egy erőteljes immunválasz kiváltásában.

Tehát a fentebb bemutatott példák bebizonyítják a találmány szerinti eszköznek azt a képességét, hogy a különböző antigénekkel szemben egy nagyobb T-sejt és humorális választ stimulál összehasonlítva a hagyományos mancsimmunizálással és összehasonlítva egy beültetett szivacsos mátrixba egyszerűen betöltött antigénnel.

14. példa

A hozzáadott antigén nélküli találmány szerinti eszközben lévő sejtek fenotípusait határoztuk meg a beültetés után. A beültetés utáni negyedik napon a találmány szerinti eszközből kivont sejteket összegyűjtöttük, mostuk, és fluoreszcein izotiocianáttal vagy fikoeritrinnel jelölt monoklonális antitestekkel megfestettük, melyek a következő markerekre voltak specifikusak: CD14, CD45/B220, CD11b, CD40, CD11c, CD80, CD86, CD3 és I-Ad (PharMingen, CA). A fluoreszcencia mértani közepét áramlásos citometriával határoztuk meg. Az összehasonlításhoz kezeletlen, szingénikus egerekből származó perifériás vér limfociták (PBL) fluoreszcenciáját határoztuk meg a specifikus antitesteknek ugyanazt a készletét használva, és az eredményeket mindegyik antitestnél a fluoreszcencia intenzitás átlagaként (MFI) fejeztük ki.

A 19. ábra bemutatja a beillesztés után négy nappal az eszközből kivont sejtek fenotípusát. A T-sejtek (CD3, CD40), makrofágok (CD14, CD11b, II. osztályú MHC, CD80), dendritikus sejtek (CD40, CD11c, II. osztályú MHC, CD80), és a B-sejtek (II. osztályú MHC, CD45/B220, CD11b) vándorlása és nagy sűrűségű felhalmozódása nyilvánvaló volt az eszközben. Tehát az immunválasz kialakulásában fontos immunsejtek megtalálhatók az eszközben. A kostimuláló (CD80 & CD86) és adhéziós (CD44) molekulák expressziója szignifikánsan megemelkedett a találmány szerinti eszközből kivont immunsejtekben, összehasonlítva a PBL-lel (adatokat nem közlünk). Érdekes módon, a találmány szerinti eszköz metszeteinek elektronmikroszkópos elemzése nagy számú lizoszómával rendelkező makrofágok jelenlétét tárta fel, mely a sejtaktiváció fokozott állapotára utal.

15. példa

A beültetés után a találmány szerinti eszközben antigén nélkül található citokinek koncentrációját hasonlítottuk össze a természetes egér szérumban lévő citokinek koncentrációjával. Ahogy a 20. ábrán bemutatjuk, az eszköz az IL-2, IL-4 és TNF- α stimulátor citokineket nagyobb mennyiségben tartalmazta, és hozzávetőleg a TGF- β inhibitor citokin koncentrációjának egyhatedét tartalmazta (adatokat nem mutatunk be). Tehát a találmány szerinti eszköz egy erősen feltöltődött környezet, mely fel van készítve az immunválasz kitörésére, amikor azt egy antigénnel "begyűjtják".

16. példa

Úgy gondoljuk, hogy a citotoxikus T limfocita (CTL) válaszok kritikusak az influenza vírussal szembeni immunitás kialakulásában. Annak a kiértékelésére, hogy a találmány szerinti eszköz képes-e antigénspecifikus CTL-eket kiváltani, egereket immunizáltunk 500 pg influenza vírus vakcinával a találmány szerinti eszközben. Kontrollként egereket immunizáltunk szubkután 500 pg vakcinával és Ribi adjuvánssal. Limfocitákat nyertünk ki az immunizált állatokból, és azok specifikitását az influenza vírusra az influenzavírussal fertőzött célsejtek lízisével határoztuk meg.

A CTL-eket a következőképpen állítottuk elő: Az egereket fájdalommentesen megöltük, és a lépeket kivettük. Egyszerű sejtszuspenziót készítettünk, és a sejteket PBS-sel mostuk. A vörös vérsejteket Red Cell Lysis Buffer-t (Sigma) alkalmazva ki-merítettük. A lépsejteket (5×10^6) *in vitro* együtt tenyésztettük 5×10^6 vírussal ($100 \text{ HAU}/10^7$ sejt/ml 60 percig 37°C -on) fertő-

zött és besugárzott (3000 Rad) szingénikus lépsejttel, és 5 napon át 37°C-on 5% CO₂-ben inkubáltuk. PR8-cal fertőzött (500 HAU/10⁶ sejt) Pl.HTR sejteket és nem fertőzött Pl.HTR sejteket alkalmaztunk a citotoxicitás célsejtjeiként. A sejteket 100 mCi Na₂⁵¹CrO₄-gyel jelöltük 90 percen át, majd háromszor mostuk. 100 ml RPMI 1640-ben és 5% FCS tápközegben lévő célsejteket (10⁴/ml) adtunk az effektor sejtekhez különböző koncentrációkban 100:1 arányban (E:T) kezdve, és kétszer 96 mérőhelyes kerek aljú mikrotitráló lemezekben titráltuk. Egy 5 órás inkubálás után a felülúszót összegyűjtöttük, az eredményeket a specifikus ⁵¹Cr kibocsátás százalékaként fejeztük ki a következő képlet szerint:

$$\frac{[(\text{kísérleti kibocsátás}) - (\text{spontán kibocsátás})] \times 100}{[(\text{maximális kibocsátás}) - (\text{spontán kibocsátás})]}.$$

Ahogy a 21. ábrán bemutatjuk, a találmány szerinti eszközt alkalmazva az immunizálás 500 pg influenza vírus vakcinával erőteljes influenza specifikus CTL-eket vált ki, melyeknél szignifikánsan jobb az influenzával fertőzött célsejtek lízise összehasonlítva a hagyományos Ribi adjuvánssal végzett szubkután immunizációra adott válaszbán képződött CTL-lel. A létrejött CTL nem pusztította el a nem fertőzött célsejteket *in vitro*, mely a kiváltott válasz specifitását jelzi. A találmány szerinti eszközben a nagyobb antigén dózisokkal nem láttunk stimulációt.

17. példa

Annak meghatározására, hogy a találmány szerinti eszközzel végzett immunizálás szintén módosítja-e a humorális immunválaszt, egereket immunizáltunk influenza vírus vakcina több különböző dózisával, a találmány szerinti eszközben beadva vagy Ribi adjuvánssal szubkután injektálva. Az influenza-specifikus

IgM, IgG1 és IgG2 antitestek nagy mennyiségeit mutattuk ki az egerek szérumban a találmány szerinti eszközzel, a vakcina kis dózisaival végzett immunizálást követően, összehasonlítva a Ribivel együtt beadott szubkután immunizációval. (Adatokat nem mutatunk). A vírusspecifikus IgG antitestek vizsgálata erősebb kötést tárt fel, melyet a szérumhígítások fokozatos növelése mellett feljegyzett abszorbanciával mértük. (22. ábra). Hasonló eredményeket figyeltünk meg az IgG2a antitesteknél.

18. példa

A találmány szerinti eszközt alkalmazó immunizálással keltett szérum antitesteket, a hagyományos eljárással adjuvánssal keltett antitestekkel összehasonlítva, KSCN (kálium-tiocianát) fokozatosan növekvő molaritású gradienseknek tettük ki, melyet az antigénspecifikus antitestek eluálására alkalmazunk az antigénrel fedett mikrotitráló lemezekhez kötött komplexekből, hogy meghatározzuk az antitestek relatív affinitását az influenza antigénhez. Egy szokásos mikrotitráló lemez alapú ELISA formátumot alkalmaztunk, ahogy fentebb leírtuk. Mielőtt hozzáadtuk a biotinilezett anti-egér IgG-t, a lemezeket mostuk, és a KSCN különböző koncentrációit adtuk a lyukakba. A lemezeket szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percen át. Mosás után biotinilezett anti-egér IgG1 antitest oldatot (0,5 µg/ml) adtuk a lyukakba. A KSCN növekvő koncentrációi szükségesek a nagy affinitású antitestek antigénhez való kötődésével létrejött komplexek széttöréséhez. Ahogy a 23. ábrán bemutatjuk, a kialakult antitestekről kimutattuk, hogy nagyobb affinitással bírnak a virális antigénekkal szemben. Tehát a vakcina nagyon kicsi dózisa is elegendő ahhoz,

hogy erős humorális immunválaszt indukáljanak, amikor a találmány szerinti eszközt alkalmazzuk.

19. példa

A találmány szerinti eszközt alkalmazó immunizálás azon képességét teszteltük egy egér influenza modellben, hogy megvédi-e az emlősöket a fertőzőbetegségekkel szemben. Az influenza vírus vakcina két dózisát (5 pg és 500 pg) alkalmaztuk arra, hogy egereket immunizáljunk vagy a találmány szerinti eszközzel vagy szubkután Ribí adjuvánssal együtt beadva. Hozzávetőleg 12 héttel a vakcinázás után az állatokat az influenza vírus letális dózisának tettük ki. Ahogy a 24. ábrán bemutatjuk, egy találmány szerinti eszközzel végzett vakcinázás 5pg és 500 pg dózisú influenza vakcinával is teljes védelmet eredményezett, míg az 500 pg influenza vakcinával és Ribí adjuvánssal szubkután immunizált egereknek csak 60% százaléka maradt életben. Az összes állat, melyet 5 pg dózissal és adjuvánssal immunizáltunk, elpusztult a betegségben a 14. napra. Figyelemreméltó, hogy bár nem csak a találmány szerinti eszközt alkalmazó immunizálás biztosított teljes védelmet, az az antigén egyszázad mennyiségével és adjuváns nélkül volt elérhető. A találmány szerinti eszközzel immunizált állatok a vírusfertőzés után is állandó tömegűeknek mutatkoztak, mely egy enyhébb betegség kialakulását jelzi, ez összhangban áll azzal, hogy viszonylagos ellenállóképesek az akut fertőzéssel szemben.

20. példa

A találmány szerinti eszköz alkalmazhatóságát értékeltük ki specifikus humán IgG létrehozására humán immunsejtekkel benépesített, súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egerekben, melyekbe

influenza vírus vakcinát tartalmazó eszközt ültettünk be. SCID Beige CD17 (6-8 hetes nőtény) egereknek infúzióban (intraperitoneálisan) normál humán donorból származó 20×10^6 PBMC-t adtunk. Három nappal később az egereket intramuszkulárisan vagy 50 ng influenza vírussal előtöltött találmány szerinti eszközt beültetve immunizáltuk. Három héttel az immunizálás után az egerektől vért vettünk, és a szérumot influenza-specifikus humorális válaszra teszteltük, hagyományos ELISA-t alkalmazva. Ahogy a 25. ábrán bemutatjuk, a vakcinával történt immunizálás influenza-specifikus humán IgG-t eredményezett. Továbbá, ahogy fokozatosan növekvő molaritású KSCN-t alkalmazva az influenza antigén elleni szérum antitestek relatív affinitásának mérésére, kimutattuk (a 18. példában leírt módon), a találmány szerinti eszköz nagyobb titerű humán influenza-specifikus antitestet termel, mint ami a hagyományos, intramuszkuláris immunizálással elérhető (26. ábra). Ezt a módszert humán monoklonális antitestek termelésére képes humán hibridómák létrehozására is alkalmazhatjuk.

21. példa

A találmány szerinti eszközben biztosított nagyobb mennyiségű antigén az immunválasz szuppresszióját okozhatja. Balb/c egerekbe 5-50 μ g influenza vakcinával töltött eszközt ültettünk be, vagy mancsban Ribi adjuvánssal kevert antigénnel immunizáltunk. Az egereket az immunizálás után 10 nappal fájdalommentesen megöltük, és a lépsejteket izoláltuk, és 96 mérőhelyes lemezekre (2×10^5 sejt/lyuk) tettük. A sejteket influenza antigénnek tettük ki 72 órán át 37°C-on. Az antigénnel való stimulálást követően a felülúszókat kivettük a tenyészetekről, és a gamma-interferon

termelést egy ELISA kitet alkalmazva (Endogen) mértük. Ahogy a 27. ábrán bemutatjuk, az antigén és a Ribi adjuváns kombinációjával immunizált egerek egy olyan immunválaszt adtak, mely az antigén dózissal közvetlenül növekedik. Ezzel szemben az eszköz belsejében lévő antigénnel immunizált egerek az antigén kis dózisainál az immunválasz stimulálását mutatták (ahogy, azt az előző példákban megfigyeltük), viszont az antigén nagyobb dózisainál az immunválaszban csökkenés mutatkozott. Tehát a találmány szerinti eszközben lévő nagy mennyiségű antigén jelenléte az immunválaszt negatív irányba szabályozza. Ezt az eljárást olyan kezelési stratégiákban alkalmazhatjuk, ahol a specifikus immunszuppresszió a hasznos, például transzplantációnál, allergiánál, stb.

22. példa

A találmány szerinti eszközt arra is alkalmazhatjuk, hogy egy poliszacharid antigénnel szemben hozzunk létre immunválaszt. *Pneumococcus* vakcinával töltött eszközt alkalmazva (Pneumovax-23) egyetlen immunizáció specifikus immunválaszt hoz létre. A Pneumovax egy polivalens *Pneumococcus* vakcina, mely erősen tisztított kapszuláris poliszacharidokat tartalmaz a 23 leggyakoribb és legfertőzőbb *Pneumococcus* típusból. Az egereket vagy 5 µg vagy 40 pg Pneumovax vakcinával immunizáltuk a fent leírt módon szubkután beültetett eszközben vagy Ribi adjuvánssal összekeverve, és mancsba injektálva. Az összes egértől vért vettünk a 10. napon, és ELISA-val az össz. IgG (29. ábra), IgG1 (30. ábra) és IgG2 (31. ábra) válaszra mértük. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a poliszacharid antigénekre immunválasz érhető el a találmány szerinti eszközt alkalmazva.

23. példa

A találmány szerinti eszközt arra használhatjuk fel, hogy immunválaszt hozzunk létre egy erősen konzerválódott antigénnel szemben. A ciklofilint választottuk ki modell fehérjének ezekhez a kísérletekhez, mivel a ciklofilinnel szembeni immunválasz kialakulását nehéz elérni, mert ez a fehérje erősen konzerválódott az emlős fajok között. Egereket immunizáltunk 5 µg, 50 ng vagy 0,5 ng humán ciklofilinnel vagy a találmány szerinti eszközbe töltve és szubkután beültetve, vagy Ribí adjuvánssal keverve és szubkután injektálva. Az egerektől vért vettünk, és a szérumot humán ciklofilinnel szembeni IgG2a válaszra teszteltük ELISA-val. Ahogy a 32. ábra mutatja, az antigén kétszer kisebb dózisaival a találmány szerinti eszközt alkalmazva immunizált egerek nagyobb antigénválaszt mutattak, összehasonlítva a szubkután ciklofilinnel és Ribí adjuvánssal immunizált egerekkel. Ez az eredmény azt igazolja, hogy az eszköz képes immunválaszt indukálni olyan erősen konzerválódott antigénekkel szemben, melyek egyébként nem immunogének. Az antigén nagyobb dózisaival végzett immunizáció a találmány szerinti eszközben nem tudott immunválaszt indukálni.

24. példa

A találmány szerinti eszköz arra használható fel, hogy immunválaszt hozzunk létre teljes, élő organizmusokkal szemben. Ebben a példában az egereket élő horogféreg lárvákkal immunizáltuk egy szubkután beültetett találmány szerinti eszközbe 5 lárvát téve, vagy 1000 élő lárvát injektálva szubkután két hét különbséggel. Ahogy a 33. ábrán bemutatjuk, mindkét eljárás L3-specifikus össz. IgG-t indukált, melyet ELISA-val mértünk. Eddig a parazita

organizmusok, ide értve a horogférgyet és a maláriát, nagy mennyiségével lehetett csak immunizálni, besugárzott lárvákat illetőleg sporozoitákat alkalmazva. Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a találmány szerinti eszközt alkalmazva az immunizálás kisebb számú organizmussal hajtható végre.

A találmány anélkül, hogy lényegétől és alapvető jellemzőitől eltérnénk, más alakban is kivitelezhető vagy más módon is végrehajtható. Ennél fogva a leírás minden szempontból csak szemléltetésként tekintendő, és nem a csatolt igénypontokban jelzett oltalmi kör korlátozásaként, és az összes olyan változtatás, mely az ekvivalencia jelentésébe és tartományába esik, a találmányba tartozónak tekintendő.

A leírásban különböző publikációkra hivatkoztunk, melyek teljes terjedelmükben a leírásba épülnek.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy antigénre adott immunválasz módosítására, azzal jellemezve, hogy az említett emlős testébe egy perforált de egyébként nem áteresztő tartályban lévő porózus mátrixot tartalmazó eszközt ültetünk be, az említett mátrix az említett antigén egy mennyiségét tartalmazza, ahol az említett eszköz vonzza az immunrendszer sejtjeit, hogy találkozzanak az antigénnel, és módosítsa az említett immunválaszt.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett porózus mátrixban lévő antigén biológiailag hozzáférhető az említett eszköznek az említett emlősbe való beültetésének időpontjában.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett porózus mátrixban lévő antigén azután válik biológiailag hozzáférhetővé, miután az eszközt az említett emlősbe beültettük.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigén körülbelül három órával az említett emlősbe való beültetés után válik biológiailag hozzáférhetővé.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigént az említett eszközbe körülbelül három nappal a beültetés után visszük be.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigént egy lassú felszabadulású készítményben biztosítjuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett porózus mátrix egy polimer anyagot tartalmaz.



8. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett polimer anyagot természetes és szintetikus forrásokból választjuk ki.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett polimer mátrixot a következőkből álló csoportból választjuk ki: hidroxilezett polivinil-acetát, poliuretán, etilén/vinil-acetát kopolimer, politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, zselatin, kollagén, keresztkötött kollagén és ezek kombinációi.

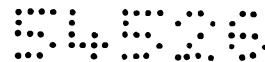
10. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett konténer természetes és szintetikus forrásokból kiválasztott polimer anyagot tartalmaz.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a porózus polimer mátrix hidroxilezett polivinil-acetátot tartalmaz, és a tartály egy perforált csődarabot tartalmaz.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az antigén említett mennyisége és az említett eszközben lévő említett antigén biológiai hozzáférhetőségének időzítése az említett eszköz említett emlősbe történő beültetésének időpontjához képest az említett antigénre adott immunválasz kiváltását vagy fokozását eredményezi.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett eszközben az említett antigén az említett eszköz említett emlősbe történő beültetése után válik biológiailag hozzáférhetővé.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigént az említett eszközbe körülbelül 2-4 nappal



az említett eszköznek az említett emlősbe történő beültetése után visszük be.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigén mennyisége és az említett eszközben lévő említett antigén biológiai hozzáférhetőségének időzítése az említett eszköznek az említett emlősbe történő beültetésének időpontjához képest az említett antigénre adott immunválasz szuppresszálasát vagy negatív irányú szabályozását eredményezi.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigén az említett emlősbe történő beültetés időpontjában biológiailag hozzáférhető.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett eszközt körülbelül egy 10 napos időtartam után eltávolítjuk az említett emlős testéből.

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigénnek egy második mennyiségét is bevisszük az említett eszközbe.

19. Az 18. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigén említett második mennyiségét az említett eszközbe a beültetés időpontjában az eszközben jelen lévő említett antigén említett második mennyiségének lassú felszabadításával visszük be.

20. Beültethető eszköz egy antigénre adott immunválasz módosítására, mely egy porózus mátrixot tartalmaz egy perforált, de egyébként nem áteresztő tartályban.

21. A 20. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett antigén az említett porózus mátrixban van jelen.



22. A 20. igénypont szerinti eszköz, mely továbbá eszközöket tartalmaz az említett antigénnek az említett porózus mátrixszal való kapcsolatba hozásához a beültetés előtt vagy után.

23. A 20. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett mátrix egy polimer anyagot tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag természetes és szintetikus forrásokból van kiválasztva.

25. A 24. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyagot a következőkből álló csoportból választjuk ki: hidroxilezett polivinil-acetát, etilén/vinil-acetát kopolimer, politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, poliuretán, zselatin, kollagén, keresztkötött kollagén és ezek kombinációi.

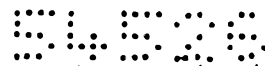
26. A 20. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett tartály egy perforált csődarabot tartalmaz.

27. A 20. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett tartály egy perforált de egyébként nem áteresztő fedőréteget tartalmaz az említett porózus mátrix körül elhelyezve.

28. A 27. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett fedőréteg egy polimer anyagot tartalmaz.

29. A 28. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag természetes és szintetikus forrásból van kiválasztva.

30. A 29. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyagot a következőkből álló csoportból választjuk ki: keresztkötött kollagén, politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, polietilén, szilikon, latex gyanta, polisztrén, akril gyanta, polivinil-pirrolidon és ezek kombinációi.



31. A 20. igénypont szerinti eszköz, ahol a porózus mátrix hidroxilezett polivinil-acetátot tartalmaz, és a tartály egy perforált csődarabot tartalmaz.

32. Eljárás immunsejtek kinyerésére egy emlősből, azzal jellemezve, hogy az említett immunsejteket egy az említett emlősbe ültetett eszközből gyűjtjük össze, mely porózus mátrixot tartalmaz egy perforált, de egyébként nem áteresztő tartályban.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett összegyűjtött sejteket újra bevisszük az említett emlősbe.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett összegyűjtött sejteket mélyhűtéssel tartósítjuk, mielőtt az említett emlősbe újra bevinnénk.

35. A 32. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett eszköz porózus mátrixában egy antigén van jelen.

36. A 35. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett immunsejteket újra bevisszük az említett emlősbe.

37. A 35. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett immunsejteket az említett emlősbe azután visszük be újra, miután *in vitro* az említett antigénnek tettük ki.

38. A 32. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett mátrix egy polimer anyagot tartalmaz.

39. A 38. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag természetes és szintetikus forrásokból van kiválasztva.

40. A 39. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag a következőkből álló csoportból van kiválasztva: hidroxilezett polivinil-acetát, etilén/vinil-acetát kopolimer,



politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, poliuretán, zselatin, kollagén, keresztkötött kollagén és ezek kombinációi.

41. A 32. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett tartály egy perforált csődarabot tartalmaz.

42. A 32. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett tartály egy perforált de egyébként nem áteresztő fedőréteget tartalmaz az említett porózus mátrix körül elhelyezve.

43. A 42. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett fedőréteg egy polimer anyagot tartalmaz.

44. A 43. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag természetes és szintetikus forrásokból van kiválasztva.

45. A 44. igénypont szerinti eszköz, ahol az említett polimer anyag a következőkből álló csoportból van kiválasztva: keresztkötött kollagén, polietilén, szilikon, latex gyanta, polisztirén, akril gyanta, politejsav, polilaktid-glikolid kopolimer, polivinil-pirrolidon és ezek kombinációi.

46. A 32. igénypont szerinti eszköz, ahol a porózus mátrix hidroxilezett polivinil-acetátot tartalmaz, és a tartály egy perforált csődarabot tartalmaz.

47. A 35. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett immunsejteket egy hibridóma előállítására használjuk egy említett antigén elleni monoklonális antitest előállítására.

48. Eljárás egy emlős immunizálására egy antigénnel egy hibridóma előállítására egy említett antigén elleni monoklonális antitest előállítása céljából, azzal jellemezve, hogy az emlőst a 12. igénypont szerinti eljárást alkalmazva immunizáljuk.

49. Eljárás egy emlős immunizálására egy antigénnel egy hibridóma előállítására egy említett antigén elleni monoklonális



antitest előállítására céljából, azzal jellemezve, hogy az emlőst a 21. igénypont szerinti eszközt alkalmazva immunizáljuk.

50. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett antigénre adott immunválaszt a következőkből álló csoportból választjuk ki: profilaktikus vakcinázás, terápiás vakcinázás, sejtközvetített immunitás, humorális immunitás, nyálkahártya-immunitás, hosszú idejű immunitás és ezek kombinációi.

51. Eljárás előre kiválasztott antigénnel szembeni monoklonális antitesteket termelő hibridómák előállítására, azzal jellemezve, hogy egymás után a következő lépéseket hajtjuk végre:

(a) humán perifériás vér limfocitákat viszünk be egy súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egér keringésébe, és hagyjuk, hogy az említett limfociták az említett egér immunrendszerét benépesítsék;

(b) az említett egérbe egy 21. igénypont szerinti eszközt ültetünk be, az említett eszközben lévő antigén az említett előre kiválasztott antigént tartalmazza;

(c) összegyűjtjük az immunsejteket az említett eszközből;

(d) az említett összegyűjtött immunsejtekben jelenlévő B-limfocitákból hibridómákat készítünk; és

(e) egy szkrínelési módszerrel azonosítjuk azokat a hibridómákat, melyek olyan monoklonális antitesteket termelnek, amik felismerik az említett előre kiválasztott antigént.

52. Eljárás egy emlős immunsejtjeinek transzfektálására genetikai anyaggal, azzal jellemezve, hogy az említett genetikai anyagot egy perforált de egyébként nem áteresztő tartályban po-



rózus mátrixot tartalmazó eszköz mátrixába visszük be, és az említett eszközt az említett emlősbe beültetjük.

53. Az 52. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a genetikai anyagot a következőkből álló csoportból választjuk ki: DNS, RNS és cDNS.

54. Az 52. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett genetikai anyag egy antigént kódol.

55. Eljárás egy immunválasz okozta betegség vagy állapot kezelésére vagy megelőzésére azzal jellemezve, hogy az említett immunválaszt a 15. igénypont szerint szuppresszáljuk.

56. Az 55. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett betegséget vagy állapotot a következőkből álló csoportból választjuk ki: allergiák, transzplantációs kilökődés és autoimmun betegségek.

57. Eljárás egy antigénnel szembeni immunválasz módosítására egy emlősben, azzal jellemezve, hogy az említett emlős testébe egy, az említett antigént tartalmazó eszközt ültetünk be, mely továbbá olyan eszközöket* tartalmaz, mely korlátozza a molekulák passzív diffúzióját az említett eszközből anélkül, hogy korlátozná az immunsejtek aktív mozgását az említett eszközbe vagy abból ki.

59 oldal leírás
330 oldal rajz

92 oldal

TR

A meghatalmazott: 1



Parragh Gáborné dr.

szabadalmi ügyvivő

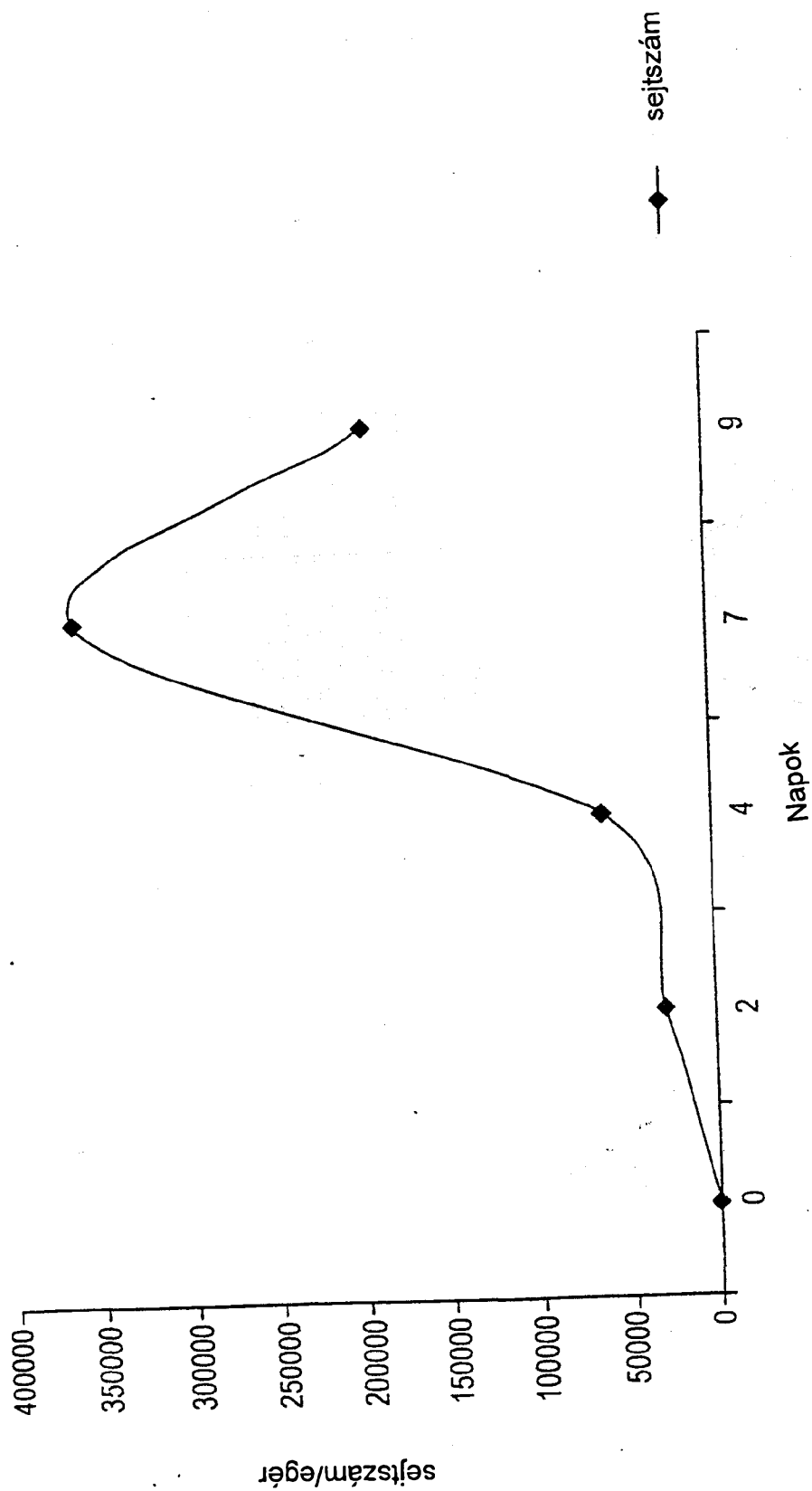
az S.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

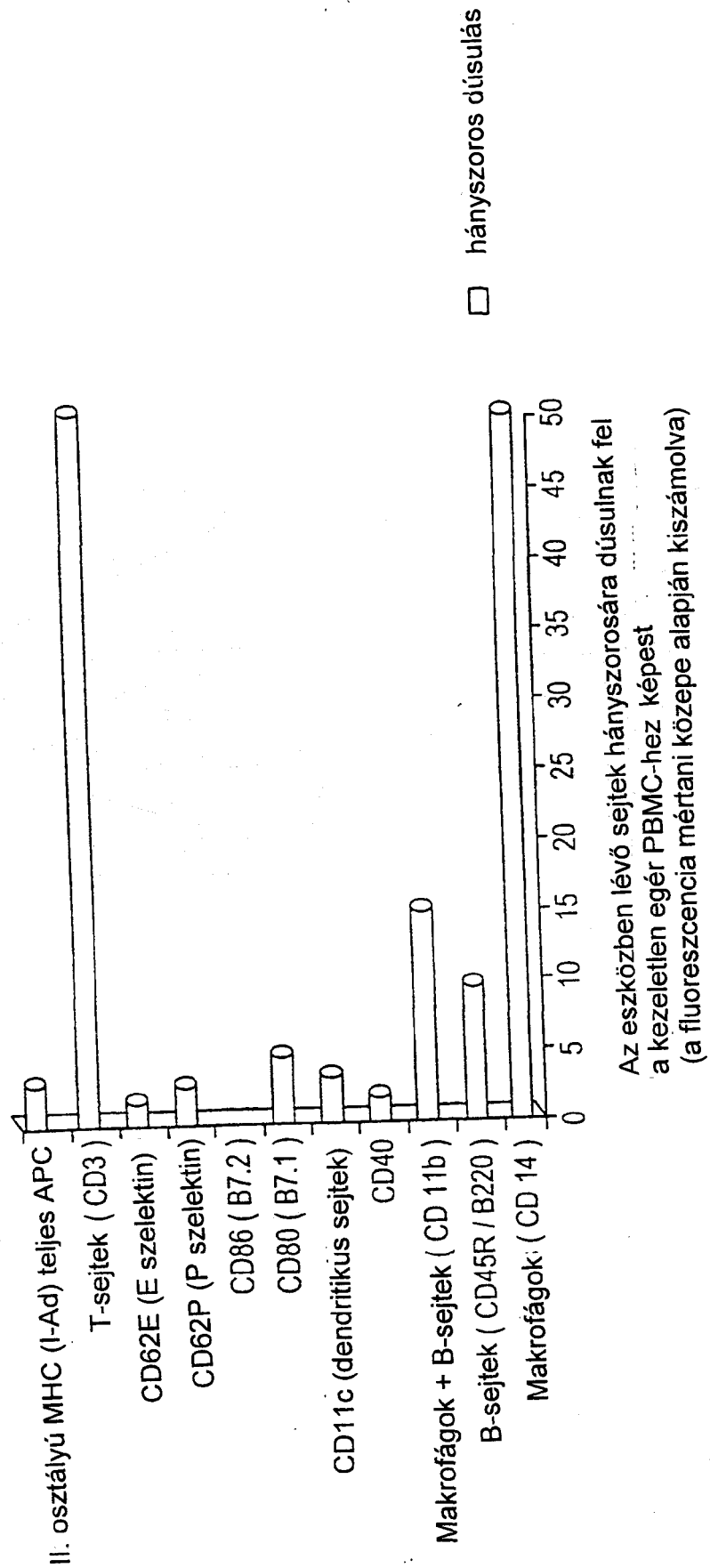
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

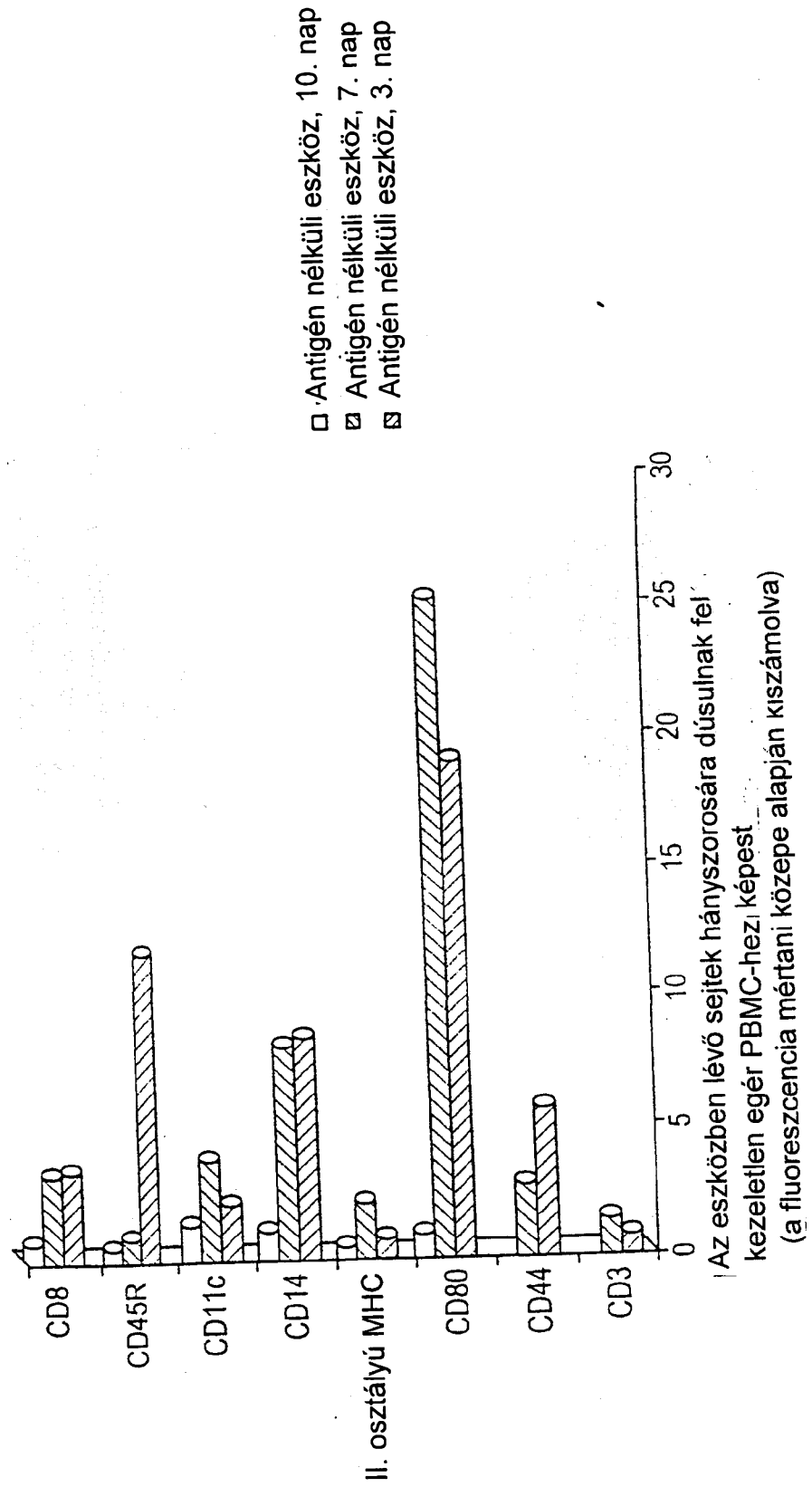
1. ábra



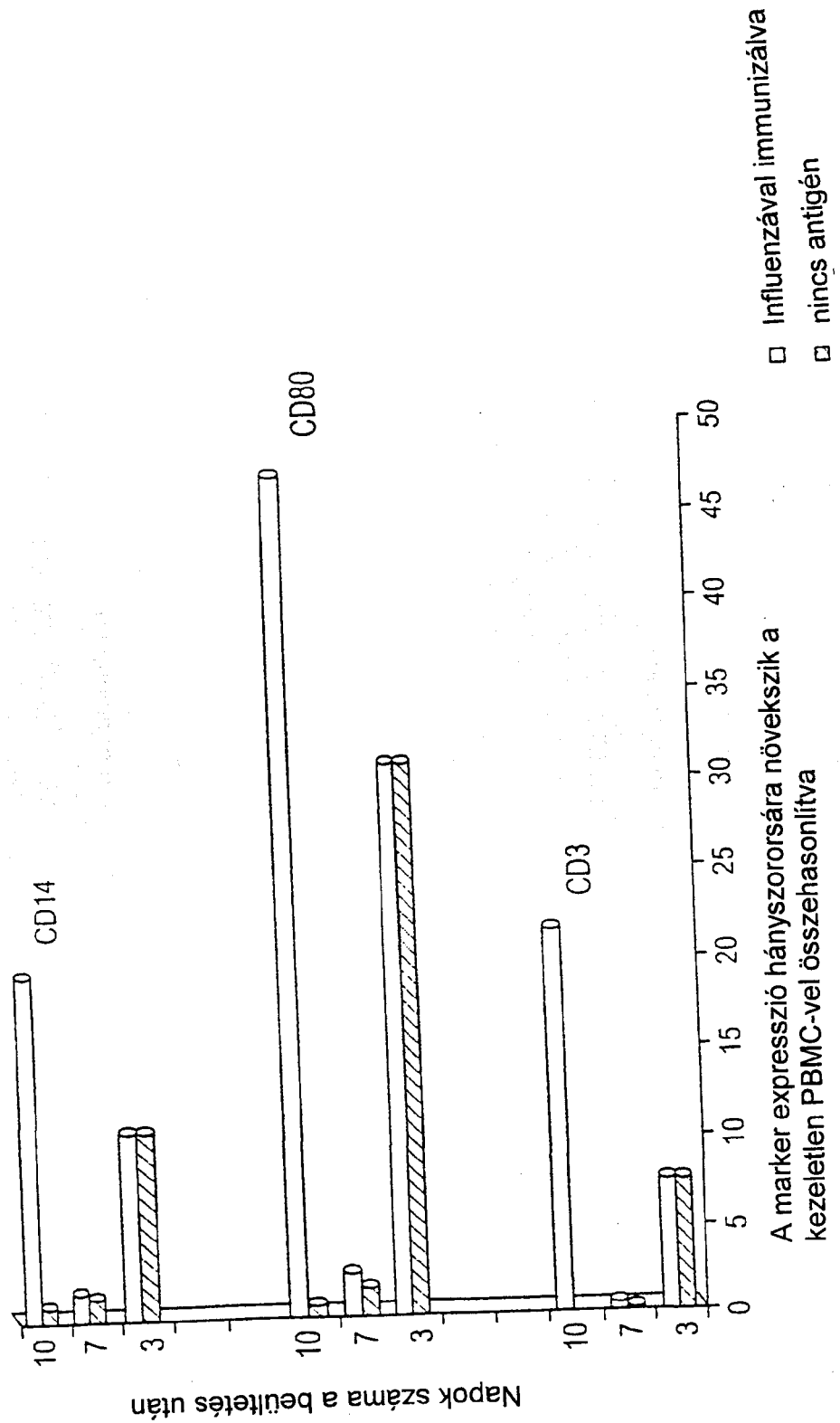
2. ábra



3. ábra

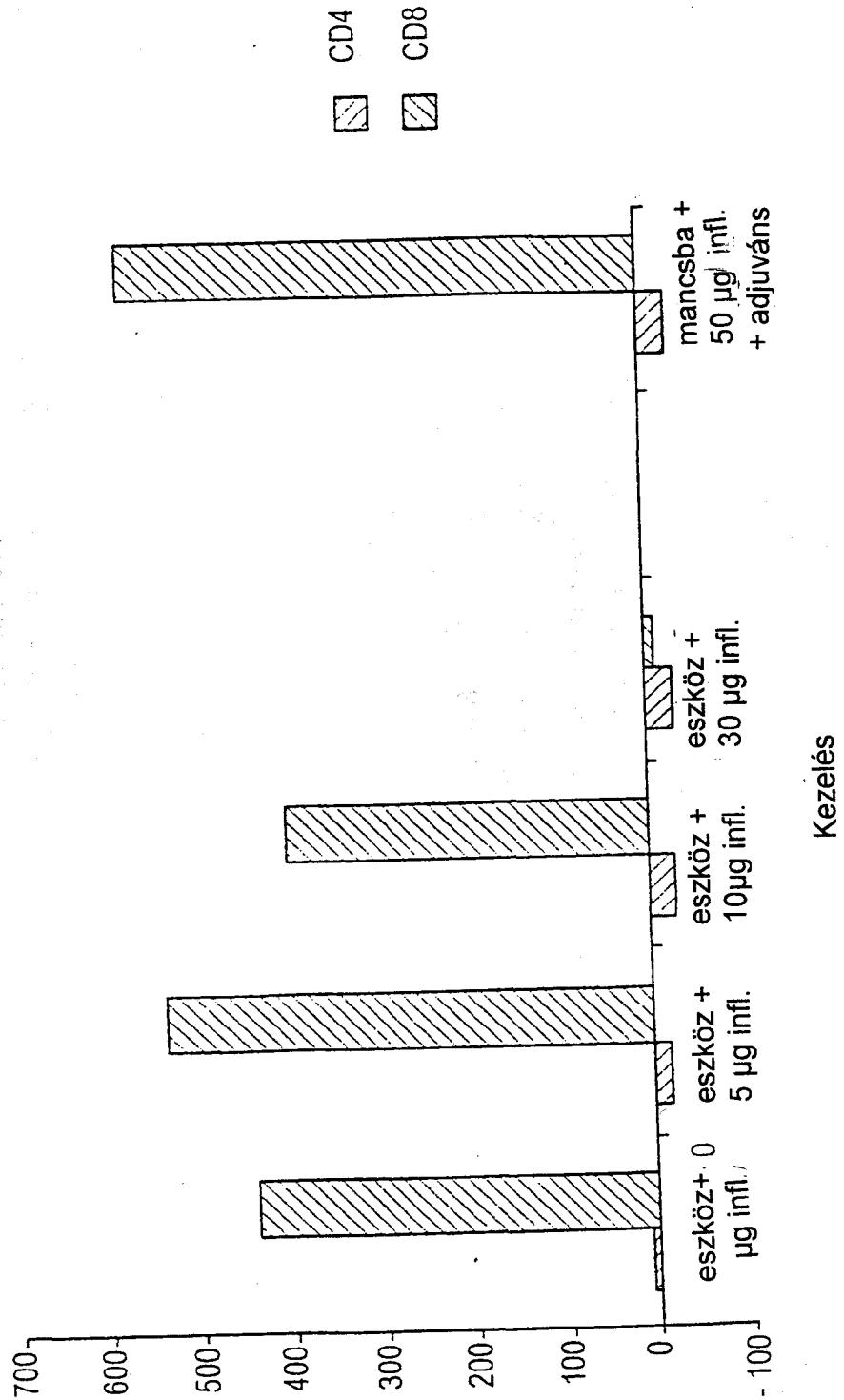


4. ábra

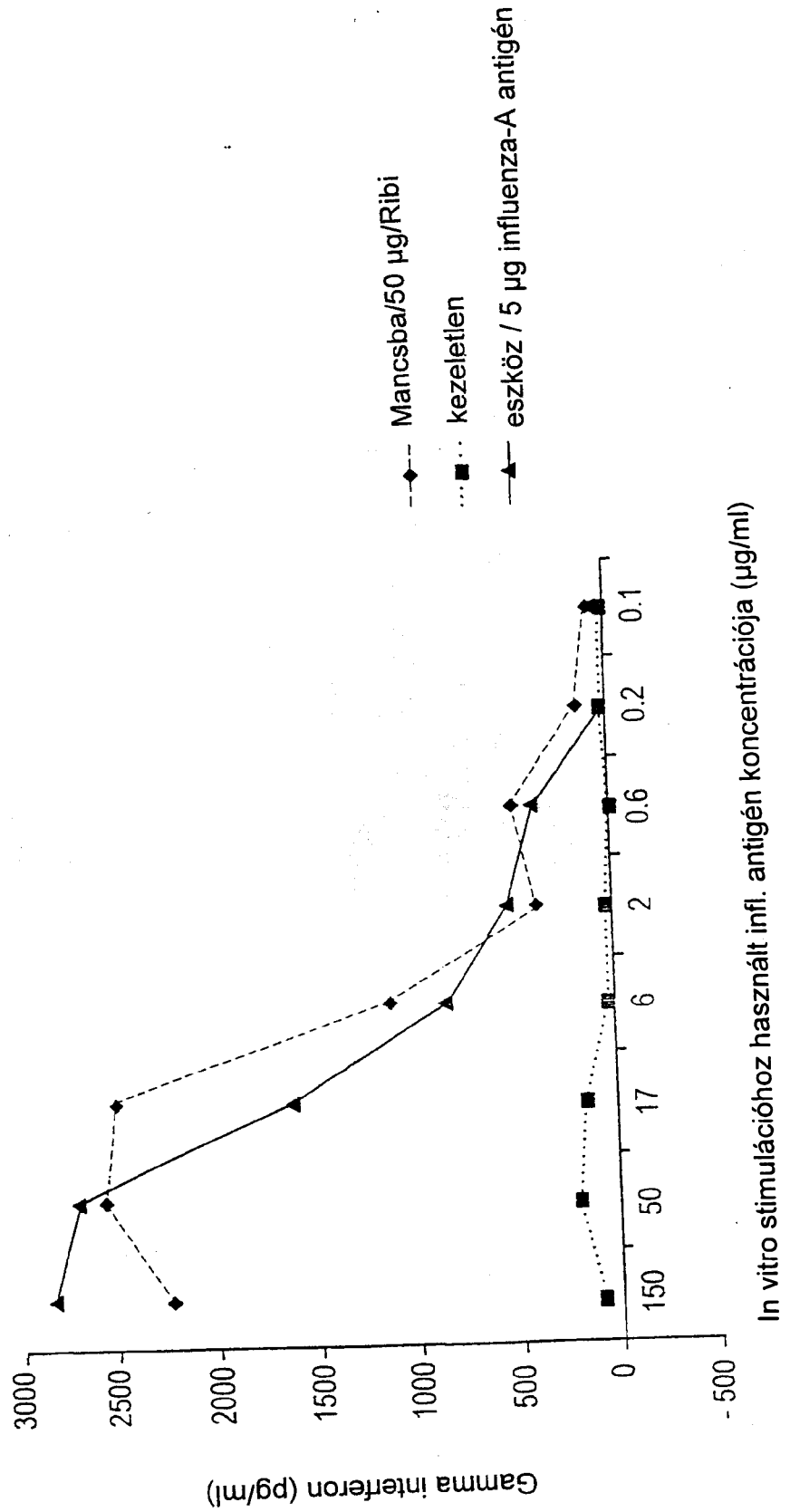


5. ábra

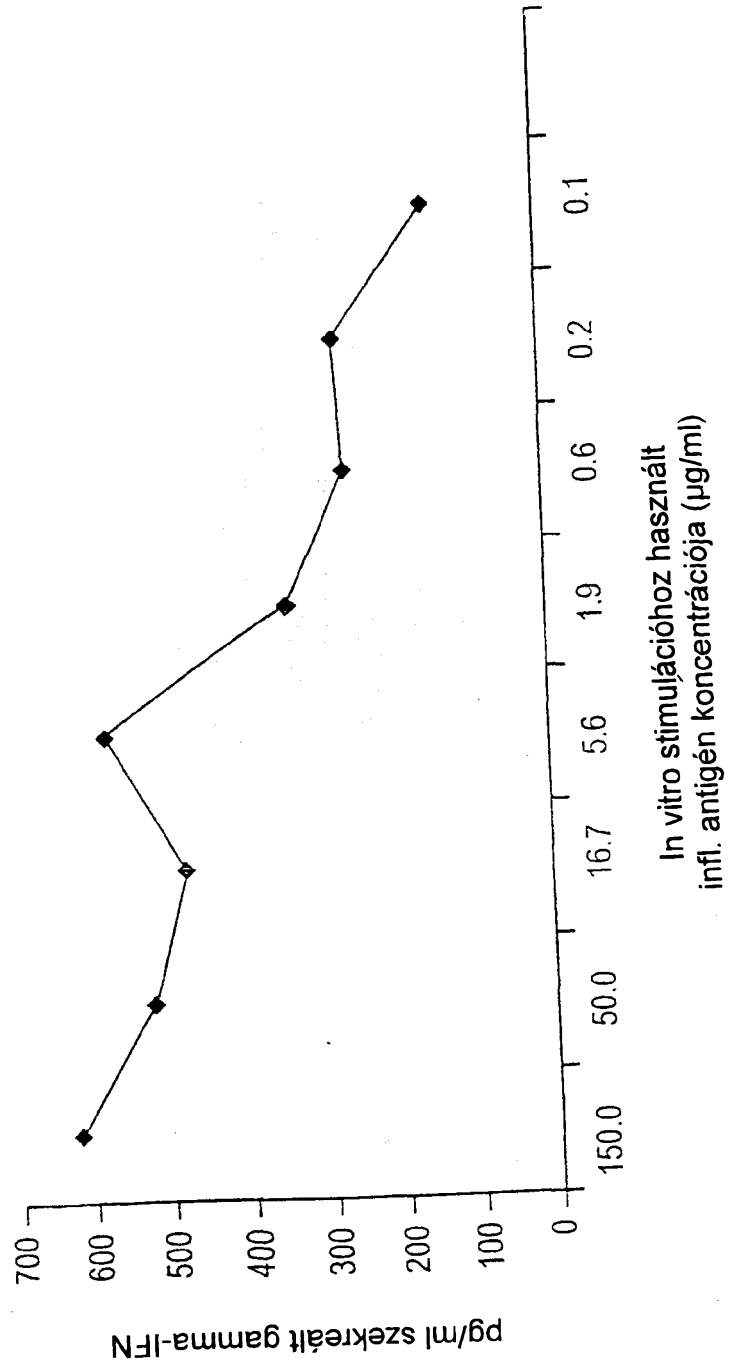
az expresszió %-os változása kezeltten egerekkel összehasonlítva (%)



6. ábra

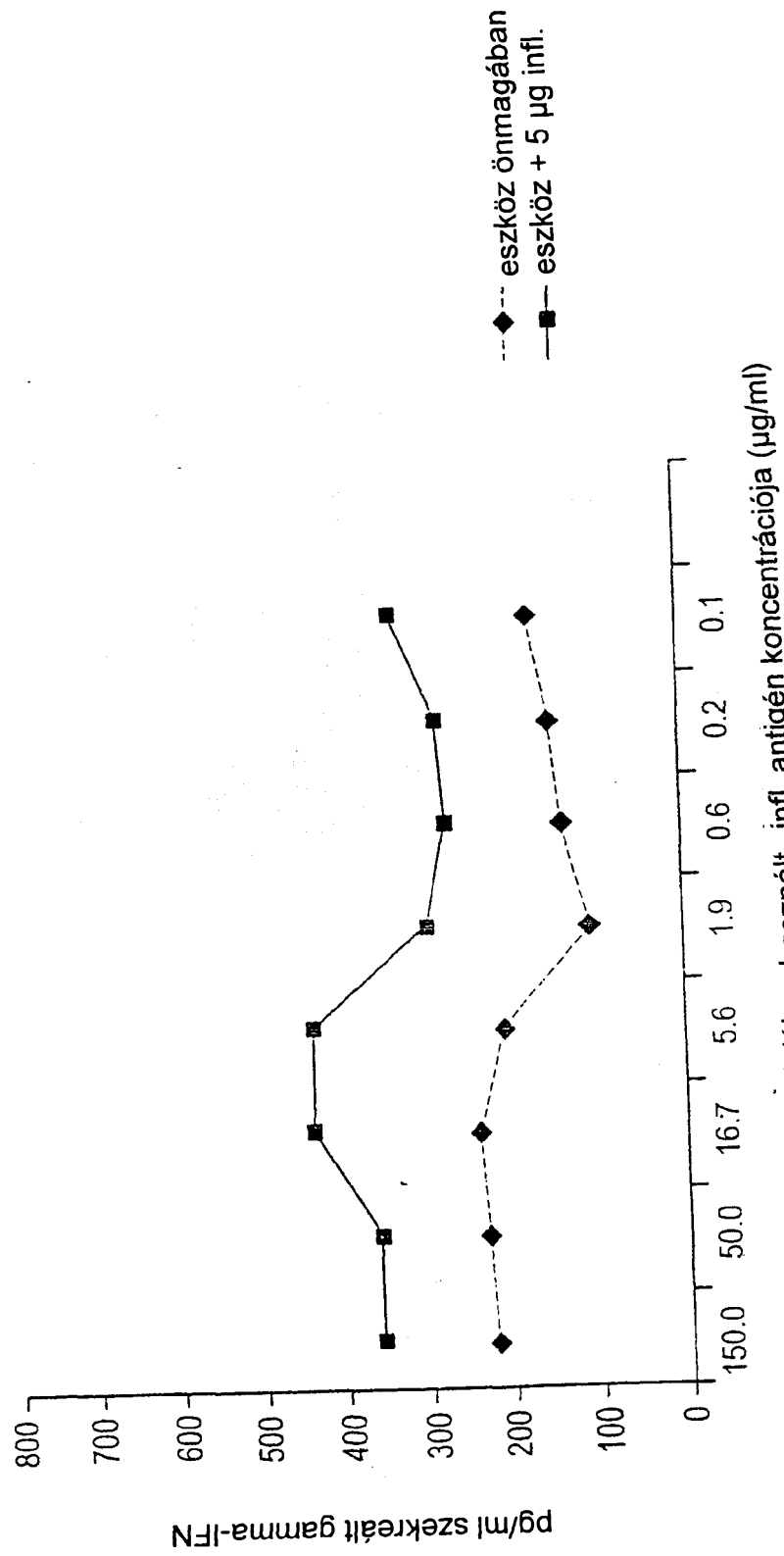


7. ábra



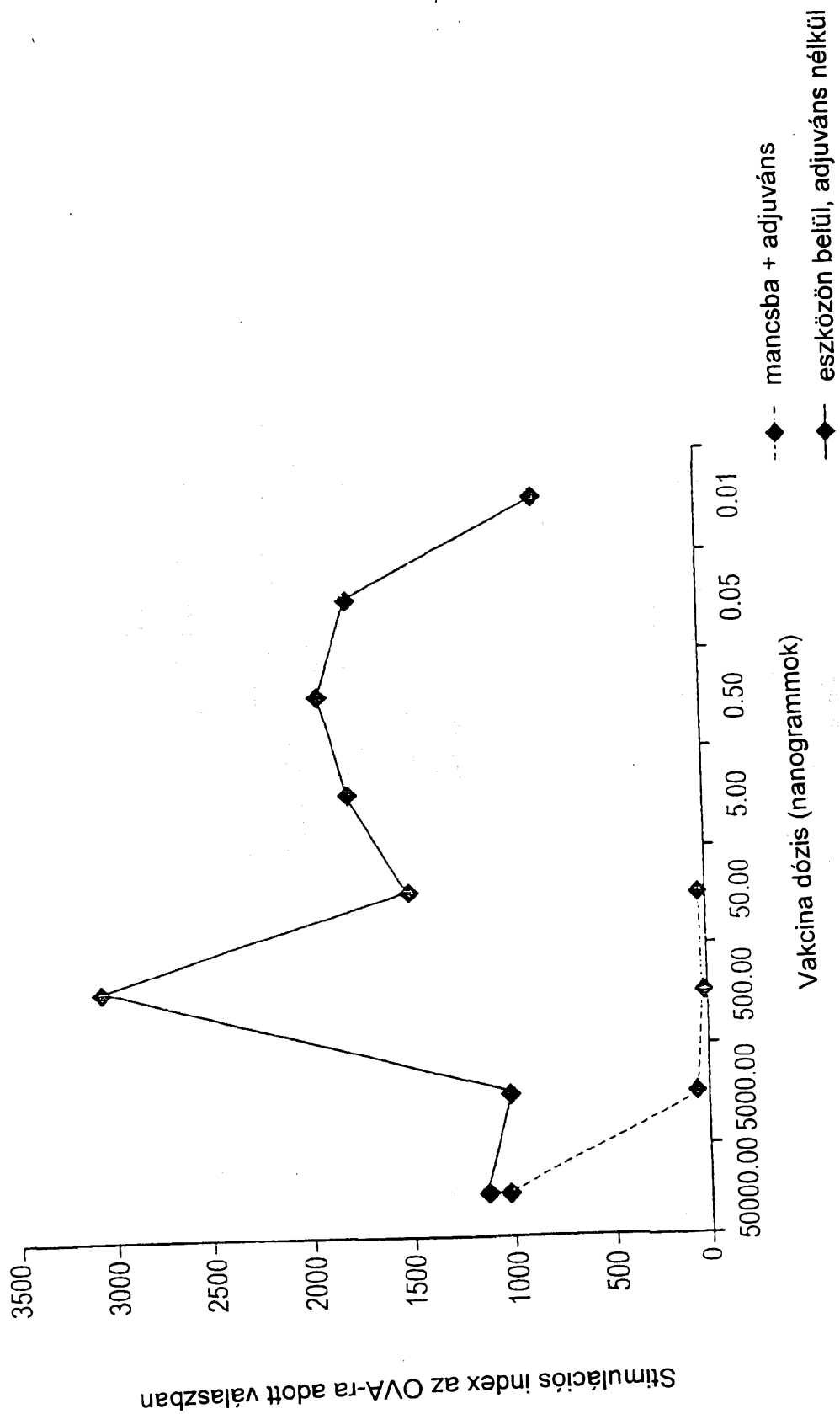
FN

8. ábra

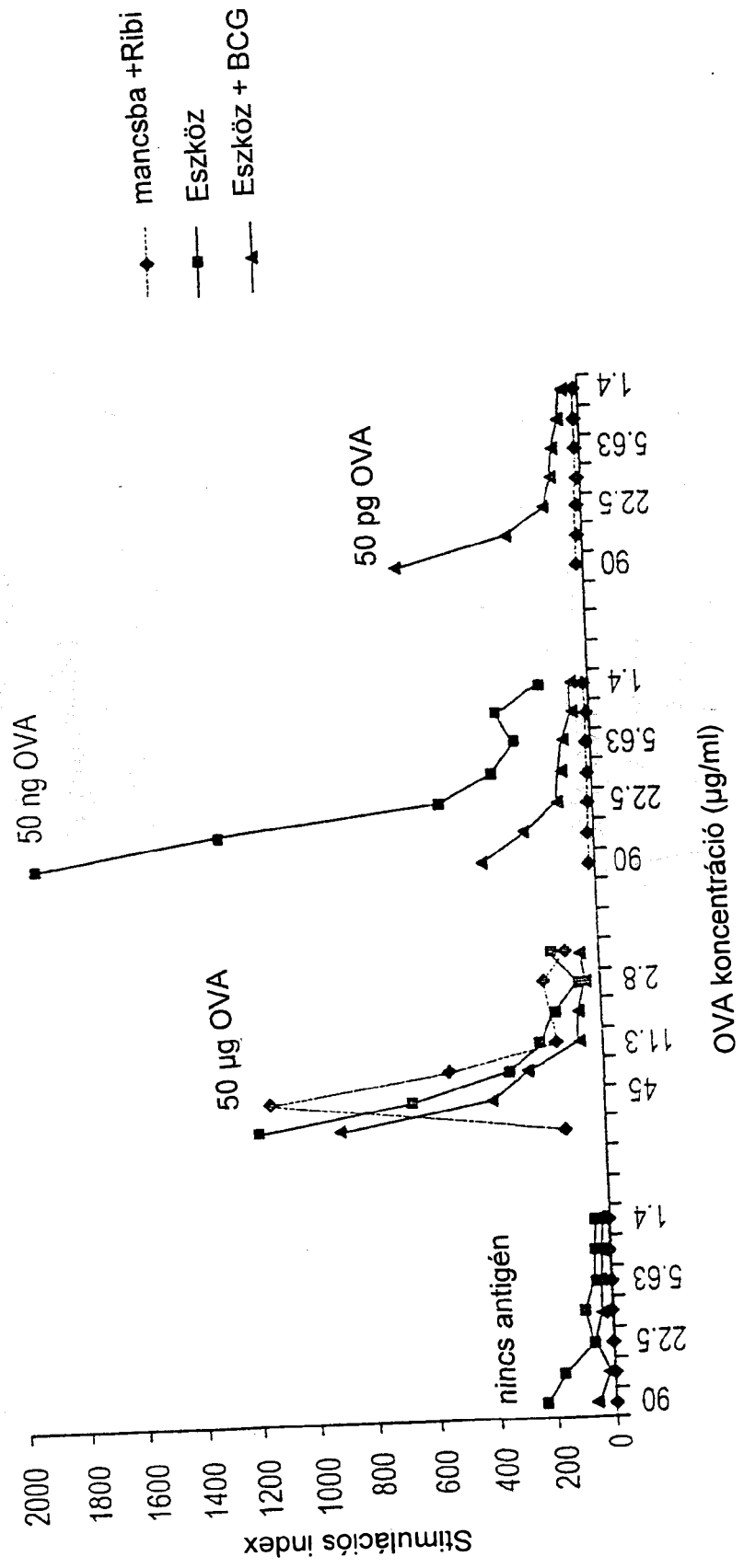


A sejtek in vitro stimulációhoz használt infl. antigén koncentrációja (µg/ml)

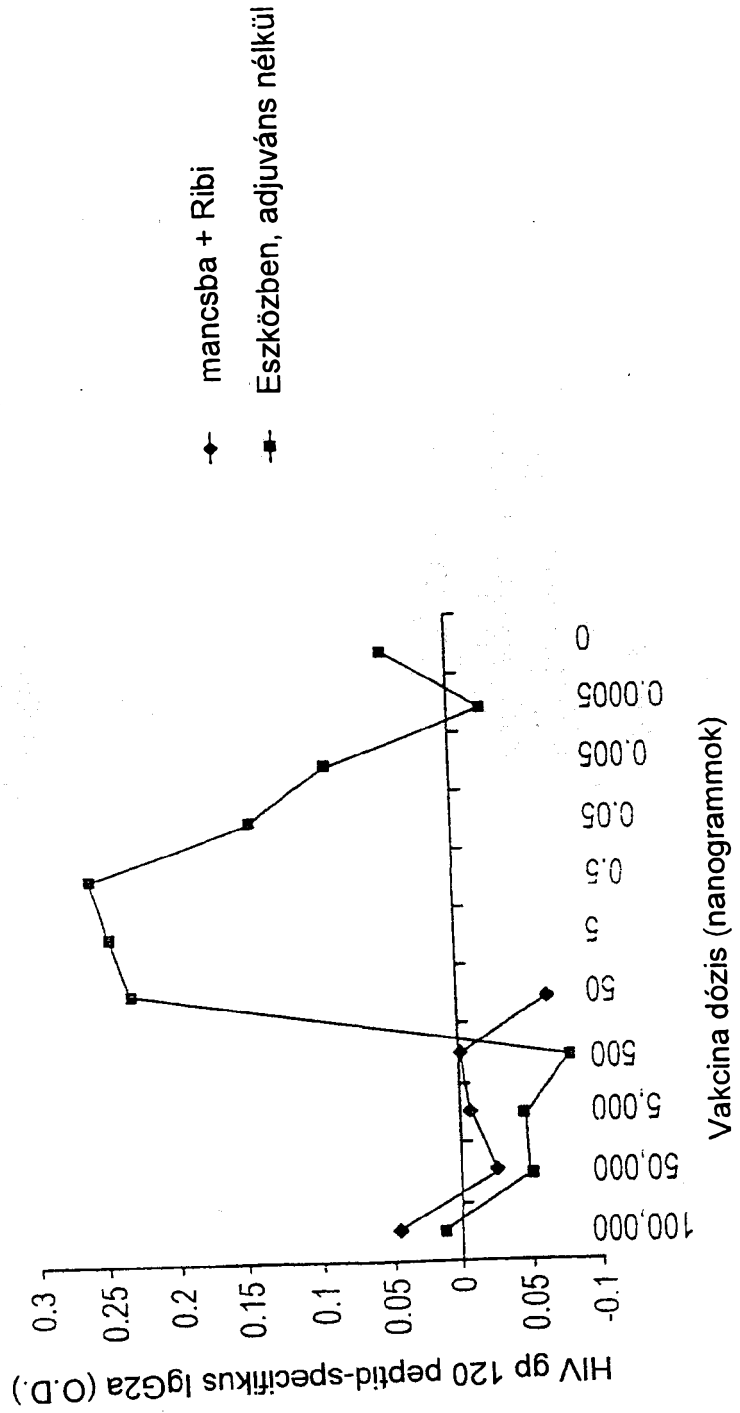
9. ábra



10. ábra

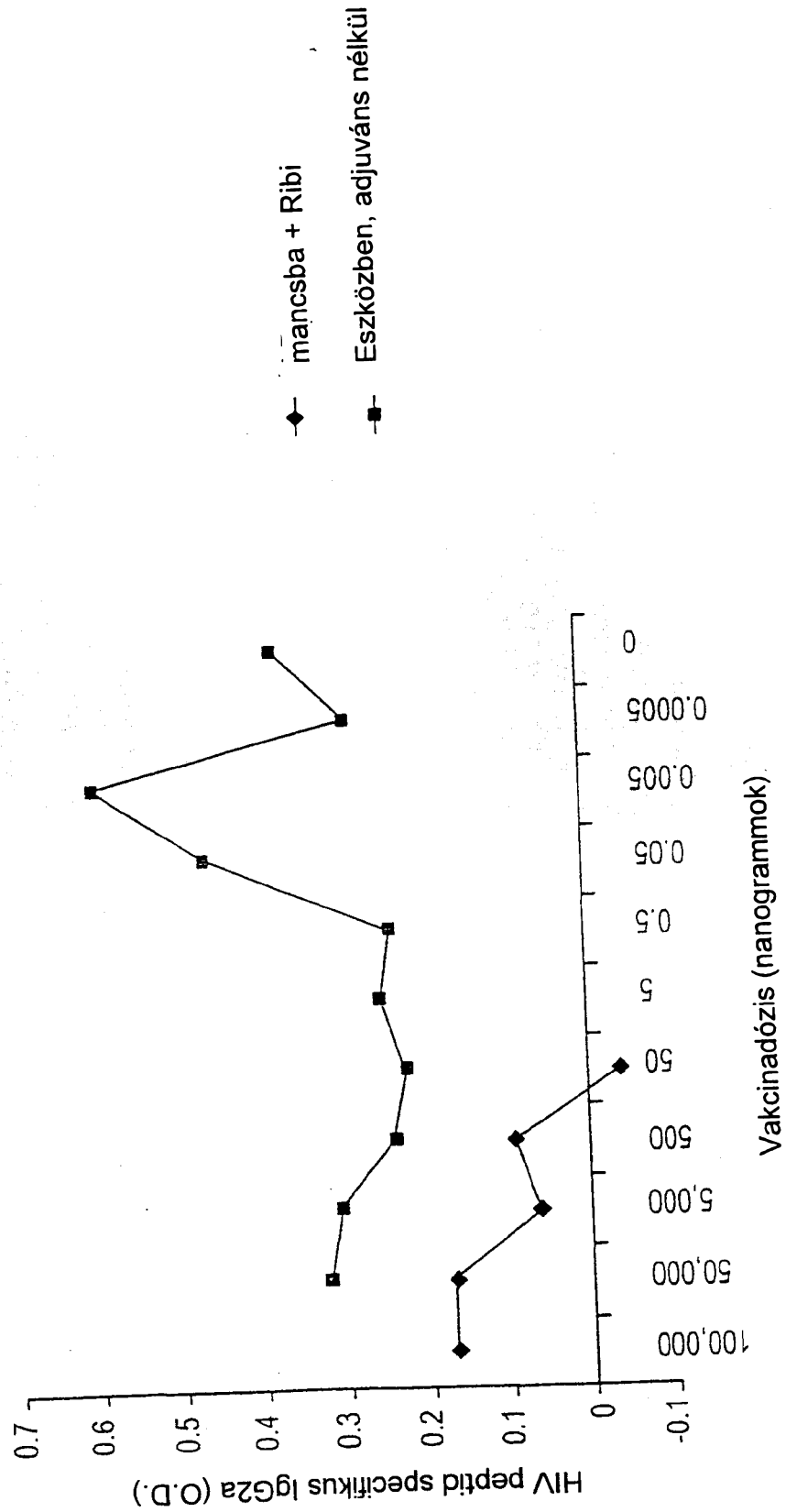


11. ábra

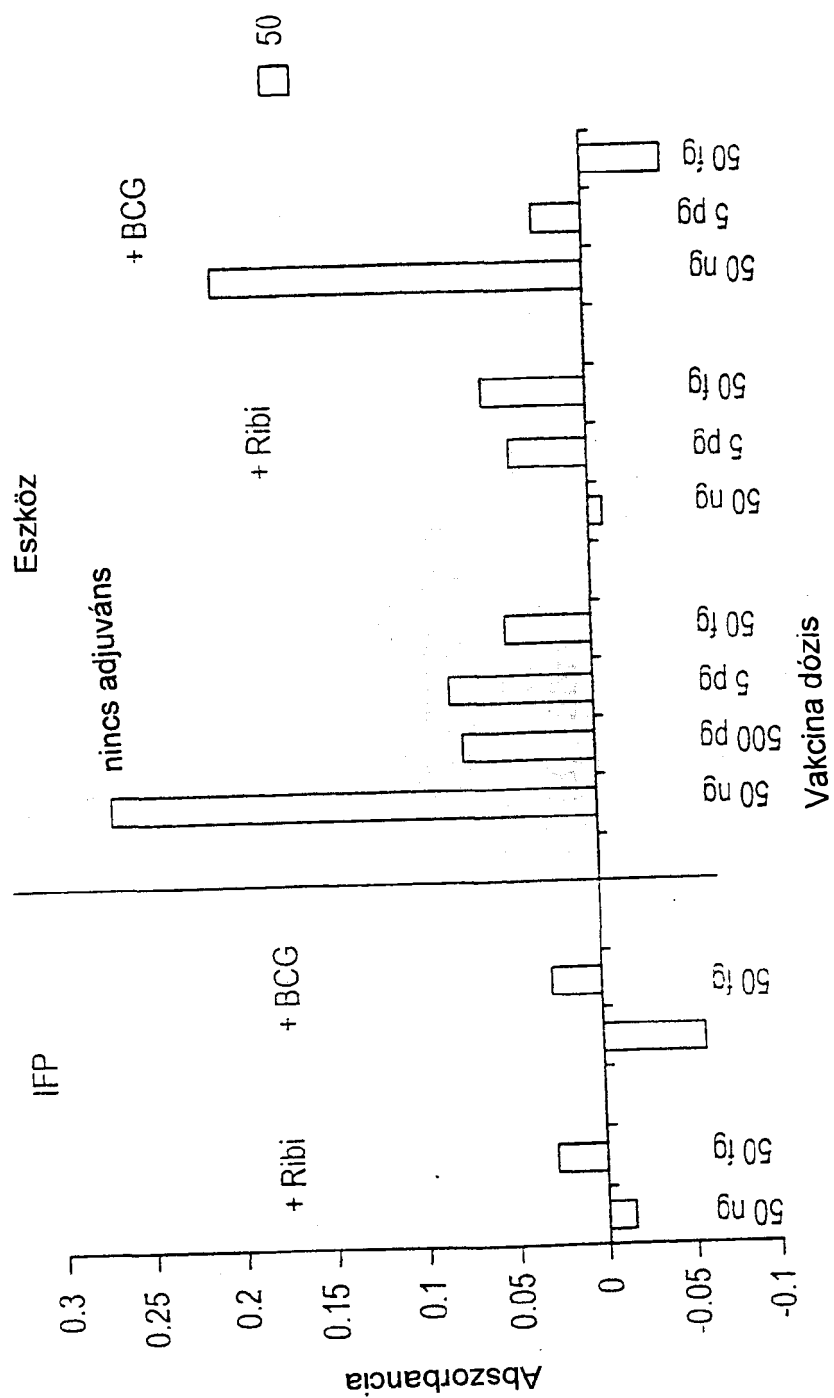


Ru

12. ábra

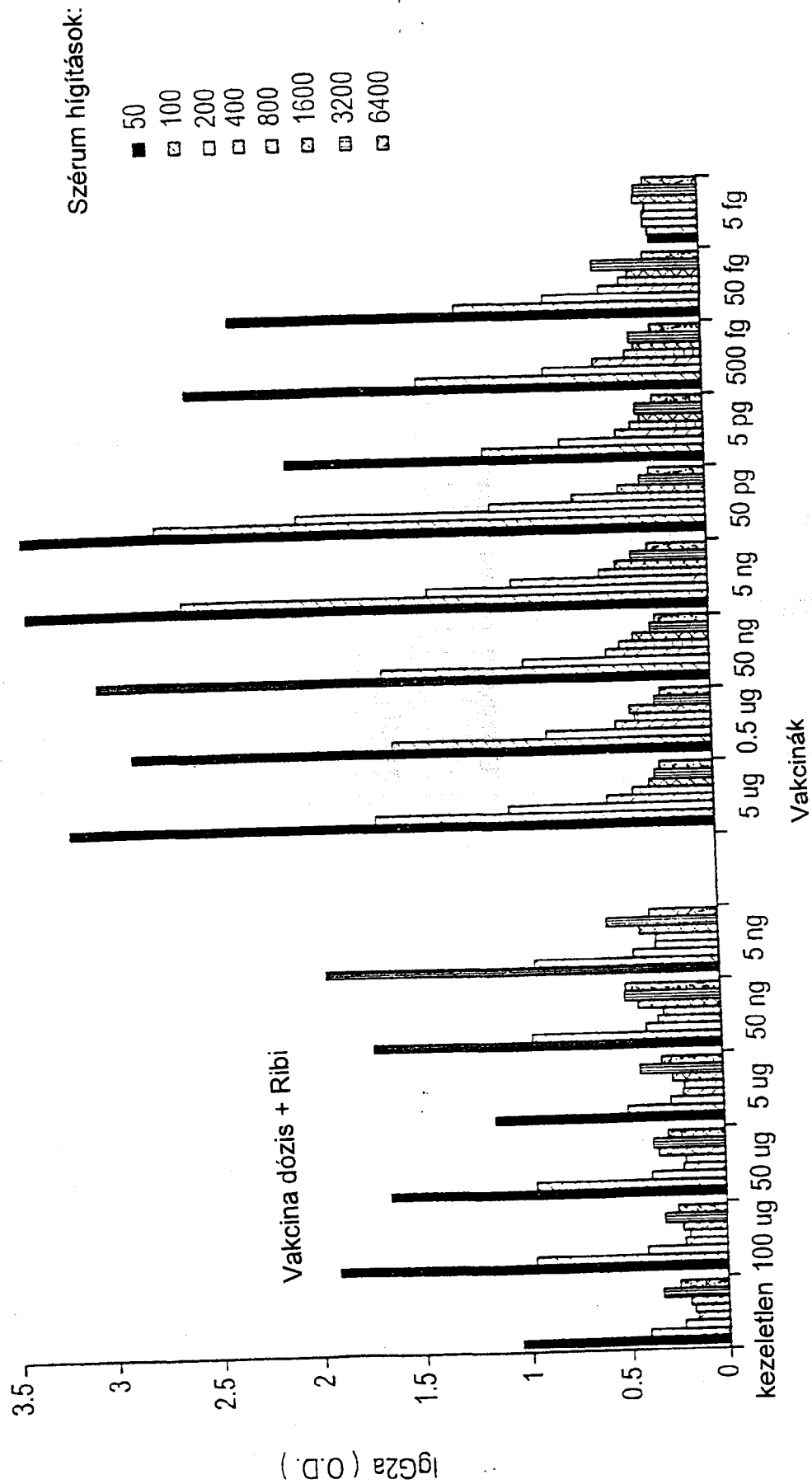


13. ábra

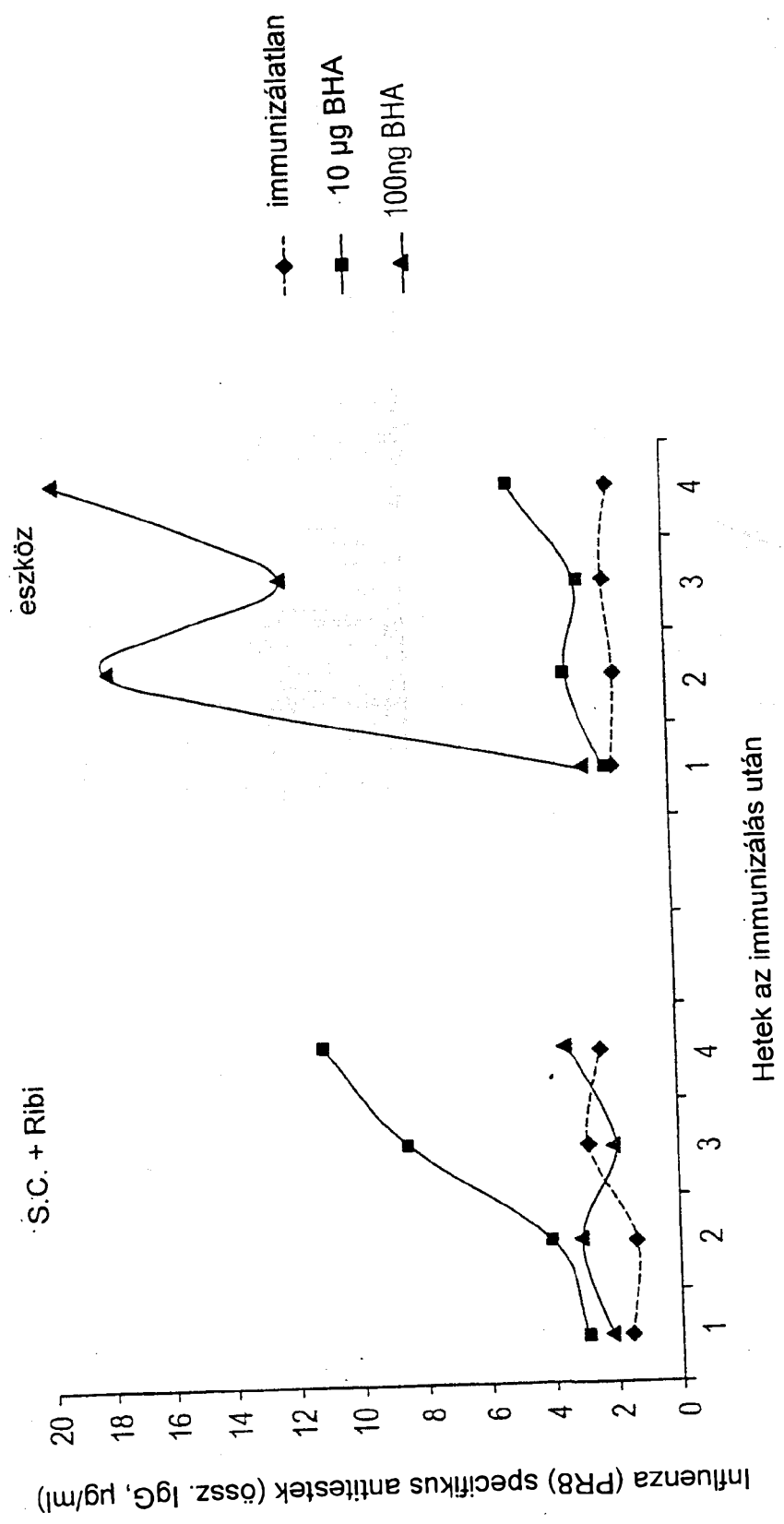


14. ábra

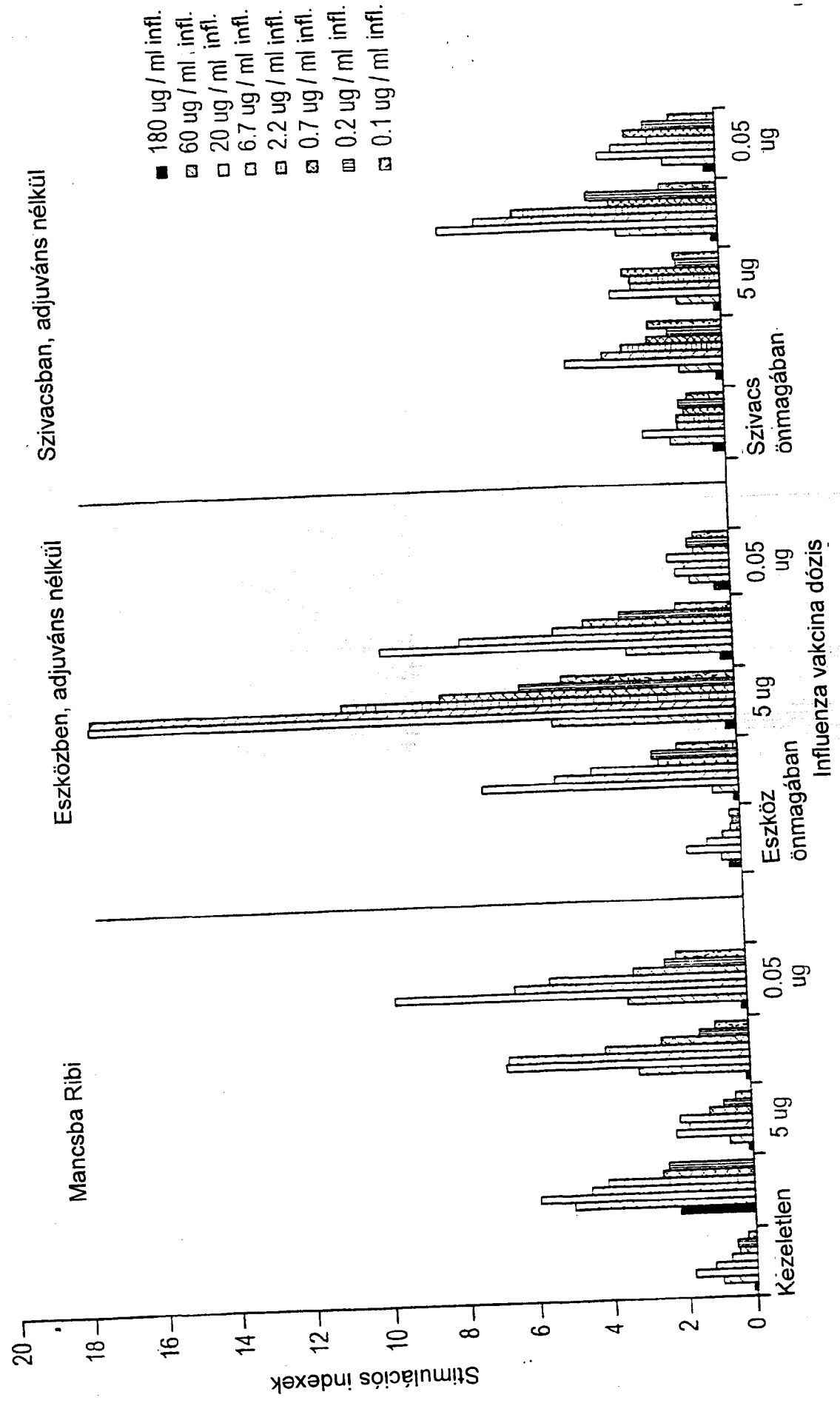
Eszközben, adjuváns nélkül



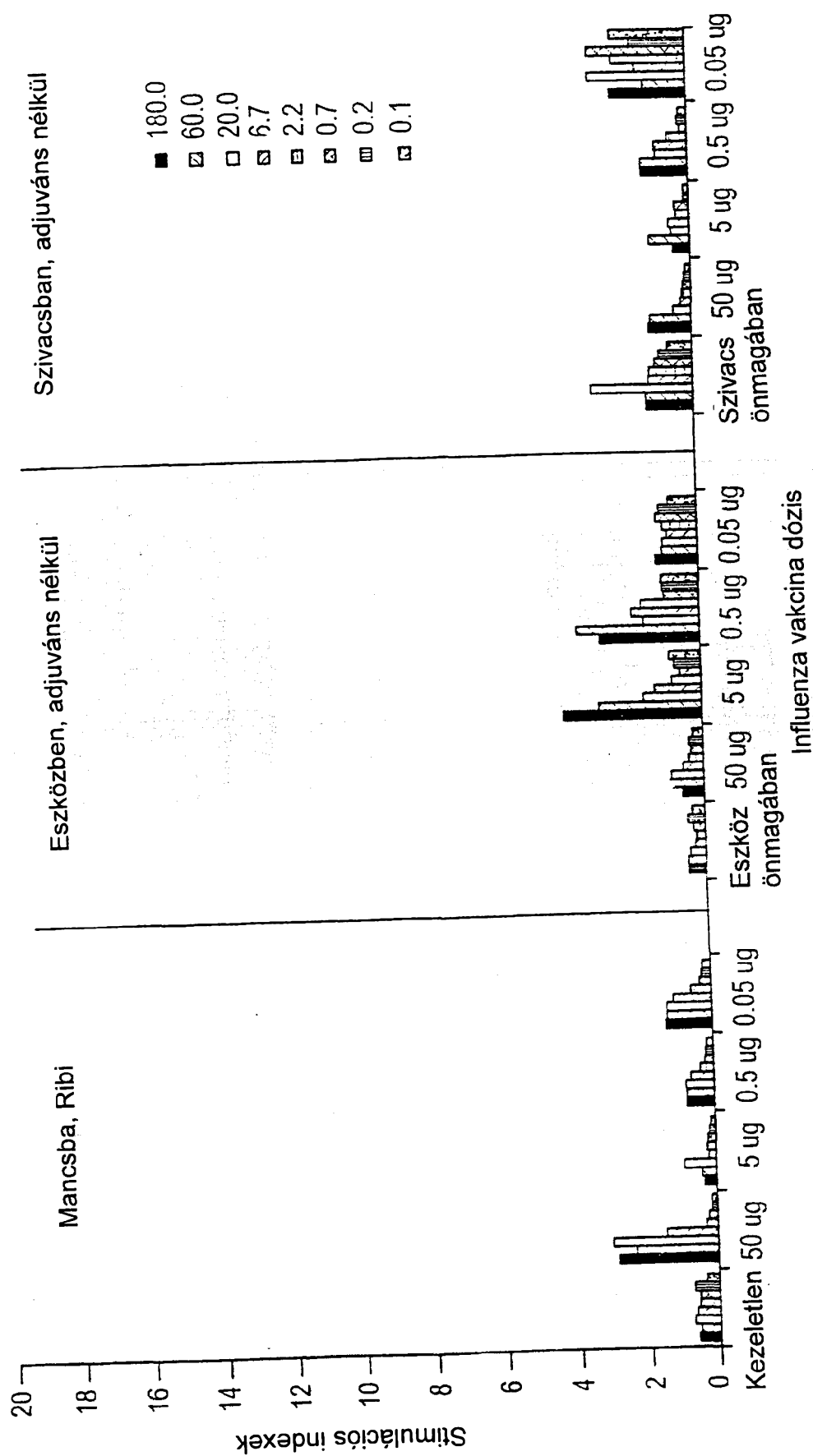
15. ábra



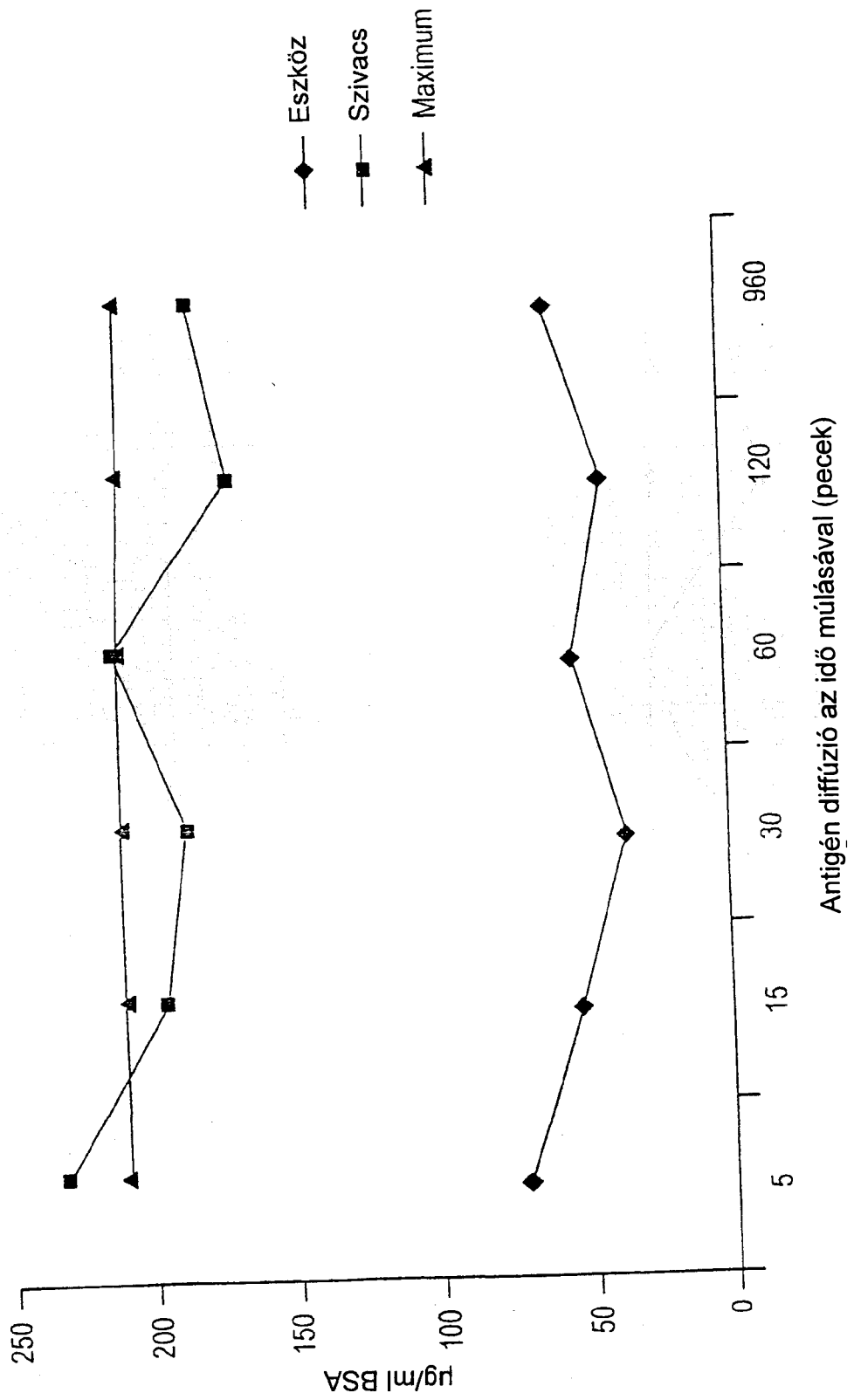
16. ábra



17. ábra

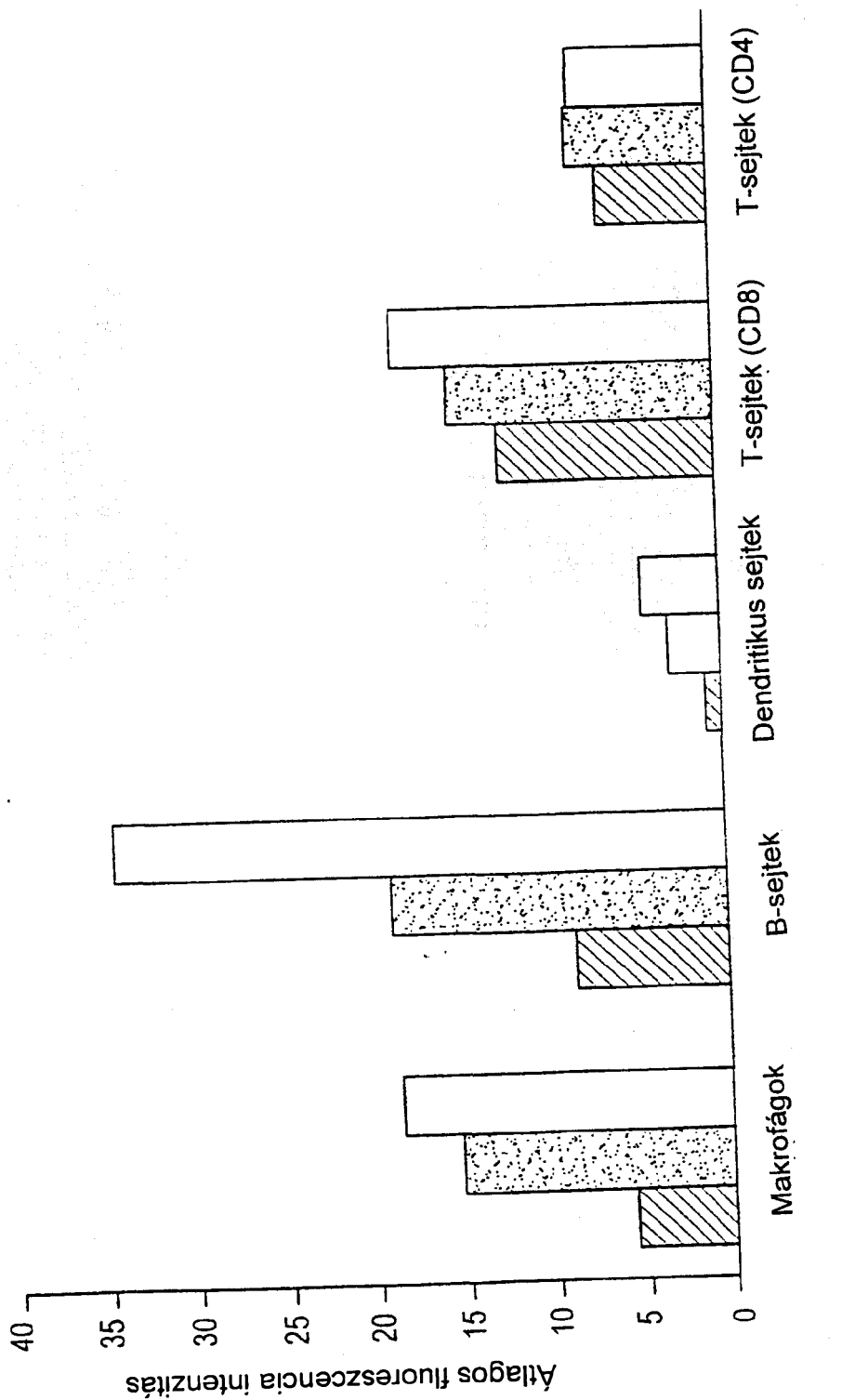


18. ábra

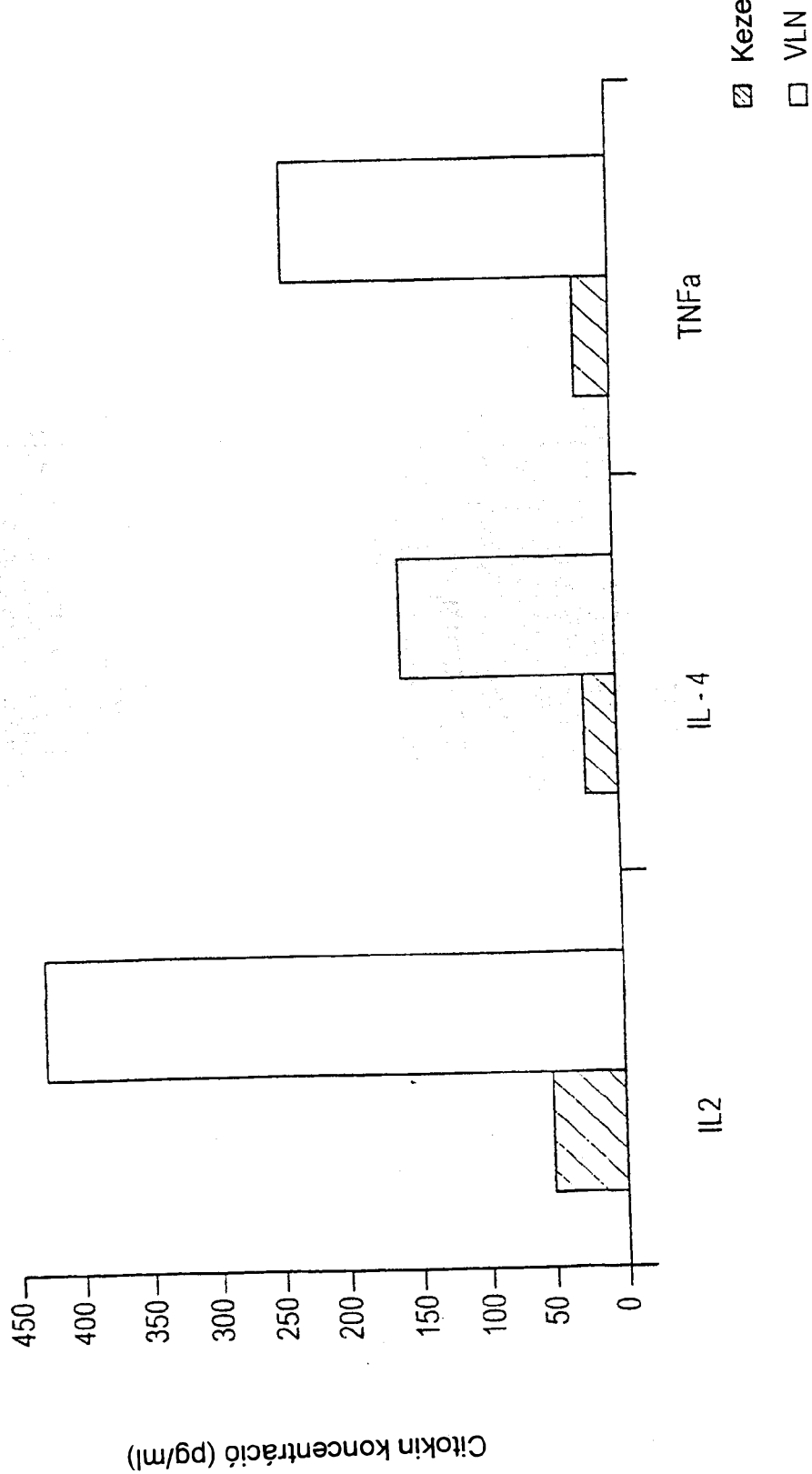




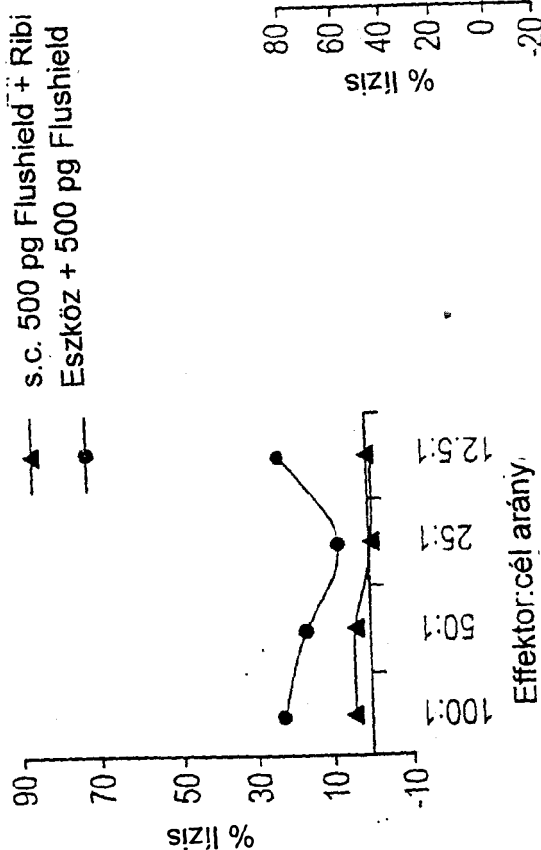
19. ábra



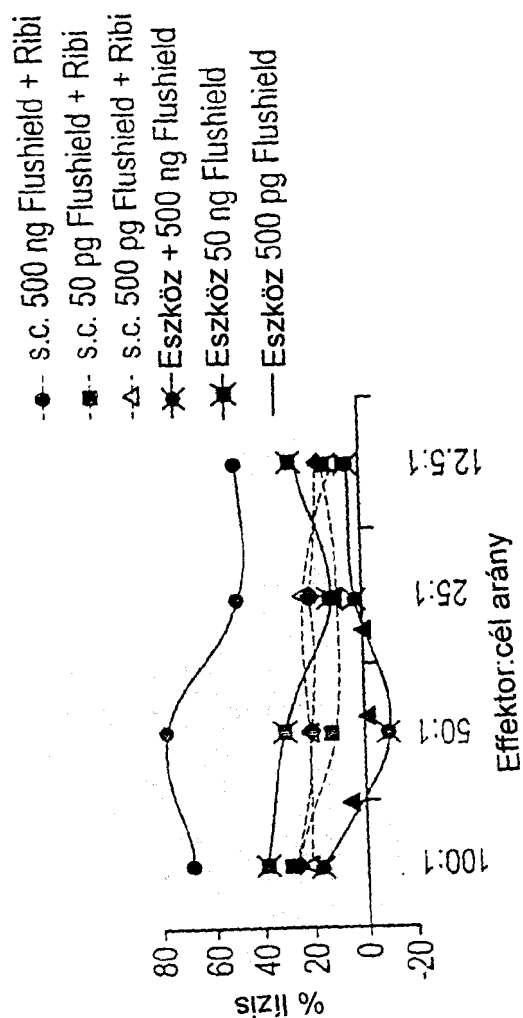
20. ábra



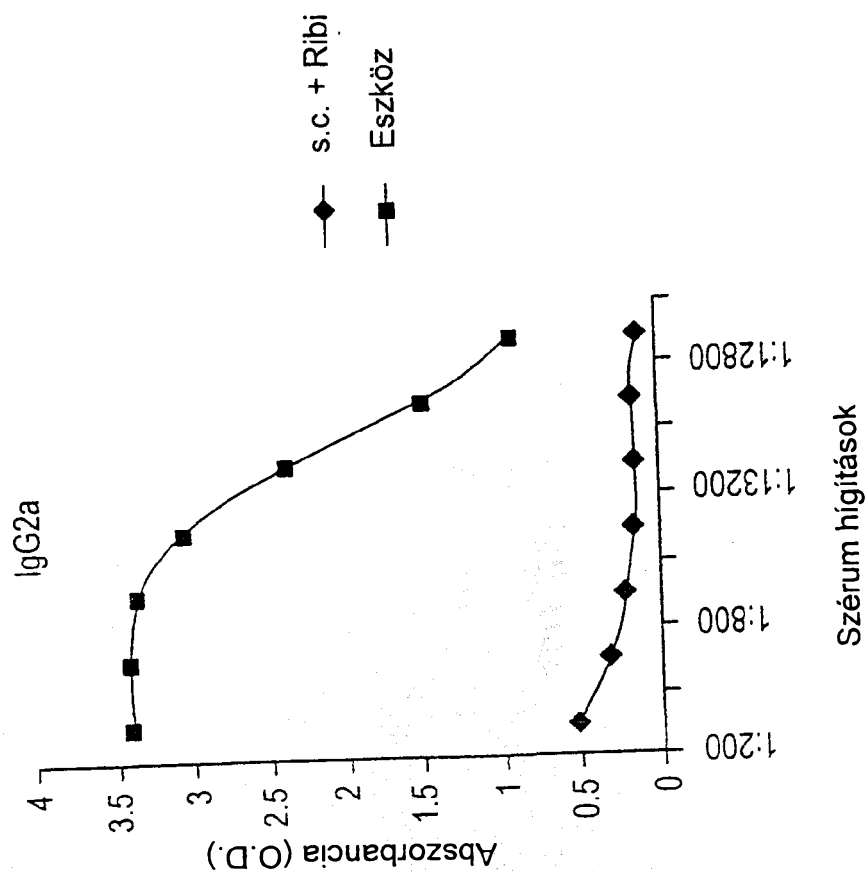
21A. ábra



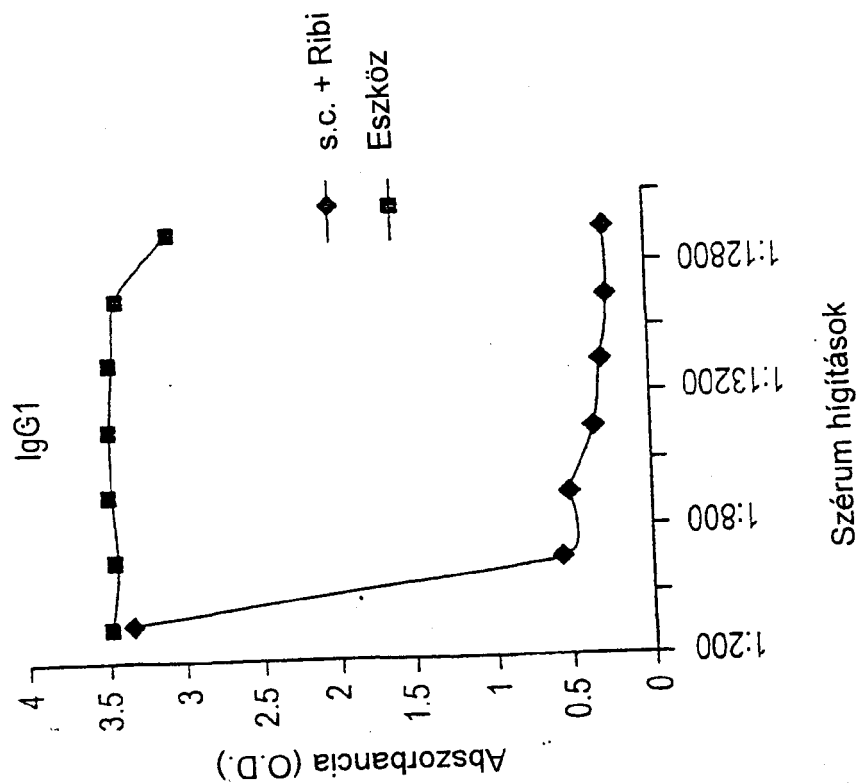
21B. ábra



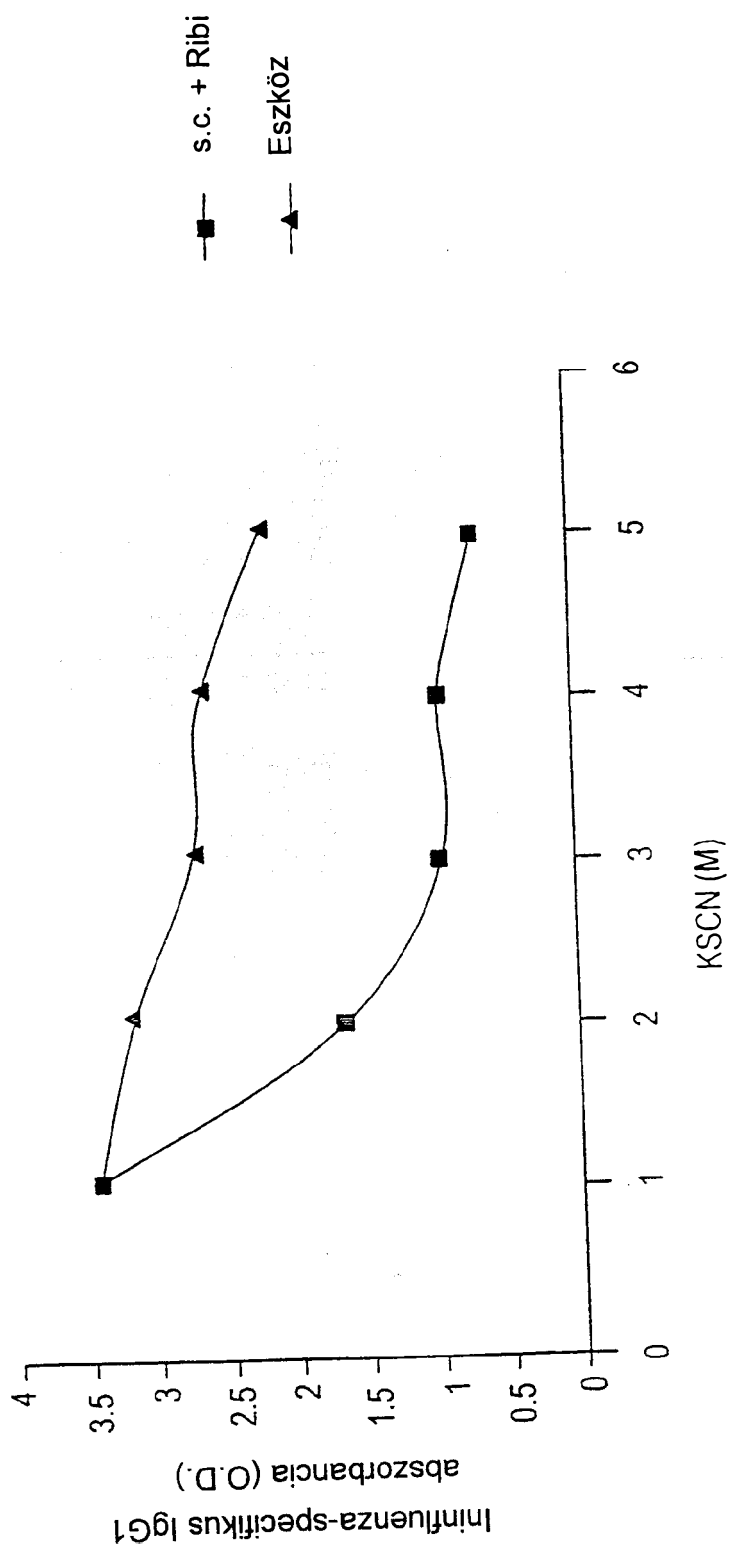
22B. ábra



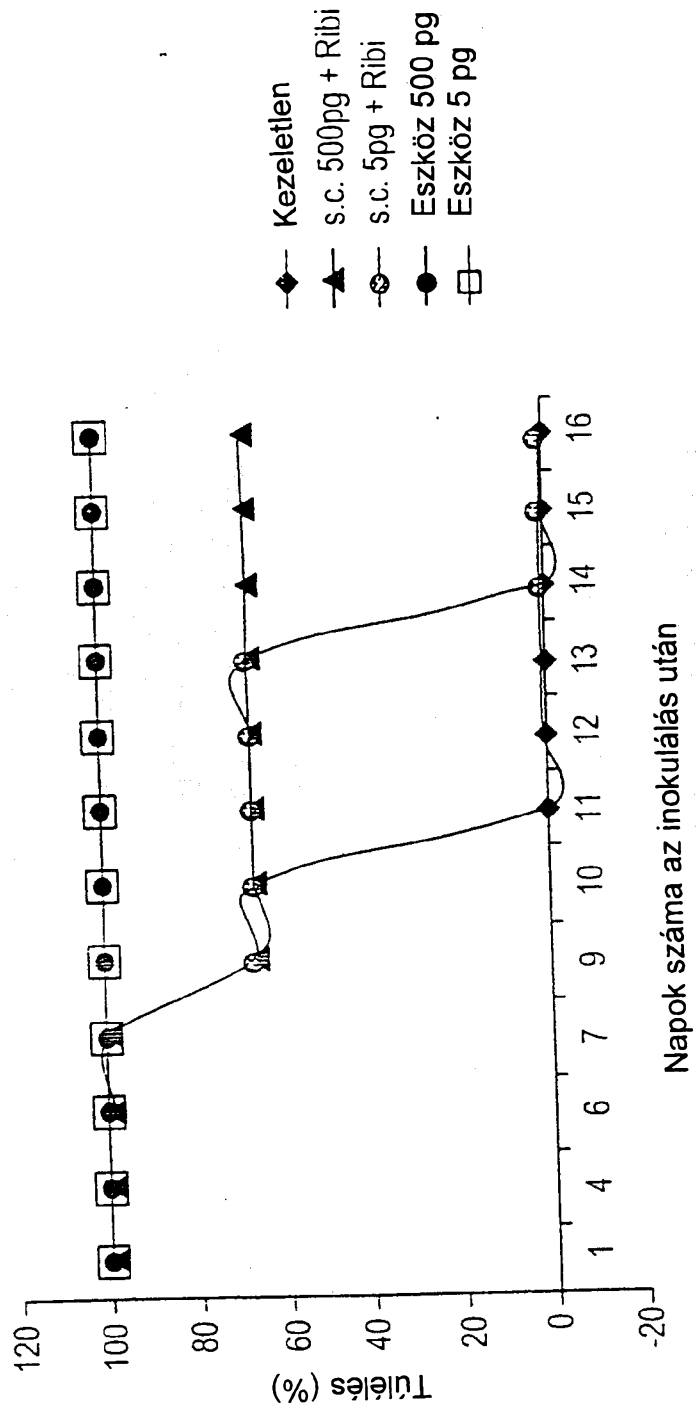
22A. ábra



23. ábra

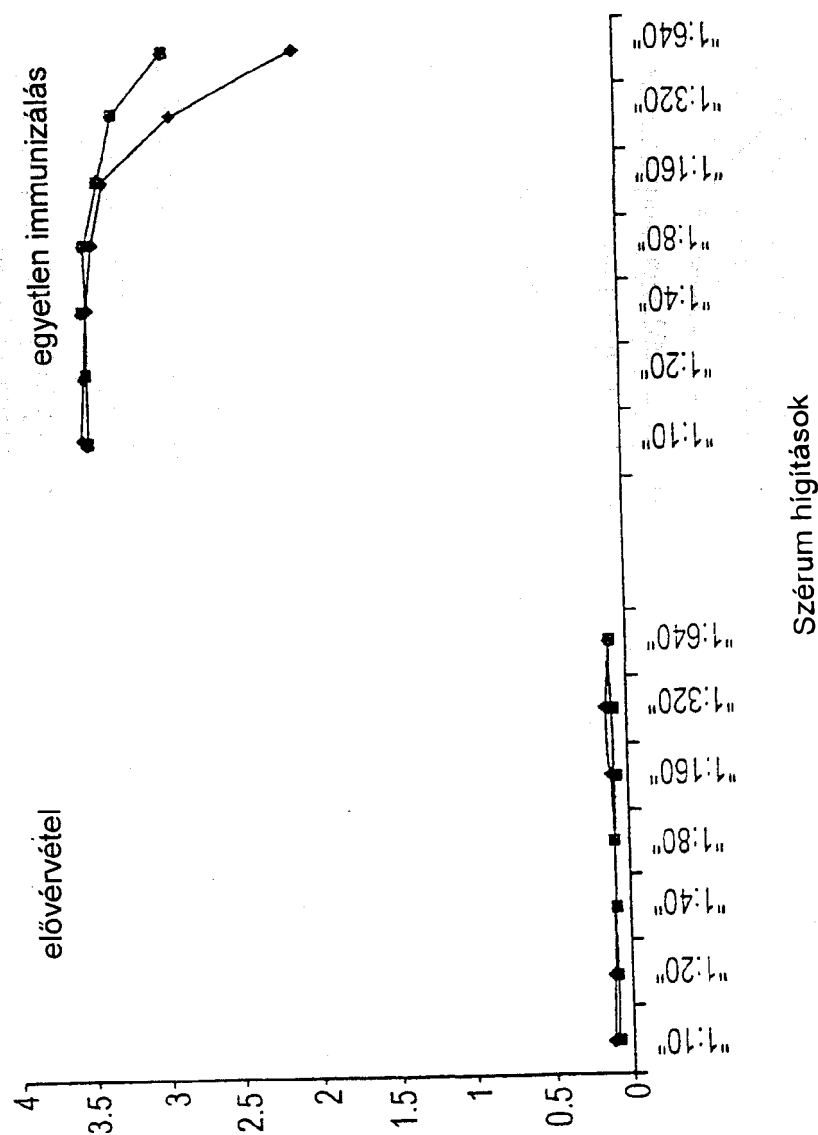


24. ábra



77

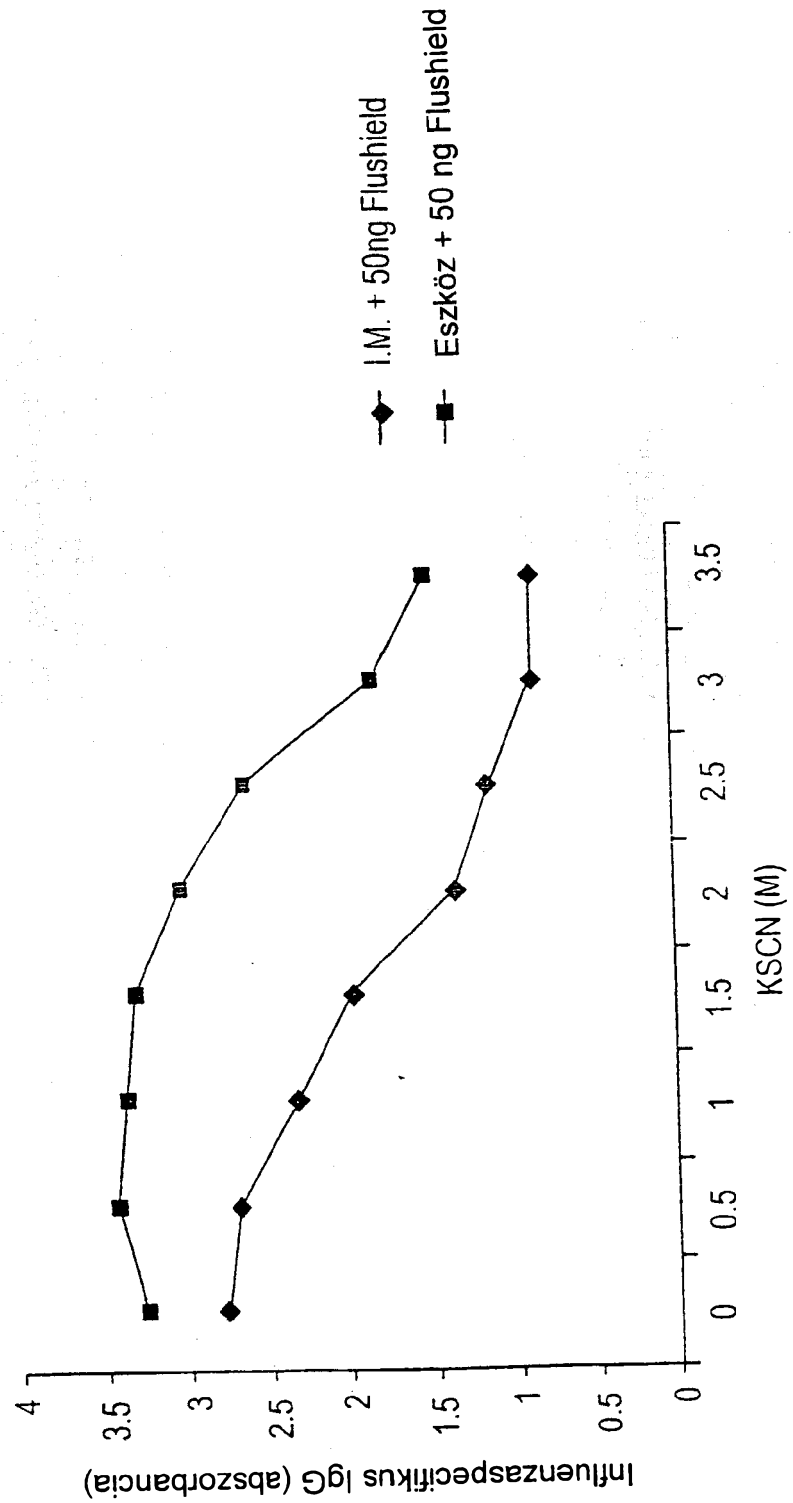
Infl. specifikus össz. humán IgG abszorbania (O.D.)



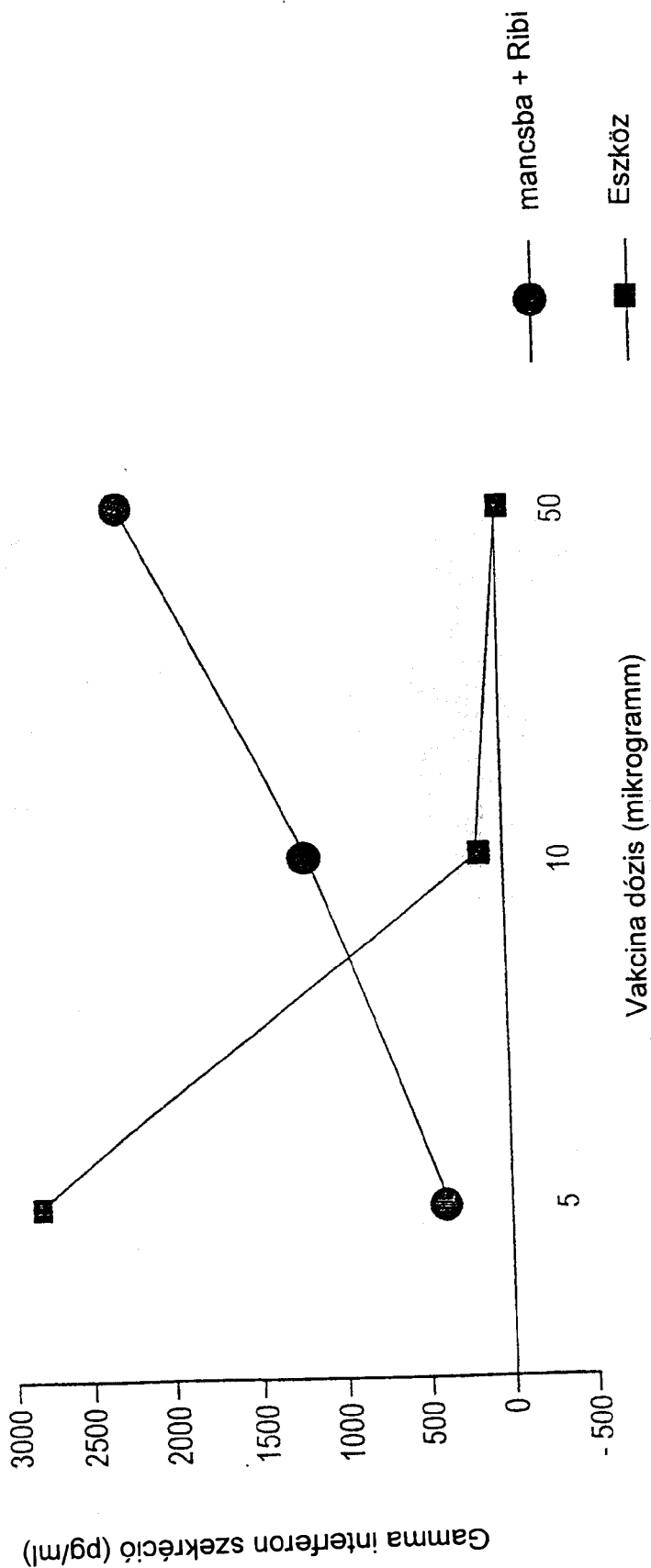
- = Eszköz + 50 ng Flushield
- ◆ = I.M. + 50 ng Flushield

25. ábra

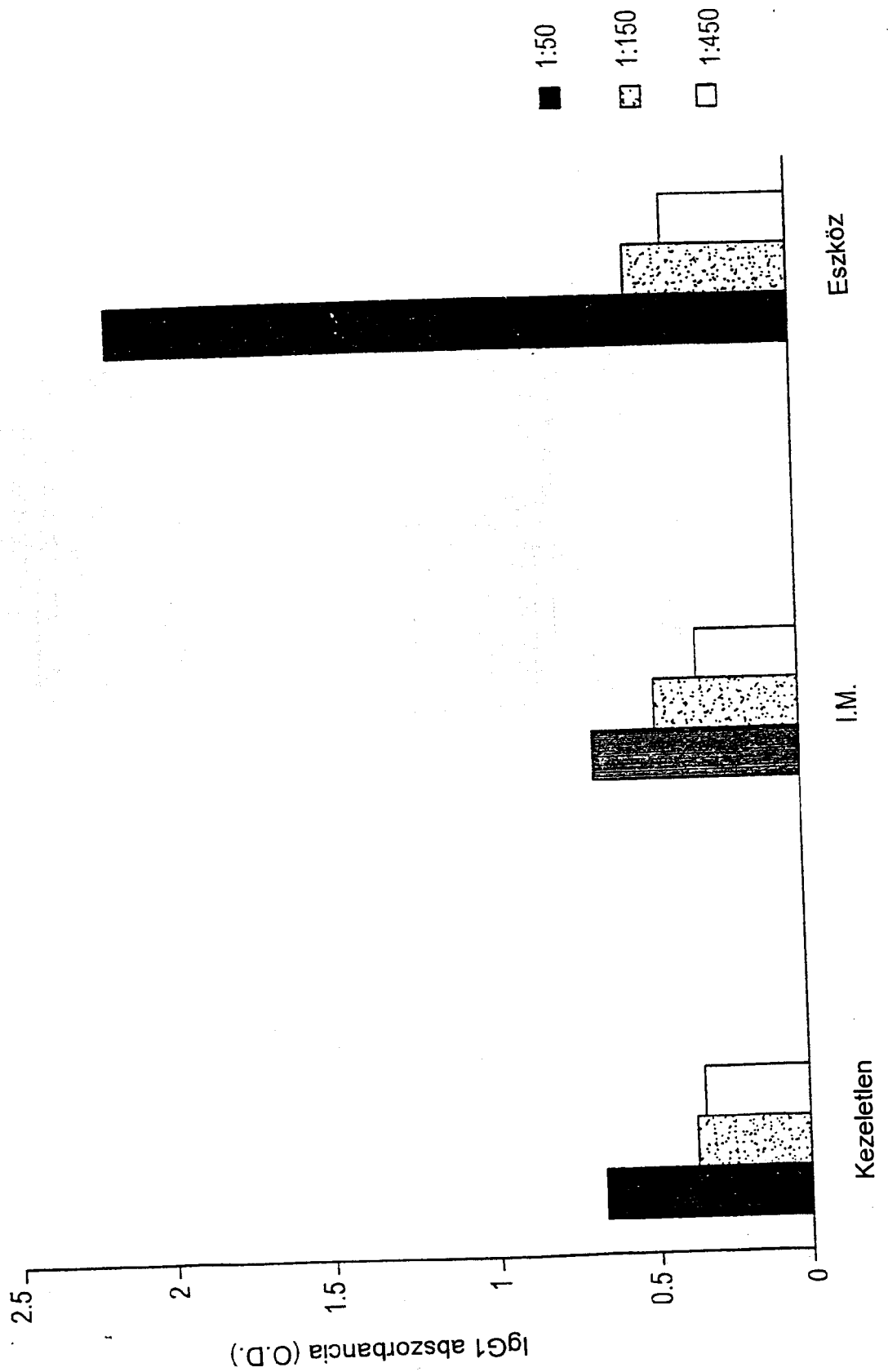
26. ábra



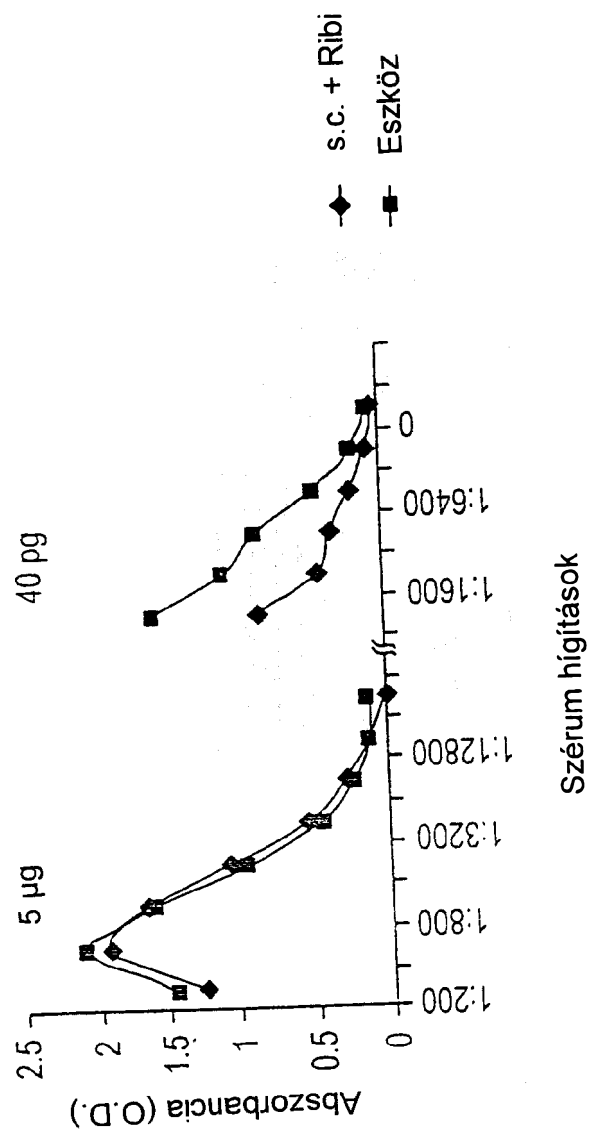
27. ábra



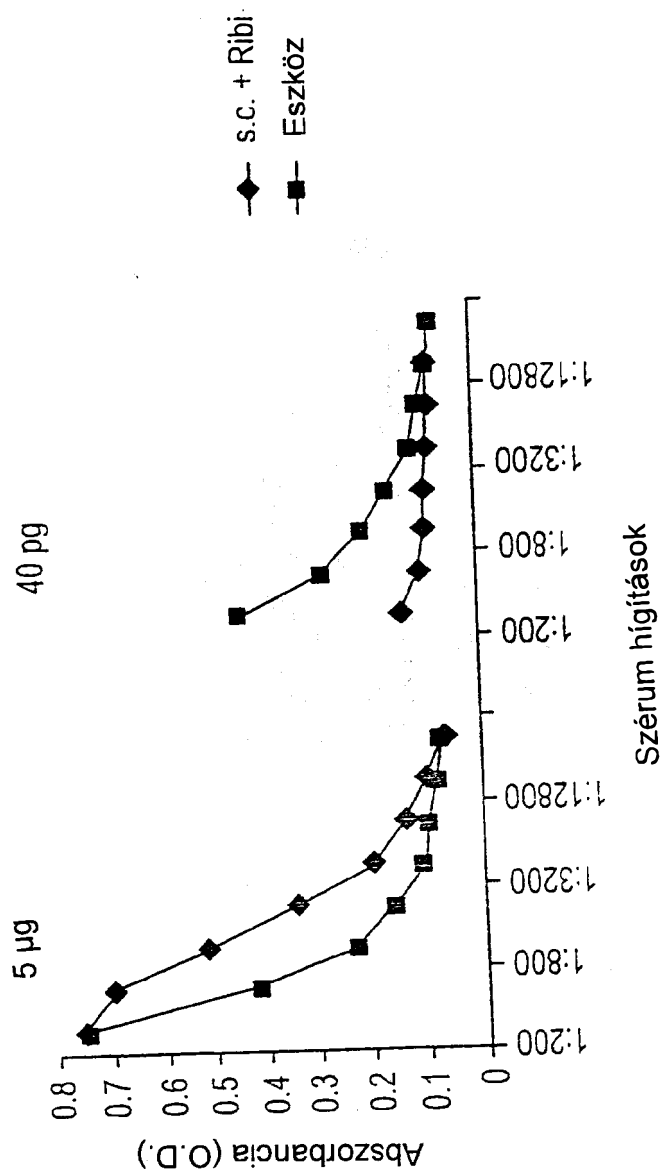
28. ábra



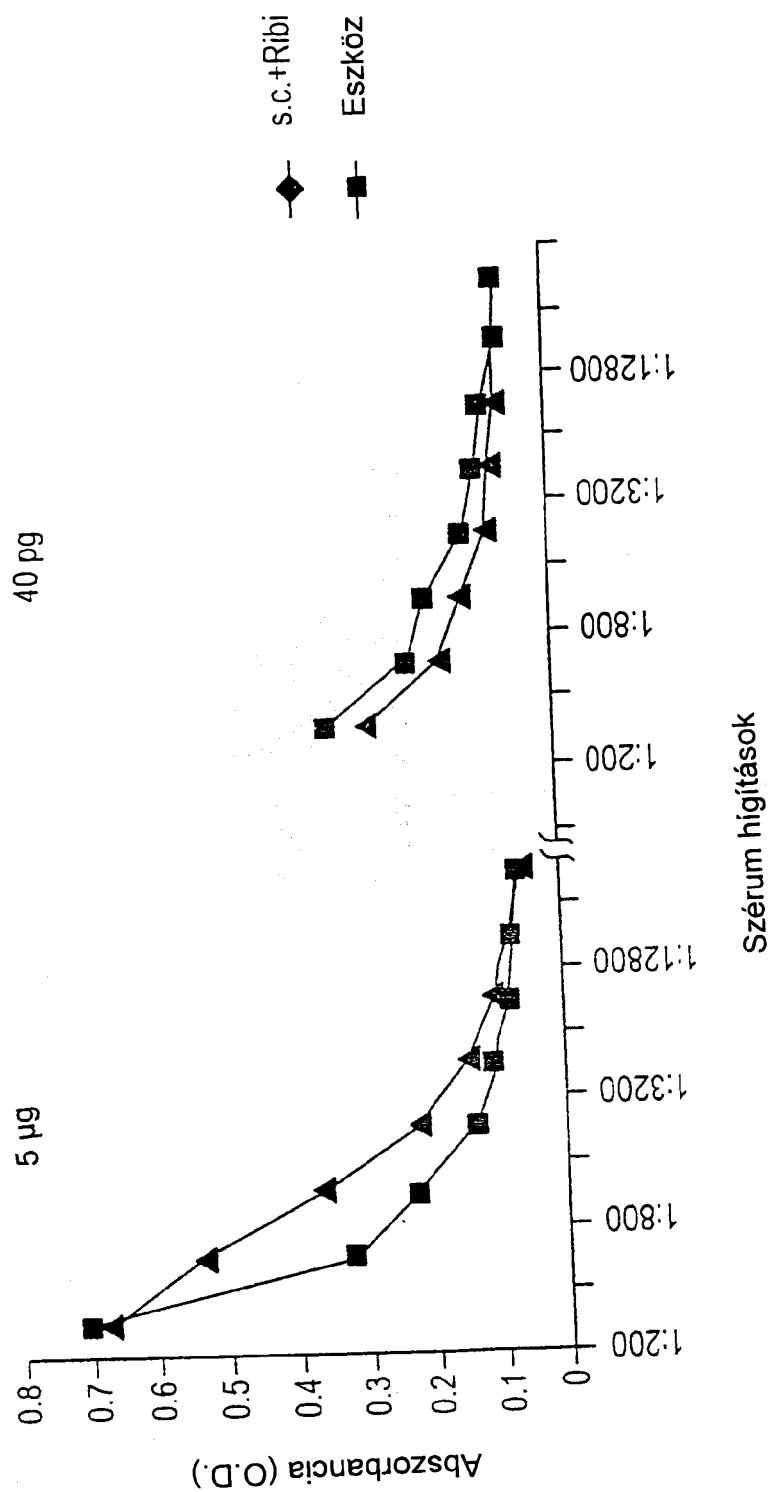
29. ábra



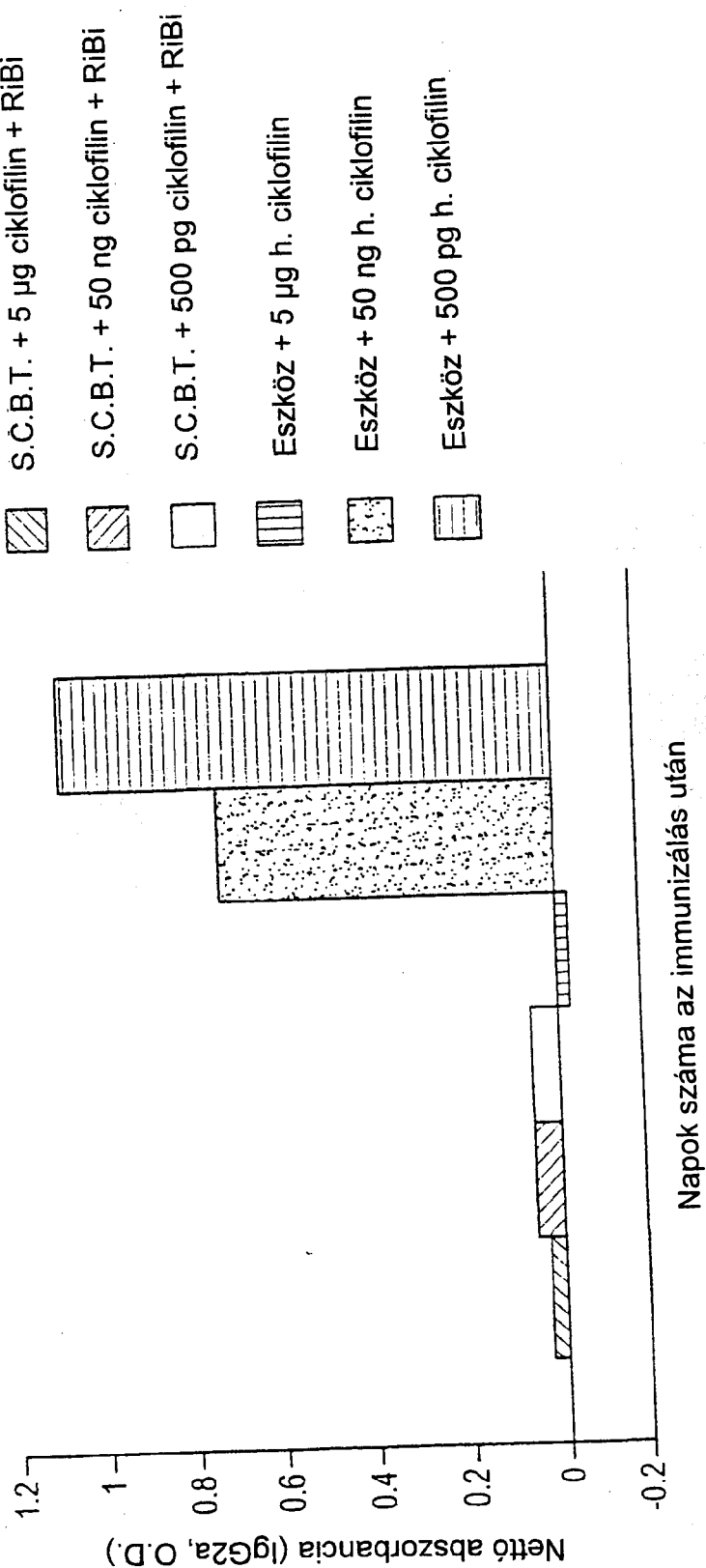
30. ábra



31. ábra



32. ábra



33. ábra

