



HU000229805B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 805**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 02260**(22) A bejelentés napja: **2001. 11. 29.**(40) A közzététel napja: **2005. 02. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2014. 07. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/87** (2006.01)**A61K 31/00** (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)**A61K 48/00** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/GB 01/05299

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0244396

(30) Elsőbbségi adatok:

0029134.4 2000. 11. 29. **GB****0029404.1** 2000. 12. 01. **GB****0114695.0** 2001. 06. 15. **GB**

(73) Jogosult(ak):

PCI Biotech AS, Oslo (NO)

(72) Feltaláló(k):

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

(74) Képviselő:

**dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**(54) **Citoszolba irányuló molekula-bevitelre szolgáló fotokémiai internalizáció és eljárás**

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás molekulák bevitelére sejtek citoszoljába, amely eljárásban a sejtet fotoszenzitiváló ágenssel érintkeztetik, a sejtet a fotoszenzitiváló ágens aktiválására alkalmas hullámhosszú fénnel sugározzák be és — lényegében ugyanekkor vagy a besugárzás után — a sejtet, előnyösen, rákkezelési, génterápiás és vakcinaként történő alkalmazás céljából a bevinni kívánt molekulával érintkeztetik.

CITOSZOLBA IRÁNYULÓ MOLEKULA-BEVITELRE SZOLGÁLÓ FOTOKÉMIAI INTERNALIZÁCIÓ ÉS ELJÁRÁS

A találmány tárgya eljárás molekulák bevitelére sejtek citoszoljába, amely eljárásban a sejtet fotoszenzitiváló ágenssel érintkeztetjük, a sejtet a fotoszenzitiváló ágens aktiválására alkalmas hullámhosszú fényvel sugározzuk be és – lényegében ugyanekkor vagy a besugárzás után – a sejtet, előnyösen, rákkezelési, génterápiás és vakcinaként történő alkalmazás céljából a bevinni kívánt molekulával érintkeztetjük.

Citoszolba irányuló molekula-bevitelre szolgáló fotokémiai internalizáció és eljárás

A találmány tárgya sejtek citoszoljába történő molekula-bevitelre szolgáló, tökéletesített eljárás, amely során fotoszenzitiváló ágens alkalmazunk, és a sejteket a fotoszenzitiváló ágens aktiválására alkalmas hullámhosszú fényvel sugározzuk be.

A legtöbb molekula nem képes könnyen áthatolni a sejtmembránokon. Egyes molekuláknak a citoszolba történő bevitelére szolgáló eljárások a technikában már ismertek és ezeket biológiai folyamatok manipulálására és tanulmányozására alkalmas eszközként tartják számon. A leginkább elterjedt eljárások a mikroinjektálás, vörösvértest „szellem” által közvetített fúzió és liposzómáfúzió, pinoszómák ozmotikus lizise, karcolásos bevétel, elektroporáció, kalciumfoszfát- és vírus által közvetített transzfekció. Ezen eljárások bár alkalmasak tenyésztett sejtek manipulálására, de sok esetben nem praktikusak, időigényesek, nem hatékonyak vagy jelentős mértékű sejtpusztulást okoznak. Így ezen eljárások alkalmazása sem a biológiai vagy orvosi kutatásban, sem pedig az olyan terápiában, ahol a sejteknek életben kell maradniuk és/vagy funkcionálniuk kell, a nem tekinthető optimálisnak.

Jól ismert, hogy a porfirinek és számos más fotoszenzitiváló vegyület sejteken és szöveteken citotoxikus hatásokat indukálhatnak. E hatások azon alapulnak, hogy fény hatására a fotoszenzitiváló vegyületek toxikussá válhatnak vagy toxikus anyagokat – például atomos oxigént vagy más oxidáló ágenseket – szabadíthatnak fel, amelyek a sejt anyagát vagy biomolekulákat – így sejtmembránokat és sejtstruktúrákat – károsítják, és ilyen sejt- vagy membránkárosodás végső fokon a sejtet elpusztítja. E hatásokat már alkalmazták különféle abnormalitások vagy elváltozások, így különösen a neoplasztikus betegségek kezelésében. E fotodinamikus terápia (PDT) néven ismert kezelésben fotoszenzitiváló (foto-kemoterápiás) ágens adunk be a test megtámadott területébe, majd azt a fotoszenzitiváló ágens aktiválása és citotoxikus formává alakítása céljából, fotoaktiváló fénynek tesszük ki, ennek következtében a megtámadott sejteket elpusztulnak vagy proliferatív potenciáljuk mérséklődik. A fotoszenzitiváló ágensekről ismert, hogy előnyösen és szelektíven lokalizálódnak a kívánt célhelyen, például tumoron vagy más lézió.

A fotoszenzitiváló ágensek különféle csoportjai ismertek, például a psoralének, a porfirinek, a klórvegyületek és a ftalocianin. Az ilyen drogok fény hatására toxikussá válnak.

A fotoszenzitiváló drogok különféle, közvetlen vagy közvetett mechanizmusok útján fejthetik ki hatásukat. Így például, bizonyos fotoszenzitiváló fényvel történt aktiválás esetén közvetlenül toxikussá válnak, míg mások toxikus csoportok, például a sejt anyagaira és biomolekulákra – például lipidek, fehérjék és nukleinsavak – extrém módon roncsoló hatású oxidáló ágensek, mint például atomos oxigén vagy más oxigén eredetű szabad gyökök, generálásával.

A porfirin típusú fotoszenzitiváló, toxikus oxigénfélék képzésével közvetlenül hatnak, és PDT céljából különösen előnyös jelöltként vannak számontartva. A porfirinek a hem szintézisében előforduló természetes

prekurzorok. Konkrétan, hem akkor termelődik, ha protoporfirin IX-be (PpIX), a ferrokelatáz enzim működése következtében vas (Fe^{3+}) épül be. Míg a PpIX különösen hatékony fotoszenzitizer, a hem-nek nincs fotoszenzitizer hatása. A technikában különféle, az irodalomban is leírt, porfirinon alapuló vagy porfirinnal kapcsolatos fotoszenzitizerok ismertek.

5 A PDT-ben alkalmazott legtöbb szenzitizer citotoxikus hatása főként az fotoszenzitizer fényrel történő expozíciója során keletkező atomos oxigén révén valósul meg. E reaktív intermediér életideje a sejtben igen rövid ($<0,04 \mu\text{s}$). Így, a PDT elsődleges citotoxikus hatását a fényexpozíció során és az $^1\text{O}_2$ képződésének helyein váltja ki. Az $^1\text{O}_2$ fehérjékkel (hisztidin, triptofán, metionin, cisztein tirozin), DNS-sel (guanin), telítetlen zsírsavakkal és koleszterol reagál és oxidálja azokat. A PDT egyik előnye az, hogy fénynek nem kitett szövetekre
10 feltehetően nincs hatással, azaz szelektív PDT-hatást érhető el. Nagymennyiségű dokumentáció foglalkozik a PDT alkalmazásával nem kívánt sejtpopulációk – például neoplasztikus sejtek – roncsolásában. A szabadalmi hivatkozásokban számos fotodinamikus vegyületet – önmagában, vagy célba irányító ágensekkel együtt (például, neoplasztikus sejtek receptordeterminánsai elleni immunglobulinok a komplex sejt-specifikusságát javítják) – leírására került sor. Bizonyos fotokémiai vegyületek, például hematoporfirin-származékok, velejáró képessége,
15 hogy daganatsejtekben lokalizálódnak. Ilyen eljárásokat és vegyületeket írtak le a 173319 sz. norvégiai szabadalmi iratban és a 900731 sz., 176645 sz., 176847 sz., 180742 sz., 176786 sz., 301981 sz., 300499 sz., és 891491 sz. norvégiai szabadalmi bejelentésekben. Az ilyen PDT eljárások, a sejtsztruktúráknak a sejt pusztulását eredményező roncsolásától függenek.

A WO93/14142 sz. nemzetközi közzétételi iratban olyan drogbeviteli rendszert írtak le, amely kopolimer
20 hordozókhoz kapcsolt rákellenes ágens és fényrel aktiválható ágens (azaz fotoszenzitizert) tartalmaz. Beadás esetén, a komplex pinocitózissal vagy fagocitózissal bejut a sejtbe és ott az endoszómákban és lizoszómákban lokalizálódik. A lizoszómákban az antineoplasztikus ágens és a polimer közötti kötés hidrolizálódik és az ágens passzívan átdiffundált a lizoszóma membránján a citoszolba. Ezen eljárás alkalmazhatósága így csak kismolekulájú, a lizoszóma membránjain átdiffundálni képes vegyületekre korlátozódik. A diffúzióra szánt idő eltelte
25 után, megfelelő hullámhosszúságú és energiájú fényforrást alkalmaznak a fényrel aktiválható vegyület aktiválására. A rákellenes ágens és a fényrel aktiválható vegyület kombinált hatása a sejtet elpusztítja. A fentiekben leírt ilyen PDT eljárások, így, bizonyos sejtsztruktúrák, sejtpusztuláshoz vezető roncsolására irányulnak.

Másfelől, a WO 96/07432 sz. és WO 00/54802 sz. nemzetközi közzétételi iratok olyan eljárásokkal foglalkoznak, amelyekben a fotodinamikus hatást, a máskülönben a membránon áthaladni nem képes, molekuláknak a sejt citoszoljába történő bevitelére alkalmazzák, mégpedig oly módon, hogy a bevitel ne eredményezzen
30 szükségeszerűen széleskörű sejtroncsolást vagy sejthalált. Ezen eljárásokban, az internalizálni kívánt molekulát és valamilyen fotoszenzitizer vegyületet szimultán vagy egymás után a sejten alkalmazzák, melynek következtében a fotoszenzitizer vegyület és a molekula endocitózissal vagy valamilyen más úton az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal körülvett kompartmentumokba transzlokálódik.

35 A sejten együtt vagy egymást követően alkalmazott, a sejtek intracelluláris kompartmentumába transzlokálni kívánt molekulát és a fotoszenzitizer vegyületet a sejt együtt, ugyanabba az intracelluláris kompartmentumba veszi fel (azaz ko-transzlokáció történik). A sejten belül internalizálni kívánt molekula a sejtben úgy szabadul fel, hogy megfelelő hullámhosszúságú fénybesugárzás hatására aktiválódó a fotoszenzitizer vegyület az intracelluláris kompartmentum membránjainak roncsolását eredményezi, és ezt követően,
40 a fotoszenzitizer vegyülettel azonos kompartmentumban lokalizálódott, internalizálni kívánt molekula

felszabadul a citoszolba. Ezen eljárást „fotokémiai internalizációnak” vagy PCI-nek nevezik. Így, ezen eljárások utolsó lépésében a sejteket fényhatásnak tesszük ki, melynek eredményeként a kérdéses molekula felszabadul abból a kompartmentumból, amelyben a fotoszenzitizedó vegyület is egyidejűleg jelen volt, és kikerül a citoszolba.

5 Úgy gondoltuk, hogy ezen eljárás hatékonnyá tételére lényeges, hogy a besugárzás kivitelezésekor a fotoszenzitizedó vegyület és a citoszolba felszabadítani kívánt molekula ugyanabban az intracelluláris kompartmentumban legyen jelen.

10 Meglepetésünkre úgy találtuk, hogy bár a molekulák hasonló PCI eljárásokkal ugyan bevíhetők a sejtek citoszoljába, de a fénnel történő besugárzás nem feltétlenül a végső lépés és az eljárások nem függenek attól, hogy a fényexpozíció idején a transzferálni kívánt molekula és fotoszenzitizedó ágens ugyanabban az intracelluláris kompartmentumban legyen jelen. Ilyen eljárásokban, a fotoszenzitizedó ágens érintkezíthetjük a sejtekkel és aktiválhatjuk még az internalizálni kívánt molekulának az érintkezített sejt citoszoljába történő bevitelét előtt. Így annak ellenére, hogy az internalizálni kívánt molekulának és a fotoszenzitizedó ágensnek nem feltétlenül jelen kell lennie ugyanazon intracelluláris kompartmentumban a fénybesugárzás idején, a molekula
15 belép a sejtbe és a citoszolba szállítódik. Ezen eredmények rendkívül meglepők és az ilyen eljárások jelentős előnyöket biztosítanak az olyan eljárásokkal szemben, amelyekben a fénybesugárzás az utolsó lépés.

 Éppen ezért általában, a találmány tárgya *in vitro* vagy *ex vivo* eljárás molekula bevitelére a sejt citoszoljába, amelyben a sejtet fotoszenzitizedó ágenssel érintkezíthetjük, a sejtet a beviteli kívánt molekulával érintkezíthetjük, és a sejtet olyan hullámhosszúságú fénnel sugározzuk be, amely a fotoszenzitizedó ágens aktiválása szempontjából hatékony, ahol a besugárzást a sejtnek a transzfermolekulával történő érintkezítése előtt vagy azzal egyidőben végezzük, ahol a transzfermolekula nem könnyen hatol át sejtmembránokon, és/vagy ahol a fotoszenzitizedó ágens vagy a transzfermolekula, vagy mindkettő egy vagy több hordozómolekulához, célbajuttató molekulához vagy vektorhoz van kapcsolva, asszociálva vagy konjugálva.

25 A találmány előnyös megvalósítási módjában a besugárzást az internalizálni kívánt molekula felvétele előtt végezzük.

 A leírás szerinti értelemben, az „internalizáció” kifejezés a molekulák a citoszolba szállítását jelenti. A jelen esetben az „internalizáció” kifejezésbe tartozik a molekulák felszabadítása az intracelluláris/membrán kötött kompartmentumokból a sejtek citoszoljába.

30 A leírás szerinti értelemben, a „sejt általi felvétel” vagy „transzlokáció” kifejezés az internalizáció egyik lépését jelenti, amely során a sejtmembránhoz képest külsőnek tekinthető molekulák vagy entitások a sejtbe bekerülnek oly módon, hogy azok, például endocitózissal vagy más megfelelő felvevő mechanizmussal (például, intracelluláris membránra korlátozódó kompartmentumba – például endoplazmatikus retikulum, Golgi-testek, lizoszómák, endoszómák, stb. - vagy azzal asszociált állapot jutnak) a sejtmembrán külső rétegéhez képest belső helyzetbe kerülnek.

35 Így a találmány tárgya *in vitro* vagy *ex vivo* eljárás molekulának sejt citoszoljába történő bejuttatására, a fent leírtak szerint, ahol a sejtet a transzfermolekulával a besugárzás után vagy azzal egyidőben érintkezíthetjük.

40 Amint alább kifejtjük, az eljárást alkalmazhatjuk *in vivo* és ebből a szempontból a találmány tárgya a leírásban meghatározott transzfermolekula és fotoszenzitizedó ágens alkalmazása betegség, rendellenesség vagy fertőzés, kezelésére vagy megelőzésére, előnyösen génterápiára, immunválasz stimulálására vagy rák kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a fotoszenzitizedó ágens és külön a transzfermolekula

érintkeztetendő a páciens sejteivel vagy szöveteivel, és a sejtek besugárzandók a fotoszenzitizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel, és a besugárzás a sejtnak a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végzendő, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

A találmány tárgyát képezi továbbá a leírás szerint meghatározott transzfermolekula alkalmazása betegség, rendellenesség vagy fertőzés, kezelésére vagy megelőzésére, előnyösen génterápiára, immunválasz stimulálására vagy rák kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a betegség, rendellenesség vagy fertőzés a páciens sejteinek vagy szöveteinek a gyógyszerrel kezelendő és külön az itt ismertetett fotoszenzitizáló ágens érintkeztetendő a páciens sejteivel vagy szöveteivel, és a sejtek besugárzandók a fotoszenzitizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

A találmány tárgyát képezi továbbá transzfermolekulát és külön fotoszenzitizáló ágenszt tartalmazó készítmény, amint a leírásban ismertetjük, mint kombinált készítmény, különálló és sorozatos alkalmazásra, amint fent ismertetjük. Egy további szempont szerint a találmány tárgyát képezi a leírásban meghatározott transzfermolekula a fent ismertetett alkalmazásra.

Előnyös, ha a sejteket a besugárzás után vagy azzal egyidőben érintkeztetjük a bevinni vagy internalizálni kívánt molekulával (a továbbiakban transzfermolekulával), vagy más szavakkal, a sejtek – fotoszenzitizáló ágenssel történő érintkeztetésével, majd besugárzásával végzett - fotokémiai kezelését azelőtt végezzük, mielőtt a transzfermolekulákat a sejtekhez adnánk. A találmány e megvalósítási módjában, a citoszolba bevinni kívánt molekulákat, fotokémiai úton már kezelt sejtekkel, a kezelést követő bármely időpontban érintkeztethetjük, ha gondoskodunk arról, hogy a sejt a transzfermolekulákat még mindig képes legyen felvenni. Az az időtartam, ami alatt a molekulákat a sejtekkel érintkeztethetjük és a sejtek még képesek a kérdéses molekulákat felvenni, különféle faktoroktól, például a sejt típusától, a kérdéses konkrét molekulától, az alkalmazott konkrét fotoszenzitizáló ágensztől, és a fénnel való kezelés időtartamától, függhet. Ezen időtartamot, ha szükséges, adott feltételek esetén meg lehet határozni. Azonban előnyös, ha a citoszolba transzferálni kívánt molekulát, a fotokémiai kezelés után viszonylag rövid időn belül, például 24 órán belül, előnyösebben a fotokémiai kezelést követő első 10 órán belül, például az első 5 órán belül, vagy még előnyösebben az első órában, érintkeztetjük a sejtekkel. Például *in vivo* vagy *ex vivo*, a transzfermolekulát egy adott időtartam alatt, például 30 perc és 24 óra közötti időtartam alatt, előnyösen 1-2 óráig, alkalmazzuk, a besugárzás után azonnal vagy rövid időn belül kezdve, például, ha a besugárzási idő végét tekintjük kiindulási pontnak, akkor a transzfermolekulát 0 perc és 24 óra közötti időben, például 0-4 óránál alkalmazhatjuk.

Megfigyeltük, hogy ha a transzfermolekulát, tetemes idővel a besugárzás után érintkeztetjük a sejtrel, még mindig lehetséges a sejtbe történő internalizáció. Így például, a transzfermolekulát alkalmazhatjuk a besugárzás után több mint egy órával, például több mint 2, 4, 8, 10, vagy akár 12 órával a besugárzás után.

Így, a találmány előnyös megvalósítási módjában, a sejteket a transzfermolekulával a besugárzás után 0-4 órával, egy, két vagy három órán át, vagy annál hosszabb ideig, például legalább 0,5-3 órán át érintkeztetjük a sejtrel. A transzfermolekula beadásának időpontja változhat annak függvényében, hogy az eljárást *in vitro* vagy *in vivo* végezzük. Az *in vitro* eljárásokban, a transzfermolekulákat általában egyidőben érintkeztetjük az összes célsejtrel, azaz alkalmazás időpontja egybeesik az érintkeztetés időpontjával, például ha a sejteket *in vitro* tenyésztetben szaporítjuk, viszonylag könnyű a molekulákat érintkezésbe hozni a sejtekkel egy adott időpontban. Azonban, *in vivo* eljárásoknál, a célsejtek és a transzfermolekulák egymással történő érintkeztetése egyértelmű.

en sokkal bonyolultabb és függ a beadás módjától és a célsejtek elhelyezkedésétől. Például, ha a transzfermolekulát közvetlenül a célsejtekbe tudjuk juttatni, például helyi injekcióval, a transzfermolekulák viszonylag gyorsan érintkezésbe hozhatók a célsejtekkel (vagy legalábbis azok egy részével), például a beadás után percekkel vagy néhány órával. Másfelől, ha a transzfermolekulákat intravénás injekcióként valamilyen távoli célra alkalmazunk, e molekuláknak tovább tart elérni azt a helyet, ahol érintkezésbe léphetnek a célsejtekkel. Például, a beadás után 24-96 óra is eltelhet, amíg eléri a célsejteket. Ezen „utazási időt” is számításba kell venni akkor, amikor döntünk abban, hogy a fotoszenzitiváló ágens beadásának és a besugárzás időpontjához képest mikor adjuk be a transzfermolekulákat.

A találmány alternatív megvalósítási módjában ahelyett, hogy a transzfermolekulát a besugárzás után érintkeztetnénk a sejttel, érintkeztethetjük a sejttel lényegében a besugárzással egyidőben. Ahogyan a fentiekben említettük, a fenti hatások eléréséhez a transzfermolekula és a fotoszenzitiváló ágens hozzáadásának, és a besugárzás pontos időzítése mellett, különféle más faktorokat – ideértve a kezelni kívánt sejteket, az alkalmazott ágenseket és molekulákat, illetve a sejteket körülvevő környezetet, különösen, ha in vivo vagy in vitro rendszerekről beszélünk – számításba kell venni. Ezek figyelembevételével a megfelelő időzítés könnyen meghatározható.

A fotokémiai internalizáció korábban ismertetett eljárásai, amelyekben a transzfermolekulát és a fotoszenzitiváló ágens-t a besugárzás előtt adják a sejtekhez, attól függenek, hogy a kérdéses molekulák ugyanazon az intracelluláris kompartmentumban vannak-e a fényexpozíciót megelőzően, ezáltal e kompartmentumoknak a fotoszenzitiváló ágens, fénnel történt aktiválására bekövetkező lízise a molekula és a fotoszenzitiváló ágens citoszolba jutását eredményezi-e. Ennek vázlatos rajzát a 7. ábrán mutatjuk be.

Az eljárásban egyértelmű, hogy a fotoszenzitiváló ágens és a citoszolba bevinni kívánt transzfermolekula nem ugyanazon intracelluláris kompartmentumban van a fényexpozíció idején, mivel a besugárzást a transzfermolekula sejt általi felvétele előtt hajtjuk végre.

Az eljárás működési mechanizmusát még nem ismerjük, és annak ellenére, hogy az eljárás működik, az egész meglepő. Anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötődnénk, e meglepő felfedezés oka az lehet, hogy fotokémiai károsodott vezikulumok és újonnan formálódott vezikulumok fuzionálnak, amelyet azután az újonnan bekebelezett molekulák citoszolba való felszabadulása követ. Ennek vázlatos rajzát a 7. ábrán mutatjuk be. Esetleg, lizoszómális enzimeket vagy lizoszómális enzimeket tartalmazó vezikulumokat, például késői endoszómákat, ért fotokémiai károsodás lecsökkentheti az internalizálni kívánt molekulák intracelluláris degradációjának mértékét. Ez feltehetően annak köszönhető, hogy lizoszómális enzimeket tartalmazó vezikulumokba irányuló transzport lecsökken, vagy endolitikus vezikulumok hidrolitikus aktivitása lecsökken. Ily módon, e molekuláknak több idejük marad megszökni az endocitózisos kompartmentalizációtól, mint amikor a lizoszómális lebontó útvonal aktív. További alternatív magyarázat lehet az is, hogy a sejtek fotokémiai kezelése a sejtek plazmamembránjának kismértékű károsításához vezet, melynek eredményeként a makromolekuláknak a sejtmembránon át történő penetrációja fokozódik. Bár végeztünk erre irányuló kísérleteket (lásd 7. példa), az eredmények szerint feltehetőleg nem ez lehet az ok.

A találmány tárgyát bármely molekulának az élő sejt citoszoljába történő in vitro (azaz tenyészetben) vagy in vivo transzportálására vagy transzfektálására szolgáló eljárások képezik, amelyek eredményeként a molekula a citoszolban elérhető lesz.

Ilyen eljárásokat alkalmazhatunk molekuláknak (vagy azok részei vagy fragmentumai) a sejt belsejébe történő transzferén kívül, bizonyos körülmények között, a molekulák sejtfelszíni bemutatására vagy expresszáására. Így, a találmány szerinti eljárások szerint, a transzfermolekula transzportja és a sejt citoszoljába való felszabadulása után, ha a kérdéses sejt(ek) specializált sejt(ek) - mint például antigént bemutató sejt - a molekula vagy fragmentum a sejt felszínére transzportálódhat, ahol a sejten kívül, például a sejt felszínén, bemutatásra kerülhet. Az ilyen eljárások előnyösen alkalmazhatók a vakcinálás terén, ahol vakcinakomponenseket, azaz antigéneket vagy immunogéneket, a sejt felszínén történő bemutatásra abból a célból visszük be a sejtbe, hogy immunválaszt váltsunk ki vagy fokozzunk. A sejt felszínére történő expresszió alkalmazhatóságának további részletei a WO 00/54802 sz. nemzetközi közzétételi iratban vannak leírva.

A találmány szerinti eljárásokkal a sejt citoszoljába bevihető transzfermolekulák közé tartoznak a sejtmembránon nem könnyen áthatoló molekulák is. Ezenfelül, a találmány képes az olyan molekulák citoszolba történő bevitelét és aktivitását fokozni, amelyek csak részben képesek a sejtmembránba vagy az intracelluláris vezikulumok membránjába behatolni. Transzfermolekulák lehetnek szerves vegyületek, fehérjék vagy fehérje-fragmentumok, például peptidok, antitestek vagy antigének vagy azok fragmentumai. A transzfermolekulák, találmány szerinti alkalmazásra szolgáló másik osztályát a citotoxikus vegyületek, például bleomicin, alkotják. Az alkalmas transzfermolekulák további osztályát a nukleinsavak képezik.

Nukleinsavakat alkalmazhatunk, például, terápiás fehérjéket, antiszensz RNS-molekulákat, ribozimeket, RNS-aptamereket, vagy triplexet kialakító oligonukleotidokat kódoló gének formájában. Esetleg, a nukleinsavak alkalmazhatók nem kódoló molekulák - például, szintetikus antiszensz DNS- vagy RNS-molekulák, ribozimek, aptamerek, triplexet kialakító oligonukleotidok, peptid-nukleinsavak (PNA-k), transzkripciósfaktori „csapdába ejtő” DNS vagy kimérikus oligonukleotidok - formájában valamilyen specifikus mutáció kijavítására a páciensben. Ahol lehetséges, a nukleinsav-molekulák lehetnek komplett gének, vagy nukleinsav-fragmentumok formájában, adott esetben vektormolekulába vagy -entitásba (például plazmidvektor, vírusrészeszke vagy bakteriofág) beépítve. Az utóbbi forma különösen alkalmazható, ha a transzfermolekulát a génterápiás eljárásokban alkalmazzuk.

A találmány szerint alkalmazásra kerülő fotoszenzitiváló ágens kényelmesen lehet bármilyen olyan ágens, amely intracelluláris kompartmentumokba, előnyösen endoszómákba vagy lizoszómákba lokalizálódik. A technikában különféle ilyen fotoszenzitiváló ágensnek ismertek, és ezek az irodalomban le vannak írva [például, WO96/07432 sz. nemzetközi közzétételi irat]. Ebben a vonatkozásban a di- és tetraszulfonált alumínium-ftalocianin (például, AlPcS_2), szulfonált tetrafenilporfirinek (TPPS_n), niluskék, e^6 klórszármazékok, uroporfirin I, filloeritrin, hematoporfirin, és metilénkék ágenseket említenénk, amelyekről kimutatták, hogy tenyésztett sejtek endoszómáiban és lizoszómáiban lokalizálódnak. E lokalizáció a legtöbb esetben endocitotikus aktivitás eredménye. Így, a fotoszenzitiváló ágens előnyösen olyan ágens, amelynek felvétele a lizoszómák vagy endoszómák belső kompartmentumába történik. Azonban, egyéb, más intracelluláris kompartmentumokba, például endoplazmatikus retikulumba vagy Golgi-készülékbe, lokalizálódó fotoszenzitiváló ágens is alkalmazhatók. Az is elképzelhető, hogy a mechanizmus akkor is működik, ha a fotokémiai kezelés hatásai a sejt más komponenseit (azaz, a membránra korlátozódó kompartmentumoktól eltérő komponensek) érik. Így például, az egyik lehetőség lehet az is, hogy a fotokémiai kezelés intracelluláris transzport vagy vezikulumfúzió szempontjából fontos molekulákat pusztít el. Ilyen molekulák nem feltétlenül a membránra korlátozódó kompartmentumokban helyezkednek el, de az ilyen molekulák fotokémiai károsodása mindamellett mégis a

transzfermolekulák internalizációjához vezet. Például, olyan mechanizmusok esetében, ahol az ilyen molekulákat ért fotokémiai hatás az internalizálni kívánt molekula (azaz a transzfermolekula), lebontó vezikulumokba, például lizoszómákba, irányuló transzportját lecsökkenti, így az internalizálni kívánt molekula még a degradálása előtt ki tud jutni a citoszolba. Ilyen, nem feltétlenül a membránra korlátozódó kompartmentumokban lévő molekulák például a mikrotubuláris transzportrendszer molekulái, például a dinein és dinaktin komponensei; például a rab5, rab7, N-etilmaleimidre szenzitív faktor (NSF), NSF-et kötő oldékony fehérje (SNAP), és így tovább.

Alkalmas fotoszenzitiváló ágensek osztályai közé az alábbiak tartoznak: porfirinek, psorelénok, ftalocianinok, purpurinok, klórvegyületek, benzoporfirinek, naftalocianidok, kationos festékek, tetraciklinek és lizomotróf gyenge bázisok vagy ezek származékai vagy prekursorai [Berg és mtsai., J. Photochem. Photobiol. 65, 403-409 (1997)]. Más alkalmas fotoszenzitiváló ágensek közé tartoznak texafirinek, feoforbidok, porficének, bakteriokloridok, ketokloridok, hematoporfirin-származék és annak származékai, endogén fotoszenzitiválókat indukálhatunk 5-aminolevulinsavval és annak származékaival, fotoszenzitiváló ágensek dimerei vagy fotoszenzitiváló ágensek közötti egyéb konjugátumok.

Előnyös, ha a fotoszenzitiváló szabad formában – azaz bármely más makromolekulához nem konjugáltan – van. Azonban, a fotoszenzitiváló esetleg lehet asszociálva, kapcsolva, vagy konjugálva hordozóhoz vagy más molekulához az alábbiakban leírtak szerint, például célbajuttató antitesthez vagy hordozóhoz, például polilizinhez, kapcsolva.

Előnyös fotoszenzitiváló ágensek közé tartozik a $TPPS_4$, $TPPS_{2a}$, $AlPcS_{2a}$ és más amfifil fotoszenzitiváló.

A találmány előnyös megvalósítási módjaiban, a találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amelyekben a fotoszenzitiváló ágensek az 5-aminolevulinsav vagy 5-aminolevulinsavak észterei vagy annak gyógyászati lag elfogadható sói.

Az ilyen észterekben az 5-aminocsoport lehet szubsztituált vagy nem szubsztituált, az utóbbi esetben ALA észterekről beszélünk.

Előnyösebben, a találmány szerinti alkalmazásban, az ALA észterek az 5-aminolevulinsavak észterei, amelyek adott esetben, alkanolokkal szubsztituáltak, azaz alkilészterek vagy szubsztituált alkilészterek.

Kényelmesen alkalmazható ALA észter az I. képlet szerinti vegyület



(ahol, R^1 lehet olyan alkilcsoport, amelyet - adott esetben - hidroxil-, alkoxil-, aciloxil-, alkoxikarboniloxil-, amino-, aril-, oxo- vagy fluorocsoportokkal szubsztituáltunk, és – adott esetben – megszakítottunk oxigén, nitrogén, kén vagy foszfortomokkal; és R^2 , amely R^1 -el azonos vagy attól eltérő lehet, lehet hidrogénatom vagy R^1 csoport) és annak sói.

A szubsztituált R^1 alkilcsoport lehet egyszeresen vagy többszörösen szubsztituált. Így, az alkalmas R^1 csoportok közé tartozik például nem szubsztituált alkil-, alkoxialkil-, hidroxialkoxialkil-, polihidroxialkil-, hidroxil-poli-alkilénokxialkil- és hasonló csoport. A leírás szerinti értelemben, az „acil” kifejezés magában foglal karboxilát- és karbonátcsoportokat, így az aciloxi-szubsztituált alkilcsoportok közé tartozik például alkil-karboniloxil-alkil csoport is. Ilyen csoportok esetén, bármely alkilcsoport szénatomtartalma előnyösen meg- egyezik az alkilcsoportok esetében az alábbiakban meghatározottakkal. Előnyös arilcsoportok közé tartozik

fenil- és monociklusos, 5-7 tagú heteroaromás-csoportok, különösen a fenilcsoport, és az ilyen csoportok adott esetben lehetnek szubsztituáltak.

Reprezentatív szubsztituált R^1 alkilcsoportok közé tartozik alkoximetil-, alkoxietil- és alkoxipropil-csoport, vagy aciloximetil-, aciloxietil-, és aciloxipropil-csoportok, például pivaloiloiloximetil.

5 A találmány szerinti fotoszenzitivizáló ágensként alkalmazható, előnyös ALA észterek közé tartoznak azok, amelyekben az R^1 csoport nem szubsztituált alkilcsoport és/vagy az R^2 csoport hidrogénatom.

A leírás szerinti értelemben, az „alkil” kifejezés jelent bármilyen hosszú vagy rövid láncú, egyenesláncú vagy elágazó alifás telített vagy telítetlen szénhidrogén-csoportot. A telítetlen alkilcsoport lehet egyszeresen vagy többszörösen telítetlen és magában foglalja az alkenil-, és alkinilcsoportokat egyaránt. Az ilyen csoportok
10 tartalmazhatnak akár 40 szénatomot is. Azonban, előnyösek az olyan alkilcsoportok, amelyek maximum 10, körülbelül 8, előnyösebben maximum 6, és különösen előnyösen maximum 4 szénatomot tartalmaznak.

Különös figyelmet érdemel az ALA-metilészter, ALA-etilészter, ALA-propilészter, ALA-heptilészter és ALA-oktilészter, és ezek sói, amelyeket a találmány szerinti alkalmazásban előnyös fotoszenzitivizáló ágenseknek tekintünk.

15 Szükséges, hogy a fotoszenzitivizáló ágenszt a besugárzás előtt érintkeztessük a sejttel. Azonban, a transzfermolekulával ellentétben, ezen ágenszt elégséges idővel a besugárzás előtt kel beadni ahhoz, hogy besugárzás-kor az ágenszt már felvegye valamilyen intracelluláris kompartmentum. Így, könnyen kijelenthetjük, hogy az ágenszt a besugárzás előtti 1-72 órával, például 4-72 órával, mint például 4-48 vagy 4-24 órával, adjuk be. Ismét, a fentiekben a transzfermolekulák sejtekkel való érintkeztetésénél tárgyaltak szerint, ahhoz, hogy a sejttel meg-
20 felelő érintkeztetést érjünk el, a fotoszenzitivizáló ágens beadásának, a besugárzás időpontjához viszonyított idő-pontja függ attól, hogy a fotoszenzitivizáló ágens mennyi idő alatt éri el a célsejteket, és hogy a célsejteknek mennyi időbe telik felvenni az ágenszt. Ez az időtartam változhat annak függvényében, hogy az eljárás in vivo vagy in vitro eljárás-e, és hogy a beadás közvetlenül a célszövetbe vagy attól távolabbi helyre történik. Minden esetben fontos, hogy a fotoszenzitivizáló ágenseket a sejtek már a besugárzás időpontját megelőzően felvegyék.
25 Az ágenszt a sejtekkel érintkeztetve tarthatjuk egészen a besugárzásig, például 1 vagy 4 vagy 72 órán át, előnyösen 4-24 órán át, például 12-20 órán át, vagy a sejteket eltávolíthatjuk az érintkeztetésből közvetlenül a besugárzást megelőzően, például több mint 5 perccel, például 10 perctől 8 óráig terjedő időtartammal, például 1 vagy 4 vagy 6 órával, úgy, hogy a sejteket az ágensztől mentes tápoldatba és/vagy a transzfermolekulát tartalmazó táp-
oldatba visszük át.

30 Adott esetben, a fotoszenzitivizáló ágens vagy a transzfermolekula, esetleg mindkettő, hozzákapcsolható, asszociáltatható vagy konjugáltatható egy vagy több hordozómolekulához, célbajuttató molekulához vagy célbajuttató vektorhoz, amelyek elősegíthetik vagy fokozhatják a fotoszenzitivizáló ágens vagy transzfermolekula felvételét, vagy célbairányíthatják vagy elszállíthatják ezen entitásokat egy adott sejttípushoz, szövethez vagy intracelluláris kompartmentumhoz. Hordozórendszerek például az alábbiak lehetnek: polilizin vagy
35 polikationok, különféle kationos lipidek, liposzómák, rekonstituált LDL-partikulumok, szterikusan stabilizált liposzómák vagy adenovírus-partikulumok. E hordozórendszerek általában képesek javítani a farmakokinetikát és fokozni tudják a fotoszenzitivizáló ágens felvételét a sejtekbe, és a fotoszenzitivizáló ágenszt azon intracelluláris kompartmentumba irányíthatják, ahol az ágens a fotokémiai internalizáció szempontjából különösen előnyös, de e rendszereknek általában nincs meg az a képességük, hogy a fotoszenzitivizáló ágenszt specifikus sejtekbe (példá-
40 ul rákos sejtekbe) vagy szövetekbe irányítsák. A transzfermolekula és/vagy a fotoszenzitivizáló ágens - meghatá-

rozott sejttípusokba vagy szövetekbe történő specifikus vagy szelektív célbajuttatásához - asszociáltatható vagy konjugáltatható olyan specifikus célbajuttató molekulákkal, amelyek elősegítik a transzfermolekula specifikus, sejt általi felvételét a kívánt sejtekbe vagy szövetekbe. Így, célbajuttató molekulákkal a transzfermolekulát és/vagy a fotoszenzitivizáló olyan intracelluláris kompartmentumokba irányíthatjuk, amely a fotokémiai internalizáció céljára különösen előnyös.

Különböző célbajuttató molekulákat alkalmazhatunk [lásd például, Curiel, *Ann. New York Acad. Sci.* **886**, 158-171 (1999); Bilbao és mtsai., *Gene Therapy of Cancer*, szerk.: Walden és mtsai., kiad.: Plenum Press, New York; Peng és Russel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 454-457 (1999); Wickham, *Gene Ther.* **7**, 110-114 (2000)].

A hordozó molekulát és/vagy a célbajuttató molekulát asszociáltathatjuk, hozzákötethetjük vagy konjugáltathatjuk a transzfermolekulával, a fotoszenzitivizáló ágenssel vagy mindkettővel. Ha például, hordozóként adenovírus-partikulumokat alkalmazunk, akkor a transzfermolekulát beépíthetjük az adenovírus-partikulumok belsejébe. Például, ha a kérdéses transzfermolekula fehérje vagy RNS-molekulát kódoló DNS-molekula, akkor a DNS-t a vírusvektorba építhetjük be, és fotokémiai internalizációt követően a DNS-molekula a megfelelő intracelluláris helyen lesz jelen, így a kódolt molekula expressziója megtörténhet.

Az ilyen molekulák expresszióját szabályozhatjuk a vektornak, a technikában jól ismert és dokumentált eljárásokkal történő, megfelelő tervezésével. Például, szövetspecifikus vagy szabályozható promótereket alkalmazhatunk szövetspecifikus, betegségre specifikus vagy szabályozható expresszió eléréséhez. Például, szövetspecifikus promóterként alkalmazhatjuk a melanómára specifikus tirozinázpromótert. Szabályozható promóterek, mint például tetraciklinnel szabályozható promóterek, jól ismertek. A találmányban alkalmazható specifikus vagy szabályozható promóterekre példákat találhatunk az irodalomban [Hart, *Semin. Oncol.* **23**, 154-158 (1996); Hallahan és mtsai., *Nature Med.* **1**, 789-791 (1995); Luna és mtsai., *Cancer Res.* **60**, 1637-1644 (2000); Miller és Whelan, *Hum. Gene Therapy* (1997); Wickham, *Gene Ther.* **7**, 110-114 (2000); Nettelbeck és Muller, *Trends Genet.* **16**, 174-181 (2000); Clackson, *Gene Ther.* **7**, 120-125 (2000); Freundlieb és mtsai., *Gene Med.* **1**, 4-12 (1999); Spear, *Anticancer Res.* **18**, 3223-3233 (1998); Harvey és Caskey, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 512-518 (1998); Clary és Lyerly, *Surg. Oncol. Clin. North Am.* **7**, 565-574 (1998); és a megadott hivatkozásokban].

Ahogy a fentiekben említettük egyenlő több hordozó és/vagy célbajuttató molekula vagy vektor is alkalmazható párhuzamosan. Például, vektorokat biztosíthatunk valamilyen hordozóban, például vírusvektorokat, például adenovírus-eredetű vektort, valamilyen hordozóban, például liposzóma- vagy polikationos szerkezetben.

A találmányban alkalmazható előnyös hordozók és vektorok, különösen a transzfermolekulával kapcsolatban alkalmazható hordozók és vektorok közé az alábbiak tartoznak: polilizin (például, poli-L-lizin vagy poli-D-lizin), polietilénimin vagy dendrimerek (például, kationos dendrimerek, mint például SuperFect®) vagy más polikationok, dextránszulfát, különféle kationos lipidek, például DOTAP vagy Lipofectin; peptidek és célbajuttató vektorok, mint például transzferrin polilizin vagy célbajuttató adenovírusvektorok.

Az ilyen célbajuttató molekulák vagy hordozók, ahogyan a fentiekben leírtuk, alkalmazhatók arra, hogy a transzfermolekulát a PCI alkalmazására különösen megfelelő intracelluláris kompartmentumokba, például liposzómákba vagy endoszómákba, irányítsák.

Az intracelluláris membránra korlátozódó kompartmentum lehet bármilyen, sejtben jelenlévő kompartmentum. Előnyös, ha a kompartmentum membránvezikulum, különösen ha endoszóma vagy lizoszóma. Azonban, intracelluláris kompartmentum lehet a Golgi-készülék vagy az endoplazmatikus retikulum.

A fotoszenzitivizáló ágens aktiválást eredményező fénybesugárzás a technikában jól ismert eljárásokkal és folyamatokkal történhet. Például, a fény hullámhosszát és intenzitását az alkalmazott fotoszenzitivizáló ágens szerint választjuk meg. Az alkalmas fényforrások a technikában jól ismertek. Az idő, ami alatt a sejteket a fénynek kitesszük a találmány szerinti eljárásokban változhatnak. A transzfer részecskék citoszolba történő internalizációjának hatékonysága úgy tűnik, hogy a fényexpozíció növelésével fokozódik. A besugárzás előnyös időtartama függ a fotoszenzitivizálótól, a célsejtben vagy szövetben összegyűlt fotoszenzitivizáló mennyiségétől és a fotoszenzitivizáló abszorpciós spektruma és a fényforrás emissziós spektruma közötti átfedéstől. A besugárzás időtartama általában a perc nagyságrendtől néhány óra nagyságrendig terjedhet, például előnyösen akár 60 percig, például 0,5 vagy 1 perctől 30 percig, például 0,5-3 percig vagy 1-5 percig vagy 1-10 percig, például 3-7 percig, és előnyösen körülbelül 3 percig, például 2,5-3,5 percig. A megfelelő fénydózist a szakember ki tudja választani és ez ismét a fotoszenzitivizálótól és a fotoszenzitivizáló, célsejtekben vagy szövetekben összegyűlt mennyiségétől függ. Például, rákos megbetegedések fotofrinnal és a protoporfirin prekursor 5-aminolevulénsavval történő fotodinamikus kezelésére jellemzően alkalmazott fénydózisok az 50-150 J/cm² tartományba esnek, ha a hipertermia elkerülésére 200 mW/cm²-nél alacsonyabb fluoreszcenciatarományt alkalmazunk. A fénydózisok általában alacsonyabbak, ha olyan fotoszenzitivizálót alkalmazunk, amelynek az extinkciós együtthatója nagyobb a látható spektrum vörös tartományában. Azonban, kevesebb fotoszenzitivizálót felhalmozó, nem rákos szövetek kezelésére a szükséges összes fény mennyisége, a rákos szövetek kezelésére alkalmazotténál lényegesen nagyobb lehet.

A találmány szerinti eljárásokban alkalmazásra kerülő célmolekula megfelelő dózisainak meghatározása rutin gyakorlat a szakember számára. Ha a transzfermolekula fehérje vagy peptid, in vitro alkalmazásokban a transzfermolekulákat általában kevesebb, mint 5 mg/ml (például, 0,1-5 mg/ml) dózisokban, in vivo alkalmazásokban pedig a transzfermolekulát általában kevesebb, mint 5 mg/kg (például, 0,1-5 mg/kg) dózisokban alkalmazzuk. Amennyiben a transzfermolekula nukleinsav, in vitro alkalmazásokban például 10⁶ sejtre választott dózis körülbelül 0,1-50 µg nukleinsavat tartalmaz és in vivo alkalmazásokban, emberekbe beadásra, a dózis injekcióként körülbelül 10⁻⁶-1 g nukleinsavat tartalmazzon. Ha a transzfermolekulát adenovírus-eredetű hordozóval asszociáltatjuk, in vitro alkalmazások esetén a dózis, például, sejtenként 1-1*10⁵ fizikai vírusrészecske, például 1*10³-1*10⁵ részecske, in vivo alkalmazások esetén pedig az adenovírus-eredetű hordozóval asszociáltan beadni kívánt molekula a vírusrészecskék 1*10⁻⁹-től 50%-ban, például 3*10⁻⁶-50%, például 0,003-30%, például 0,2-10% (w/w) lehet jelen, ahol a w/w a víruseredetű hordozó tömegének és a bevinni kívánt molekula tömegének aránya a végső készítményben. Ha 1 ml-es injekciókban alkalmazzuk, ez a mennyiség körülbelül 10⁵-10¹⁵ fizikai vírusrészecskét tartalmazó dózissal felel meg.

A találmány szerinti eljárások során elkerülhetetlen, hogy néhány sejt elpusztuljon fotokémiai behatás, azaz a fotoszenzitivizáló ágens hatása, következtében. Azonban, e sejtpusztulás nem számít és számos alkalmazás esetében, például rákos szövetek kezelésében, még előnyös is lehet és emellett bizonyos esetekben a helyi immunválasz serkentésével fokozza a terápia hatását. Azonban, a találmány szerinti eljárást módosíthatjuk úgy is, hogy a sejtek túlélő frakcióját vagy részét, a fotoszenzitivizáló ágens koncentrációjának függvényében kiválasztott fénydózissal szabályozzuk. Ilyen eljárások a technikában szintén ismertek. Tisztán a fotokémiai kezelés által

indukált sejthalál vonatkozásában, fontos, hogy a fény dózist úgy szabályozzuk, hogy az egyedi sejtek közül néhány, amelyben a PCI hatás megnyilvánult, ne pusztuljon el tisztán a fotokémiai kezelés következtében (bár ezek feltehetően elpusztulnak a PCI hatás következtében).

Néhány alkalmazásban előnyös lehet, ha a PCI kezelést követően nagyszámú életképes sejt marad fenn. Például, vakcinálásban és bizonyos génterápiás eljárásokban, például az antigén-bemutatót vagy fehérjeexpressziót lehetővé tevő, életképes sejtek fontosak. Ilyen alkalmazásokban előnyös, ha a sejtek populációja vagy sokasága, lényegében az összes sejt, vagy a sejtek jelentős többsége (például, legalább 50%-a, előnyösebben legalább 60, 70, 80, vagy 90%-a) nem pusztul el. Ez persze nem mindig kívánatos, különösen, ha PCI-t alkalmazunk citotoxikus transzfermolekulák bevitelére és ez esetben a további sejtpusztítás nem előnytelen. Citotoxikus hatást azonban úgy is elérhetünk, ha például olyan génterápiát alkalmazunk, amelyben a terápiás gént a találmány szerinti eljárással daganatsejtekbe internalizáljuk, így például e sejtek olyan, immunológiai-lag aktív szubsztanciákat fognak termelni, amelyek a fennmaradt rákos sejtek helyi immunológiai pusztítását indukálják vagy a daganatsejtek ellen szisztemikus immunválaszt váltanak ki. Ilyen esetekben egyértelmű, hogy a PCI kezelés után szükség van életképes sejtekre.

A találmány szerinti eljárások, különösen a találmány azon megvalósítási módjai és a kezelés egymás utáni lépései, ahol során a transzfermolekulát a fényel történt besugárzási lépés után adjuk a sejtekhez, a korábban leírt eljárásokkal összehasonlítva az alábbi előnyöket biztosítják:

- a) a transzfermolekulát ért fotokémiai károsodás lecsökken;
- b) belső léziók sebészi beavatkozással kombinált PCI kezelése leegyszerűsödik, mivel a fotokémiai kezelést a lézió sebészi kezelését követően, például a víruseredetű hordozónak (és azzal asszociálódott transzfermolekulának) tumorba történő injektálásával vagy más helyi bevitellel végezhetjük;
- (c) az eljárások kevésbé függenek az időzítéstől, azaz a sejt által felvételre kerülő molekula hozzáadásának időpontja a megvilágítás időpontjához képest. Ez azt jelent, hogy a kezelésre nagyobb „időtartam” áll rendelkezésre. Ez lényeges, mert a terápiás molekula felvétele a különféle klinikai helyzeteknek megfelelően lényeges mértékben változhat és emellett, egy adott klinikai helyzetben egyedi léziók tekintetében a felvételi nehezen lehet meghatározni, ezért a nagyobb időtartam rendkívül előnyös;
- (d) a transzfermolekula gyors transzlokációja a citoszolba, ezért lényegesen lecsökken a transzfermolekula lizoszómális degradációjának esélye.

A molekulák internalizációjának PCI eljárásokkal társult előnyei például az alábbiak: (1) az internalizálni kívánt molekula méretét csak az szabja meg, hogy e hordozót a célsejt endocitózissal fel tudja-e venni; (2) az eljárások nem függenek a sejtek osztódásától; (3) az eljárások helyspecifikusak abban a tekintetben, hogy a hatás csak a fénynek kitett részeket érinti; (4) az eljárás nem rákkeltő.

A sejtek fotoszenzitiváló ágenssel és a transzfermolekulával történő „érintkeztetése” bármilyen kényelmes vagy kívánt módon elvégezhető. Így, ha az érintkeztetést *in vitro* végezzük, a sejteket vizes tápoldatban – mint például a sejtek tenyésztésére alkalmas tápoldatban – kényelmesen fenntarthatjuk, és a megfelelő időpontban a fotoszenzitiváló ágenszt vagy a transzfermolekulát, a szükséges körülmények biztosítása mellett (például, megfelelő koncentrációban, és megfelelő hosszúságú időtartamig), egyszerűen hozzáadjuk a tápoldathoz.

A fotoszenzitiváló ágenszt megfelelő koncentrációban, és megfelelő hosszúságú időtartamig történő érintkeztetjük a sejtekkel. Az alkalmazott konkrét fotoszenzitiváló ágens és a sejttípus ismeretében, a szakember rutin eljárásokkal képes könnyedén meghatározni szükséges koncentrációt és az időtartamot. A fotoszenzitiváló

agens koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy ha egyszer bejutott a sejtbe (például, a sejten belülre, vagy asszociálódott a sejttel, vagy annak egy vagy több kompartmentumával) és besugárzással aktiváltuk, akkor egy vagy több sejtalkotót elpusztítson, például egy vagy több intracelluláris kompartmentum lízisét vagy pusztulását okozza. Például, a példákban leírt fotoszenzitivizáló ágenseket például 10-50 µg/ml koncentrációban alkalmazhatjuk. *In vitro* alkalmazáshoz a koncentrációtartomány általában szélesebb, például 0,05-500 µg/ml. Emberek *in vivo* kezelésére a fotoszenzitivizáló agens koncentrációja szisztemikus beadás esetén 0,05-20 mg/testtömeg kilogramm, topikálisan alkalmazva pedig a topikális felvitelre szolgáló oldószerben 0,1-20%. Kisebb állatokban a koncentrációtartomány az előzőektől eltérhet, azonban a fentiek szerint beállítható.

A sejtek fotoszenzitivizáló agenssel történő inkubálásának időtartama (azaz az „érintkezési idő” néhány perctől több óráig, például akár 48 óráig vagy tovább, tarthat. Az inkubációs időt olyan hosszúra válasszuk, hogy a fotoszenzitivizáló agens a megfelelő sejtek fel tudják venni.

Miután a sejteket a fotoszenzitivizáló agenssel inkubáltuk, adott esetben az inkubálást tovább folytathatjuk, de fotoszenzitivizáló agens nélküli tápoldatban, majd ezt követően sugározzuk be a sejteket fénnel vagy adjuk a sejtekhez a transzfermolekulát.

A transzfermolekula lehet bármilyen, a fentiekben tárgyalt molekula, és a molekulát megfelelő koncentrációban és megfelelő hosszúságú ideig érintkeztetjük a sejtekkel. Meglepetésünkre úgy találtuk, hogy az érintkezést akár a besugárzás után néhány órával is elvégezhetjük. A kérdéses molekula felvételétől függő hatékonyság és a sejtben elérni kívánt végső koncentrációtól függő megfelelő koncentráció meghatározható. Így, a leírás szerinti értelemben, a „transzfekciós idő” vagy a „sejt általi felvételi időtartama” – azaz a hordozónak a sejttel történő érintkezésének ideje lehet néhány perc vagy akár néhány óra, például, a transzfekciós idő lehet 10 perc és 24 óra közötti időtartam, például 30 perc és 10 óra közötti időtartam vagy például 30 perc és 2 vagy 6 óra közötti időtartam. A megnövekedett transzfekciós idő eredményezheti a kérdéses hordozó megnövekedett felvételét. Azonban, a rövidebb inkubációs idők, például 30-tól 1 óráig terjedő időtartam úgy tűnik a molekula felvételének fokozott specifikusságát eredményezzi. Így, a transzfekciós idő bármely eljárással történő megválasztása során megfelelő egyensúlyt kell tartani a molekula elégséges felvétele és a felvétel megfelelő specifikusságának biztosítása között.

In vivo, az a megfelelő eljárás és inkubációs idő, amely alkalmazásával a transzfermolekulát és a fotoszenzitivizáló agenszt érintkeztetjük a célsejtekkel, függ a beadás módjától és a transzfermolekula és a fotoszenzitivizáló agens típusától. Például, ha a transzfermolekulát a kezelni kívánt daganatba injektáljuk, az injekciós ponthoz közeli sejtek sokkal gyorsabban fognak érintkezésbe lépni és ezáltal a transzfermolekulát felvenni, míg az injekciós ponttól távolabb eső sejtek esetében ez a folyamat feltehetően későbbi időpontban és alacsonyabb koncentrációval történik. Ezenfelül, az intravénás injekcióként beadott transzfermolekula a célsejtekhez csak egy bizonyos idő elteltével érkezik meg, és így a beadást követő időszaknak hosszabbnak kell lennie, például néhány nappal, ahhoz, hogy a transzfermolekula elégséges vagy optimális mennyiségben gyűljön fel egy adott célsejtben vagy szövetben. Hasonló módon, a fotoszenzitivizáló agens sejtekbe történő felvételét illetően, tekintetbe kell venni a beadási időt. Az egyedi sejtekhez szükséges *in vivo* beadási idő így feltehetően változik ezen és más paraméterektől függően.

Így, bár a helyzet az *in vivo* alkalmazás esetén sokkal bonyolultabb, mint *in vitro*, a találmány kiemelt koncepciója még mindig ugyan az marad, azaz a beadás idejét úgy kell megválasztani, hogy még a besugárzás előtt a fotoszenzitivizáló agens megfelelő mennyisége érintkezzen a célsejtekkel és az agenszt a célsejtek felvegyék

és vagy (i) a besugárzás alatt a transzfermolekulát a sejt már felvegye, vagy (ii) besugárzás után a transzfermolekula a sejtekkel a sejtekbe történő felvételhez elegendő időtartamig érintkezzen.

A leírás szerinti értelemben, a „sejt” kifejezés magában foglalja az összes eukarióta sejtet, ideértve a rovarsejteket és gombaeredetű sejteket, és ideértve a szomatikus és csirasejteket is. Reprezentatív „sejteknek” tekintjük az alábbiakat: az összes emlőseredetű és nem emlőseredetű állati sejt, növényi sejtek, rovarsejtek, gombasejtek és protozoonok.

A találmány szerinti eljárás alkalmazható *in vitro* vagy *in vivo*, akár szisztémikus akár pedig helyi, *in situ*, vagy *ex vivo* kezelésre, amikor is a kezelést követően a kezelt sejteket a testbe adjuk be.

A találmány szerinti eljárásokat alkalmazhatjuk például rákos megbetegedés kezelésére. Számos fotoszenzitivizáló előszeretettel lokalizálódik neoplasztikus szövetekben, azaz a daganattal kapcsolatos szelektivitás általában 2-3 faktossal magasabb, mint a környező szövetekre, de e faktor bizonyos esetekben, például az agyban, ennél is magasabb, azaz akár 30, is lehet. Esetleg, a fentiekben leírt eljárásokkal egy konkrét fotoszenzitivizáló ágenszt irányíthatunk egy konkrét daganatra. Továbbá, rák kezelésében klinikai érdeklődésre esetleg számítottak olyan molekulák, amelyek felvétele a citoszolba nem történik meg, vagy csak igen korlátozott mértékben, bevitelük a citoszolba és specifikus sejtekre irányíthatók a találmány eszközeivel. Ilyen molekula például a gelonin. Más molekulák, akár önmagukban akár pedig egy adott sejtbe internalizálni kívánt molekulát célba irányító molekulához (például, antitestek, transzferrin, fotoszenzitivizálók, apoB a rekonstituírt LDL-partikulumokon) kapcsolatosan, is alkalmazhatók. Az ilyen kombinációs kezelés előnyei az alábbiak lehetnek: 1) fokozott citotoxikus hatás a daganatszövetek mélyebbi rétegeiben, mivel alacsony vagy a toxikusnál alacsonyabb dózissal fény elegendő a lizoszómák és endoszómák roncolásához; 2) a kezelés fokozott specifikussága, mivel a PCI-t csak a daganat területére alkalmazzuk.

A találmány szerinti eljárások alkalmazhatók különféle más elváltozások kezelésére, a sejtbe bevinni kívánt molekula kiválasztásának megfelelően: izületi csúsz, *artherosclerosis*, és más szív- és érrendszeri betegségek, vírusos- és más fertőzések, *psoriasis*, szoláris elszarusodás, sebgyógyulás, törés gyógyulása, szemölcsök és örökletes elváltozások – például cisztikus fibrózis, Gorlin-féle betegség, *ataxia telangiectasia*.

A találmány szerinti eljárások a génterápiában, azaz a gének terápiás transzfere egy adott páciens sejtjeibe, is alkalmazhatók. A génterápia számos betegség – például rák, szív- és érrendszeri betegségek, vírusfertőzések, monogén betegségek, mint például cisztikus fibrózis – és számos más állapot (lásd a fentiekben leírtak) kezelésének ígéretes eljárása. Ma a génterápia egyik jelentős problémája az a magas hatékonyság és specifikitás, amelyet *in vivo* el kell érni. A jelenlegi eljárásokban számos különböző hordozót és vektort alkalmaznak géntranszfer eléréséhez a génterápiában. Például, megemlíthetjük a polikationos vegyületeket, kationos lipideket vagy vírusrendszereket, de a génterápia eddig még kevésbé volt sikeres. A jelenlegi eljárások több ismert akadály közé tartozik a vektor alacsony stabilitása a szérumban, a génbevétel korlátozott specifikussága, a génbevétel alacsony hatékonysága, stb. A találmány szerinti PCI eljárások lehetőséget biztosítanak a génterápiában jelenleg alkalmazott eljárások közül soknak a hatékonyságát és specifikitását lényeges mértékű növelésére oly módon, hogy az eljárások fokozzák az endoszómából történő felszabadulási lépést, amely számos szintetikus génbevételi vektor és vírusrendszer esetében a hatékonyságot behatároló lépés. A PCI eljárás részét képező fénykezelés szintén lehetővé teszi annak pontosan meghatározását, hogy a testbe hol jelentkezzen a fokozott géntranszfer, mivel a géntranszfer csak a megvilágított területeken fokozódik. A találmány szerinti eljárás alkalmazható *in vitro* vagy *in vivo*, akár szisztémikus akár pedig helyi, *in situ*, vagy *ex vivo* kezelésre, amikor is a kezelést köve-

tően a kezelt sejteket a testbe adjuk be. A találmányban alkalmazható előnyös hordozók és vektorok, különösen a transzfermolekulával kapcsolatban alkalmazható hordozók és vektorok közé az alábbiak tartoznak: adenovírusok, polikationok, például polilizin (például, poli-L-lizin vagy poli-D-lizin), SuperFect®, polietilénimin vagy dendrimerek, különféle kationos lipidek, például DOTAP vagy Lipofectin vagy „helper lipiddel” formulázott kationos lipidek, mint például DOPE; peptidok és célbajuttató vektorok, mint például transzferrin polilizin vagy célbajuttató adenovírusvektorok. A találmány előnyös megvalósítási módjában, a terápiás génre alkalmazott hordozó, adenovírus.

A találmány egy másik előnyös szempontja a nem víruseredetű hordozórendszerek, mint például kationos polimerek, így peptidok és kationos lipidek, alkalmazása. Jellemző polimerek közé tartoznak például az alábbiak: poliamin, poliaminosavak – így bázikus poliaminosavak-, szintetikus és természetes kationos cukorpolimerek, metakrilát polimerek, dendrimerek, polialkiléniminek és a technikában ismert, drogbevitelre alkalmas más polimerek; különösen a génbevitelre alkalmas polimerek. A találmány szerinti, jellemzően alkalmas vegyületek például az alábbiak: polilizin, poliarginin, poli-L-glutaminsav, polivinil-piridin, kitozán, polietilénimin, poli(2-dimetilamino)etil metakrilát, hisztionok, protamin, poli(L-ornitin), avidin, spermin, spermidin és ezek bármely származéka. A találmány előnyös szempontja szerint, a leírt polimereket kombinálhatjuk más polimerekkel vagy kombinálhatjuk más génbeviteli rendszerekkel. A találmány szerinti alkalmas, nem víruseredetű beviteli rendszer az irodalomban ismert [lásd például, Mahato és mtsai., *Advances in Genetics*, szerk.: Hall és mtsai., 41, 95-156 (1999)]. Kationos polimerek az irodalomban részletesen le vannak írva [Garnett, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16, 147-207 (1999); Howard és mtsai., *Biochim. Biophys. Acta* 1475, 245-255 (2000); Nguyen és mtsai., *Gene Ther.* 7, 126-138 (2000); Bragonzi és mtsai., *J. Controlled Release* 65, 187-202 (2000); DeSmedt és mtsai., *Pharm. Rel.* 17, 113-126 (2000); Mahato, *J. Drug Targeting* 7, 249-268 (1999)].

A találmány egy másik szempontja szerint, a találmányban liposzómákat vagy más, lipideken alapuló konstrukciókat alkalmazunk nem víruseredetű hordozórendszerként. A liposzómák lehetnek pH-ra érzékeny liposzómák vagy a pH-ra nem érzékeny liposzómák. A pH-ra érzékeny liposzómák a liposzóma membránjában legalább egy pH-ra érzékeny komponenst tartalmaznak. Jellemző vegyületek közé tartoznak zsírsavak, például olajsav, palmitoil-homociszteín, koleszterol, hemiszukeinát morfolinsó és dioleoilszukcinil-glicerol. A liposzómák a pH-ra érzékeny komponensek mellett tartalmazhatnak dioleoilfoszfátidil-etanolamint (DOPE) és/vagy más hasonló foszfolipidet.

A liposzómák vagy más lipidalapú beviteli rendszer előnyösen legalább egy kationos lipidet tartalmaznak.

A lipidalapú beviteli rendszer különféle vizes formulációban lehet jelen. E formulációkra különféle kifejezéseket alkalmaznak az irodalomban: többrétegű liposzómák, egyrétegű liposzómák, pH-ra érzékeny liposzómák, nanoemulziók, nanopartikulumok, proteoliposzómák, viroszómák, kimeraszómák, kohelátok, lipofectin® és lipoplex. A kationos lipidek géntranszferben történő alkalmazásával számos közlemény foglalkozik [például, Felgner és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417 (1987); Lasic és mtsai., *Adv. Drug Del. Rev.* 20, 221-266 (1996); Barron és mtsai., *Gene Ther.* 6, 1179-1183 (1999); Kawakami és mtsai., *Pharm. Res.* 17, 306-313 (2000); Templeton és mtsai., *Mol. Biotechnol.* 11, 175-180 (1999); Zou és mtsai., *Cancer Gene Ther.* 7, 683-696 (2000); Stuart és mtsai., *Biochem. Biophys. Acta* 1463, 219-229 (2000); Mahato és mtsai., *Drug Deliv.* 4, 151 (1997); és Lee és mtsai., *Crit. Rev. Drug Carrier Syst.* 14, 173 (1997)].

Kationos lipidek jellemző példái közé az alábbiak tartoznak: N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetil-ammónium klorid (DOTMA), 1,2-dimirisztil-oxipropil-3-dimetilhidroxietilammónium bromid (DMRIE), 1,2-bisz(oleiloxi)-3-(trometilamino)propán (DOTAP), 3 β (N',N'-dimetilaminoetán)-karbamoil-koleszterol (DC-Chol), 2,3-dioleil-oxi-N-[2-sperminkarboxil-amido]etil-N,N-dimetil-1-propánaminium trifluoroacetát (DOS PA), 3- β (N⁴-spermin karbamoil)-koleszterol, 3- β (N⁴-spermidin karbamoil)-koleszterol és dioktadecilamidoglil spermin (DOGS).

Ahogy a fentiekben leírtuk, a találmány egyik előnyös megvalósítási módjában, a hordozó kationos lipid. Korábban már leközlésre került az, hogy a fotokémiai kezelés gátolja a kationos lipidek által közvetített transzfekciót, ha a fényt a transzfermolekula beadását követően alkalmazzuk [Prasmickaite és mtsai., J. Gene Med. 6, közlés alatt]. Azonban, meglepetésünkre úgy találtuk, hogy amennyiben a fényt a transzfermolekula beadása előtt alkalmazzuk, a PCI serkentő hatást fejt ki a kationos lipidekkel végzett transzfekcióra (lásd 9. példa).

Így, a találmány további szempontja szerint, a találmány tárgyát transzfermolekulát és fotoszenzitivizáló ágenszt tartalmazó, terápiás célokra alkalmazható készítmények képezik. A találmány tárgyát készítmény, betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére vagy megelőzésére történő külön vagy szekvenciális alkalmazásra, ahol a fotoszenzitivizáló ágens és külön a transzfermolekula egy adott páciens sejteivel vagy szöveteivel érintkeztetendő, és a sejtek a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel besugárzandók, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végzendő, ahol a transzfermolekula terápiás molekula. Adott esetben, a készítményben a transzfermolekula és/vagy a fotoszenzitivizáló ágens - például a fentiekben leírt - hordozó molekulákkal asszociálva lehet. Előnyös, ha készítményt rákterápiára vagy génterápiára alkalmazzuk. Génterápiás célokra előnyös hordozó molekula adenovírus. Egyéb előnyös hordozók kationos lipidek.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya transzfermolekula és/vagy fotoszenzitivizáló ágens leírtak szerinti alkalmazása a terápiában alkalmazható gyógyszer előállítására, ahol a fotoszenzitivizáló ágenszt és külön a transzfermolekulát egy adott páciens sejteivel vagy szöveteivel érintkeztetünk és a sejteket a fotoszenzitivizáló ágenszt hatékonyan aktiváló hullámhosszúságú fénnel besugározzuk, és a besugárzást a transzfermolekulának a fotoszenzitivizáló ágenszt már tartalmazó intracelluláris kompartmentumba, előnyösen a transzfermolekula bármilyen intracelluláris kompartmentumba történő celluláris felvétele előtt végezzük. Az ilyen eljárásokat tartalmazó kezelési eljárások a találmány alternatív szempontjait képezik.

Így, a találmány tárgya az itt ismertetett transzfermolekula és fotoszenzitivizáló ágens alkalmazása betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére vagy megelőzésére, előnyösen génterápiára, immunválasz stimulálására vagy rák kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a fotoszenzitivizáló ágens és külön a transzfermolekula egy adott páciens sejteivel vagy szöveteivel érintkeztetendő, és a sejtek a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel besugárzandók, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végzendő, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

A leírás szerinti értelemben, a „kezelés” kifejezés a kezelni kívánt betegség, elváltozás vagy fertőzés egy vagy több szimptomájának csökkentését, enyhítését vagy megszüntetését jelenti, a kezelés előtti szimptomákhoz képest. A leírás szerinti értelemben, a „megelőzés” kifejezés a betegség, elváltozás vagy fertőzés szimptomái kitörésének késleltetését vagy megelőzését jelenti.

Ahogy a fentiekben már említettük, ilyen eljárásokat vakcinálási eljárásokban is alkalmazhatunk. Ennek megfelelően, a találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya *in vitro* vagy *ex vivo* eljárás antigén molekula (a transzfermolekula) vagy annak részének a sejt. előnyösen antigént bemutató sejt, felszínén történő expresszáására vagy bemutatására, ahol az eljárás a fentiekben meghatározott lépéseket tartalmazza. A megfelelő második gyógyászati alkalmazás a találmány további szempontját képezi.

A leírás szerinti értelemben, az „expresszá” vagy „bemutat” kifejezések a molekula vagy annak egy részének jelenlétét jelentik a sejt felszínén, ahol a molekula legalább egy része a sejtet övező környezetnek van kitéve és e környezeti számára elérhető. A „felszínen” történő expresszió esetén az expresszálni kívánt molekula a sejtmembránnal és/vagy az abban esetleg jelenlévő vagy valamilyen indukció eredményeként képződő komponenseivel érintkezik.

Azonban előnyös, ha az ilyen antigén-bemutatás előnyösen az immunválasz - előnyösen olyan immunválasz, amely védelmet biztosít az antigén molekulát vagy annak részét tartalmazó entitással történő provokáció ellen - serkentését eredményezi, és ebből következően a találmány vakcinálási alkalmazásként különösen alkalmazható. Ennélfogva, a találmány tárgya, előnyösen, a fentiekben leírt eljárást tartalmazó vakcinálási alkalmazás.

A találmány ezen szempontja szerint, a fentiekben meghatározott transzfermolekula elnevezése „antigén tulajdonságú molekula”. Az antigén tulajdonságú molekula lehet bármilyen molekula, amely molekula vagy annak része - az immunrendszernek megfelelőképpen bemutatta - képes immunválaszt serkenteni. Előnyös, ha az antigén tulajdonságú molekula vakcina-antigén vagy vakcinakomponens, mint például polipeptidet tartalmazó entitás.

Sok ilyen antigén vagy antigén tulajdonságú vakcinakomponens ismert a technikában és ide tartozik a bakteriális vagy víruseredetű antigének összes válfaja, sőt még bármilyen patogén faj, ideértve a protozoonokat vagy magasabb szervezeteket, antigénjei vagy antigén tulajdonságú komponensei is. Míg, a vakcinák antigénkomponensei hagyományosan a teljes organizmust (akár élő, akár pedig elpusztított vagy gyengített formában) tartalmazták - azaz egészsejt-vakcinák, az alegység-vakcinákat - azaz bizonyos szervezetek konkrét antigén tulajdonságú komponensein, például fehérjék vagy peptidek, vagy akár szénhidrátok, alapuló vakcinákat - is széleskörben vizsgálták és írták le az irodalomban. A találmány szerinti antigén tulajdonságú molekulaként bármely „alegységen” alapuló vakcina komponense alkalmazható. Azonban, a találmány előnyösen alkalmazható a peptidvakcinák terén. Így, a találmány szerinti előnyös antigén tulajdonságú molekula peptid (amely a leírás szerinti értelemben tartalmazza mind a rövidebb és mind pedig a hosszabb peptideket, azaz peptideket, oligopeptideket, vagy polipeptideket, és fehérjemolekulákat vagy azok fragmentumait, például 5-500, például 10-250, mint például 15-75 vagy 8-25 aminosavból álló peptideket). Előnyösen bemutatásra kerülő vagy expresszálandó antigén tulajdonságú molekulák részei olyan részeket tartalmaznak, amelyeket a sejt antigén-bemutató gépezete állít elő. A részek azonban más úton is előállíthatók, például megfelelő antigéntervezéssel (például pH-ra érzékeny sávok) vagy a sejtek más átalakító folyamataival. A kényelmesen alkalmazható részek immunválaszt kiváltására alkalmas méretűek, például, peptidek esetén, több mint 5, például több mint 10 vagy 20 aminosavból állnak.

Nagyszámú peptidvakcina-jelölt ismert az irodalomban, például a vírusbetegségek és fertőzések, például AIDS/HIV fertőzés vagy influenza, kutya parvovírusa, szarvasmarha leukémia vírusa, hepatitis, stb. kezelésére [lásd például, Phanuphak és mtsai., *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 15, 41-48 (1997); Naruse, Hokkaido Igaku

Zasshi 69, 811-820 (1994); Casal és mtsai., J. Virol. 69, 7274-7277 (1995); Belyakov és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1709-1714 (1998); Naruse és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9588-9592 (1994); Kabeya és mtsai., Vaccine 14, 1118-1122 (1996); Itoh és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9174-9178 (1986). Hasonlóképpen, baktériumból származó peptideket is alkalmazhatunk, sőt a peptid-antigének más szervezeteiből vagy fajokból is származhatnak.

Patogén szervezetekből származó antigének mellett, rák vagy más betegségek, például *sclerosis multiplex*, elleni vakcinaként bizonyos peptidek alkalmazása is javasolt. Például, rákelleni vakcinákként – a citotoxikus T-limfocitákat serkentő antigénként – bizonyos mutáns onkogén peptidek rendkívül ígéretesnek tűnnek [Schirmacher, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121, 443-451 (1995); Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers 17, 316-327 (1997)]. Szintetikus peptidvakcinákat is teszteltek már az áttétes melanóma kezelésére [Rosenberg és mtsai., Nat. Med. 4, 321-327 (1998)]. T-sejt receptorpeptidet tartalmazó vakcina alkalmazása a *sclerosis multiplex* kezelésében szintén ismert az irodalomban [Wilson és mtsai., J. Neuroimmunol. 76, 15-28 (1997)]. A találmány szerinti antigén tulajdonságú molekulaként bármilyen ilyen peptidvakcinakomponens alkalmazható, és ezenfelül az irodalomban peptidvakcinaként leírt vagy javasolt bármely peptid is. A peptid lehet szintetikus vagy izolált vagy egy adott szervezetből bármely módon származtatott.

Az eljárással befolyásolt sejt, például a találmány e szempontja szerint, lehet bármely sejt, amely képes a felszínén a beadott vagy a kérdéses sejt citoszoljába transzportált molekulát expresszálni vagy bemutatni.

Mivel a találmány e szempontjának elsődleges alkalmazása az antigén-bemutatáson vagy vakcináláson alapul, a sejt kényelmesen lehet immuneffektor-sejt, azaz az immunválaszban résztvevő sejt. Azonban, más sejtek is bemutatnak antigént az immunrendszernek és ezek szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. A találmány e szempontja szerinti sejtek előnyösen antigént bemutató sejtek. Az antigént bemutató sejtek résztvehetnek az immunrendszer bármely aspektusában vagy „ágában”, ideértve a humorális és sejtek által közvetített immunitást, például az antitest-termelés serkentését, vagy az olyan citotoxikus vagy ölüsejtek serkentését, amelyek felismerik és elpusztítják (vagy valahogy másként eliminálják) az „idegen” antigéneket felszínükön expresszáló sejteket. A leírás szerinti értelemben, az „immunrendszer serkentése” kifejezésbe így beletartozik mindenféle típusú immunválasz és az azokat serkentő mechanizmusok.

A citotoxikus sejtek vagy antitestet előállító sejtek serkentéséhez arra van szükség, hogy az antigének az antigént bemutató sejtekkel például MHC I bemutatás (például, a CD8⁺ citotoxikus T-sejtek MHC-I antigén-bemutatást igényelnek) egy konkrét módon serkentésre kerülő sejtnak bemutatásra kerüljenek.

Az antigént bemutató sejtek a technikában ismertek, az irodalomban le vannak írva, és ezek közé sorolunk limfocitákat (T- és B-sejteket), dendritikus sejteket, makrofágokat, stb. A többi közé tartoznak például ráksejtek, például melanóma sejtek.

Antigének, a citotoxikus T-sejteknek (CTL) az antigént bemutató sejtekkel történő bemutatáshoz az antigén tulajdonságú molekulának be kell lépnie az antigént bemutatósejtek citoszoljába [Germain, Cell 76, 287-299 (1994)]. A találmány hatékony módot biztosít az antigén tulajdonságú molekula citoszolba történő bevitelére.

Mintán az antigén tulajdonságú molekula, a fotokémiai internalizációs folyamat eredményeként bejutott a citoszolba, a sejt antigént átalakító gépezete azt átalakíthatja és megfelelő módon – például az I. osztályba sorolt MHC révén – a sejtfelszínen bemutatja. E folyamat során az antigén degradálódhat, például fehérje- vagy polipeptid-antigének peptidekké bomlanak le, amely peptidek azután az MHC-molekulákkal komplexet képez-

nek. Így, a sejt felszínére expresszált vagy bemutatott, találmány szerinti antigén tulajdonságú molekula lehet a sejt által felvett antigén tulajdonságú molekula része vagy fragmentuma.

Antigént bemutató sejtek antigéneket endocitózissal vehetnek fel és az endocitotikus vezikulumokban peptidekké bontják. E peptidek az endoszómákban MHC II. osztályba sorolt molekulákhoz kötődhetnek és a sejt felszínére transzportálódhatnak, ahol a peptid-MHC II. osztályba sorolt fehérje komplexet a CD4+ helper sejtek felismerhetik és immunválaszt indukálnak. Esetleg, a citoszolba jutott fehérjék, például proteoszómák hatására, részekre bomolhatnak és TAP útján (antigén-bemutatással asszociálódott transzporter) az endoplazmatikus retikulumba transzportálódhatnak, ahol a peptidek MHC II. osztályba sorolt molekulákhoz kötődhetnek és a sejt-felszínre transzportálódhatnak (lásd 1. ábra) [Yewdell és Bennik, Adv. Immunol. 52, 1-123 (1992)]. Ha a peptid idegen antigénből származik, akkor a peptid-MHC I. osztályba sorolt fehérje komplexet a CD8+ citotoxikus T-sejtek (CTL-ek) felismerik. A CTL-ek a peptid-MHC (HLA) I. osztályba sorolt fehérje komplexhez kötődnek és ezáltal aktiválódnak, osztódni kezdenek és CTL-klónt képeznek. A célsejtet és ugyanazon peptid-MHC I. osztályba sorolt fehérje komplexet a felszínükön hordozó más célsejteket a CTL-klón elpusztíthatja. Az idegen antigén elleni immunitást úgy alapozhatjuk meg, ha egy adott antigén elégséges mennyiségét visszük be a citoszolba [Yewdell és Bennik, mint fent; Rock, Immunol. Today 17, 131-137 (1996)]. Ez az alapja többek között a rákelleni vakcinák kifejlesztésének. Az egyik legnagyobb gyakorlati probléma a megfelelő mennyiségű antigén (vagy az antigénrészek) bevitel a citoszolba. E probléma megoldható a találmány szerinti PC1-vel.

A készítmények tartalmazhatnak olyan sejtet, amelynek citoszoljába transzfermolekulát internalizáltunk a találmány szerinti eljárással. Ilyen készítményt alkalmazhatunk terápiás, különösen rákterápiás, génterápiás és vakcinálási célokra.

Továbbá, a sejt citoszoljába internalizált transzfermolekulát tartalmazó, a találmány szerinti eljárással előállított sejtet vagy sejtek populációját is ismertetjük.

Ilyen sejt vagy sejtpopuláció alkalmazását is ismertetjük terápiás, különösen rákterápiás, génterápiás és vakcinálási célokra alkalmas készítmény vagy gyógyszer előállítására.

Ismertetünk továbbá páciens kezelésére szolgáló eljárást is, amelyben a páciensnek sejteket vagy a találmány szerinti készítményeket adunk be, azaz eljárás során a fentiekben leírtak szerint molekulát sejtbe viszünk be, és az így elkészített sejtet a páciensnek beadjuk. Az eljárásokat alkalmazhatjuk rák kezelésére, génterápiában vagy vakcinálásra.

A találmány egy további szempontja szerint a találmány tárgya meghatározott transzfermolekula betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére történő alkalmazásra, ahol a betegség, rendellenesség vagy fertőzés páciens sejtjeinek vagy szöveteinek a gyógyszerrel történő érintkeztetésével kezelendő, és külön az 1-25. igény-pontok bármelyike szerinti meghatározott fotoszenzitivizáló ágens érintkeztetendő a páciens sejtjeivel vagy szöveteivel, és a sejtek besugárzandók a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fényvel, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végzendő, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

In vivo, a beadás történhet bármilyen, a technikában ismert hagyományos vagy standard eljárással, például injekcióval, infúzióval, mind a belső és mind pedig a külső testfelszínre topikálisan, stb. In vivo alkalmazására, a találmány alkalmazható bármilyen olyan szövet vonatkozásában, amelyben a fotoszenzitivizáló ágens és a transzfermolekula lokalizálódik, ideértve a testfolyadékban és a szilárd szövetekben történő lokalizációt. Bármilyen szövet kezelhető, ha a fotoszenzitivizálót a célsejtek felvesszik, és a fényt megfelelőképpen lehet alkalmazni.

A találmány szerinti termék formulázható bármely alkalmas, a gyógyászati technikában ismert eljárással, például egy vagy több gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyag vagy kötőanyag alkalmazásával. A leírás szerinti értelemben, a „gyógyászatiilag elfogadható” kifejezés olyan összetevőt jelent, amely összeegyeztethető a találmány más összetevőjével és a befogadó számára fiziológiailag elfogadható. A termék természetét és a hordozó- vagy kötőanyagokat, dózisokat, stb. rutin eljárással választhatjuk meg a beadás kiválasztott és kívánt módjától, a kezelés céljától, stb. függően. A dózisok hasonlóképpen rutin eljárással meghatározhatók és függenek a molekula természetétől, a kezelés céljától, a páciens korától, a beadás módjától, stb. A fotoszenzitivizáló ágenssel kapcsolatban, a membránok azon képességét, hogy besugárzásra a membránokat roncsolják, szintén számításba kell venni.

A találmányt az alábbi – semmiben sem korlátozó – példákban részletesebben ismertetjük.

Az alábbiakban leírjuk a találmányhoz tartozó ábrákat.

1. ábra: THX sejtek fénnel indukált transzfekciója pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, amelyben a sejteket a pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, a fénnel történő besugárzás előtt vagy után, érintkeztetjük, ahogyan az ábrán jeleztük.

2. ábra: HCT-116 sejtek fénnel indukált transzfekciója pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, amelyben a sejteket a pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, a fénnel történő besugárzás előtt vagy után, érintkeztetjük, ahogyan az ábrán jeleztük.

3. ábra: THX sejtek fénnel indukált kezelése geloninnal és ennek eredményeként a fehérjeszintézisben bekövetkezett csökkenés, ahol a sejteket geloninnal, a fénnel történő besugárzás előtt vagy után, érintkeztetjük, ahogyan az ábrán jeleztük.

4. ábra: A sejtek pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, közvetlenül fénnel történő besugárzás előtt és a fénnel történő besugárzás utáni későbbi időpontban, történő érintkeztetésének hatása a fénnel indukált transzfekció hatékonyságára THX sejteken.

5. ábra: A sejtek pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, a fénnel történő besugárzás előtti és utáni különböző időpontokban, történő érintkeztetésének hatása a fénnel indukált transzfekció hatékonyságára THX sejteken.

6. ábra: A sejtek pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, a fénnel történő besugárzás utáni különböző hosszúságú időtartamok során, történő érintkeztetésének hatása a fénnel indukált transzfekció hatékonyságára THX sejteken.

7. ábra: Annak a potenciális modellnek a vázlatos bemutatása, amellyel a találmány feltehetően működik.

A. 1. Az „S” fotoszenzitivizáló endocitózison megy át (I) és intracelluláris vezikulumokba jut (II). E vezikulumok fény hatására felszakadnak (III).

B. Az „A” pontban leírt fotokémiai kezelés után, a sejteket „M” molekulával kezeltük, amely molekula endocitózison ment át és intracelluláris vezikulumokba jutott. E vezikulumok a fotokémiaiilag károsodott vezikulumokkal fuzionálnak és az „M” molekula a citoszolba kerül.

8. ábra: A sejtek pEGFP-N1 polilizin-komplexszel, 0°C-on történt kezelésének a transzfekcióra gyakorolt hatása.

9. ábra: pEGFP-N1 polilizin-komplex, fénnel indukált transzfekciója abban az esetben, ha fotoszenzitivizáló ágensként, az endocitotikus vezikulumokban általában nem lokalizálódó 3-THPP-t alkalmazzuk.

10. ábra: Fotoszenzitivizáló és fénnel végzett előkezelés kombinációjának hatása sejtek, kationos lipidekkel végzett transzfekciójára.

11. ábra: A fotokémiai kezelés hatása THX sejtek adenovírussal végzett transzdukcijára.

12. ábra: A fotokémiai kezelés hatása a FITC-dextrán intracelluláris lokalizációjára. THX sejteket kezeltünk 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{22} -val 18 órán át, majd ezt követően 4 órán át inkubáltuk AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban. Ezután, a sejteket vagy 4 percig fényel kezeltük (B, D), vagy sötétben tartottuk (A, C), majd 3 órán át 5 mg/ml FITC-dextránnal inkubáltuk. Fluoreszcencia (A, B) és fáziskontraszt (C, D) mikroszkópiás felvételek.

13. ábra: A fotokémiai kezelés hatása a gelonin, THX és HCT-116 sejtekre gyakorolt toxicitására. Az „először fény” stratégiában, a sejteket először 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{22} -val 18 órán át, ezt követően pedig 4 órán át AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban inkubáltuk, majd az ábrán jelzettek szerint fényhatásnak tettük ki. A megvilágítás után a sejtekhez 1 $\mu\text{g/ml}$ gelonint adtunk, és 18 órán át inkubáltuk. A „fény utána” stratégiában, a sejteket 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{22} -val és 1 $\mu\text{g/ml}$ geloninnal 18 órán át ko-inkubáltuk, majd az ábrán jelzettek szerint fényhatásnak tettük ki. A kontrol sejteket csak 1 $\mu\text{g/ml}$ geloninnal kezeltük 18 órán át, majd fényel sugároztuk be; vagy csak 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{22} -val kezeltük 18 órán át, azután 4 órán át inkubáltuk AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban és besugároztuk. A fehérjékbe történő [^3H]-leucin beépülését a fényexpozíció után egy nappal mértük, és a relatív fehérjeszintézis jelzőjeként alkalmaztuk. Az adatpontok háromszoros ismétlés középértékének $\pm$ standard hiba (S.E.) felelnek meg.

14. ábra: A fotokémiai kezelés hatása a β -galaktozidáz expressziójára AdHCMV-lacZ-vel fertőzött sejtek esetében. Az „először fény” stratégiában, az AlPcS_{22} -val előkezelt sejteket 4 órán át AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban inkubáltuk, majd 3 percig fényhatásnak tettük ki. A megvilágítás után a sejteket AdHCMV-lacZ-vel fertőztük (1 MOI) 30 percig, 37°C-on. Ezután, a keverékhez 2 ml tápoldatot adtunk és a sejteket két napig inkubáltuk, majd β -galaktozidáz expressziójára nézve analizáltuk. A „fény utána” stratégiában, AlPcS_{22} -val kezelt sejteket 3 órán át AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban inkubáltuk, majd 30 percig AdHCMV-lacZ-vel fertőztük. Ezután, a keverékhez 2 ml tápoldatot adtunk és a sejteket 30 percig inkubáltuk, majd 3 percig fényhatásnak tettük ki. Végül a sejteket két napig inkubáltuk, majd β -galaktozidáz expressziójára nézve analizáltuk.

15. ábra: Az inkubációs idő hatása a THX és HCT-116 sejtek pEGFP-N1 polilizin-kompleksszel történt, fényel indukált transzfekciójának hatékonyságára. AlPcS_{22} -val kezelt THX és HCT-116 sejteket 4 órán át AlPcS_{22} -tól mentes tápoldatban inkubáltuk, majd 3 vagy 7m percig, megfelelően, fényhatásnak tettük ki. A megvilágítás után, a sejtekhez pEGFP-N1 polilizin-komplext (5 $\mu\text{g/ml}$ plazmid) adtunk, és a sejteket az ábrán jelzett különböző hosszúságú ideig inkubáltuk. A komplex eltávolítása után, a sejtekhez komplextől mentes tápoldatot adtunk, és az EGFP expresszió analízise előtt 2 napig inkubáltuk.

16. ábra: A TPPS₂₂ fotoszenzitizer alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a THX sejtek, polilizin által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása az utána fényt stratégiával összehasonlítva, különböző besugárzási idők mellett. PLL-L: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása után; L-PLL: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása előtt; Üres oszlopok: nincs fény, árnyékolt oszlopok: 70 másodperc besugárzás, kitöltött oszlopok: 100 másodperc besugárzás.

17. ábra: A TPPS₄ fotoszenzitizer alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a THX sejtek, polilizin által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása az utána fényt stratégiával összehasonlítva, különböző besugárzási idők mellett. PLL-L: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása után; L-PLL: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása előtt; Üres oszlopok: nincs fény, vízszintesen sávozott oszlopok: 50

másodperc besugárzás, függőlegesen sávozott oszlopok: 50 másodperces besugárzás, kitöltött oszlopok: 100 másodperc besugárzás.

18. ábra: A TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a HCT-116 sejtek, polilizin által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása az utána fényt stratégiával összehasonlítva, különböző besugárzási idők mellett. PLL-L: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása után; L-PLL: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása előtt; Üres oszlopok: nincs fény, árnyékolt oszlopok: 70 másodperc besugárzás, kitöltött oszlopok: 100 másodperc besugárzás.

19. ábra: A TPPS₄ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a HCT-116 sejtek, polilizin által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása az utána fényt stratégiával összehasonlítva. PLL-L: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása után; L-PLL: besugárzás a pEGFP-N1/PLL-komplex hozzáadása előtt; Üres oszlopok: nincs fény, vízszintesen sávozott oszlopok: 1,5 perc besugárzás, függőlegesen sávozott oszlopok: 2 perces besugárzás, kitöltött oszlopok: 3 perc besugárzás.

20. ábra: A TPPS₄ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a DOTAP által közvetített transzfekcióra gyakorolt hatása összehasonlítva az utána fényt stratégiával, különböző besugárzási idők mellett. DOTAP-L: besugárzás a pEGFP-N1/DOTAP-komplex hozzáadása után; L-DOTAP: besugárzás a pEGFP-N1/DOTAP-komplex hozzáadása előtt; Üres oszlopok: nincs fény, árnyékolt oszlopok: 70 másodperc besugárzás, kitöltött oszlopok: 100 másodperc besugárzás.

21. ábra: A TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a HCT-116 sejtek, SuperFect® által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása, különböző besugárzási és transzfekciós idők mellett, változtatva a transzfekcióban alkalmazott DNS mennyiségét. ■ 1 órás transzfekció 0,75 µg DNS-sel, ▲ 4 órás transzfekció 0,75 µg DNS-sel, ● 1 órás transzfekció 1,5 µg DNS-sel.

22. ábra: A TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a HCT-116 sejtek, adenovírus által közvetített géntranszdukciójára gyakorolt hatása, ahol a vírus különböző időpontokban adtuk a sejtekhez. A sejtekhez különböző időpontokban hozzáadott vírus közreműködésével transzdukált sejtek arányát a példákban leírt áramlási citometriával analizáltuk. A vírus sejtekhez történt hozzáadásának időpontjait az ábrán feltüntetettük. Az Y tengely bal oldalán lévő időpontok a vírusoknak a besugárzás előtt történt hozzáadásának időpontjait, míg a jobb oldalon lévő időpontok a besugárzás utáni időket jelzik. ■ 1 perces besugárzás, □ nincs besugározva.

23. ábra: A TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a HCT-116 sejtek, poli-D-lizin által közvetített transzfekciójára gyakorolt hatása, különböző besugárzási idők mellett.

24. ábra: A TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett először fényt PCI-stratégiának a bleomicin citosztatikus ágens általi sejtpusztításra gyakorolt hatása, ahol a kísérletben változtattuk a bleomicin mennyiségét, a besugárzási és transzfekciós időket. ◇ - 5 TPPS_{2a}-, 1 h = 5 µM bleomicin, TPPS_{2a} nélkül, 1 h inkubálás; ◆ - 5 TPPS_{2a}+, 1 h = 5 µM bleomicin, TPPS_{2a} alkalmazásával, 1 h inkubálás; △ - 25 TPPS_{2a}-, 1 h = 25 µM bleomicin, TPPS_{2a} nélkül, 1 h inkubálás; ▲ - 25 TPPS_{2a}+, 1 h = 25 µM bleomicin, TPPS_{2a} alkalmazásával, 1 h inkubálás; □ - 100 TPPS_{2a}-, 1 h = 100 µM bleomicin, TPPS_{2a} nélkül, 1 h inkubálás; ■ - 100 TPPS_{2a}+, 1 h = 100 µM bleomicin, TPPS_{2a} alkalmazásával, 1 h inkubálás; ○ - 100 TPPS_{2a}-, 4 h = 100 µM bleomicin, TPPS_{2a} nélkül, 4 h inkubálás; ● - 100 TPPS_{2a}+, 4 h = 25 µM bleomicin, TPPS_{2a} alkalmazásával, 4 h inkubálás.

25. ábra: A geloninnal végzett PCI, daganatkezelésre gyakorolt hatása *in vivo* egérmodellel. A kezelt csoportok az alábbiak voltak: (△) csak gelonin; (■) foszfáttal puffertelt sóoldat (PBS) placebo és megvilágítás

kombinációjával végzett kezelés; (◇) csak fotokémiai kezelés (azaz, AlPcS_{2a} + fény), de gelonin nélkül; (●) Teljes PCI kezelés geloninnal (azaz, AlPcS_{2a} + gelonin + fény).

PÉLDÁK

Anyagok és eljárások

5

Sejtvonalak

Az emberi melanómából származó THX sejtvonalat a Norwegian Radium Hospital-ban, áttétes rosszindulatú melanómával kezelt páciensből vett daganatszövetből állítottuk elő [Aamdal és mtsai., Int. J. Cancer 37, 579 (1986)] és 10% FCS-t (Gibco BRL) és 2 mM glutamint (Gibco BRL) tartalmazó RPMI tápoldatban (Gibco BRL) tenyésztettük. Emberi vastagbél-karcinómából származó HCT-116 sejteket (ATCC katalógusszáma: 10 CCL-247) az American Type Culture Collection-tól szereztünk be, és 10% újszülött borjúeredetű szérumot, 100 NE/ml penicillint, 100 µg/ml sztreptomocint és 2 mM glutamint tartalmazó RPMI tápoldatban (mindegyik a Gibco BRL-től, Paisley, UK) tenyésztettük.

Besugárzás

15 A sejtek kezelésére két különböző, 4 fluoreszcens fénycsőből álló fényforrást alkalmaztunk. A TPPS₄, TPPS_{2a}, és 3-THPP (Porphyrin Products, Logan, UT) fotoszenzitizerekkel kezelt sejteket kék fényvel (mod. 3026, Applied Photophysics, London, UK, a sejteket ért fényintenzitás 1,5 mW/cm² volt), míg az AlPcS_{2a} -val kezelteteket vörös fényvel (Phillips TL 20 W/09, Cinemoid 35 szűrőn átszűrve, a sejteket ért fényintenzitás 1,35 mW/m² volt) sugároztuk be.

Fluoreszcens mikroszkópia

20 A sejteket fluoreszcens mikroszkópiával analizáltuk az irodalomban leírtak szerint [Berg és mtsai., Biochem. Biophys. Acta 1370, 317-324 (1998)]. Floreszceinnel jelzett molekulák analizésére a mikroszkópot 450-490 nm excitációs szűrővel, 510 nm dikroikus sugárosztó és 510-540 nm sávot áteresztő emissziós szűrővel szereltük fel.

Plazmid-pLys komplexek előállítása és sejtek kezelése

25 Plazmid-pLys komplexeket (1,7 töltési arány) [lásd Berg és mtsai., Cancer Res. 59, 1180-1183 (1999)] 75 µl HBS-ben oldott 5 µg plazmidot (pEGFP-N1) (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) óvatosan összekevertünk 75 µl HBS-ben oldott 5,3 µg pLys-sel (MW 20700, Sigma, St. Louis, MO). Az oldatot 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, tápoldattal hígítottuk és a sejtekhez adtuk.

30 THX sejteket 20 µg AlPcS_{2a} -val inkubáltunk 18 órán át 37°C-on, majd mostuk és fotoszenzitizert nem tartalmazó tápoldatban 3 órán át, azután pedig plazmid-pLys komplexszel 1 órán át inkubáltuk végül fényvel besugároztuk. Esetleg, az AlPcS_{2a} -val végzett kezelés után a sejteket fotoszenzitizert nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, fényvel besugároztuk, majd plazmid-pLys komplexszel 1 órán át inkubáltuk. A sejteket két napig inkubáltuk és GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk.

35 HCT-116 sejteket 20 µg AlPcS_{2a} -val inkubáltunk 18 órán át, majd mostuk és AlPcS_{2a} -t nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, azután fényvel besugároztuk. A fényvel történő besugárzás előtt vagy után közvetlenül, a sejteket pEGFP-N1-polilizin komplexszel kezeltük 4 órán át. A sejteket két napig inkubáltuk és GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk.

Áramlási citometriás analízis

40 A sejteket tripszinezttük, centrifugáltuk, 400 µl tápoldatban felfuszpendáltuk, 50 mm lyukbőségű nylon-szűrőn át szűrtük és FACS-Calibur áramlási citométerben (Becton Dickinson) analizáltuk. Minden egyes mintá-

ra 10000 eseményt gyűjtöttünk. Fluoreszcein-fluoreszcenciát (például zöld fluoreszkáló fehérjét (GFP)) mértünk 510-530 nm filteren át, argon lézerrel (200 mW, 488 nm) végzett excitációt követően. Dióda lézerrel (50 mW, 635 nm) végzett excitációt követően az AlPcS_{2a}-t 670 nm longpass szűrőn át mértük. A dupla sejteket és az elpusztult sejteket az egyedülálló életképes sejtektől „kapuzásos” eljárással különböztettük meg. Az adatokat CELLQuest szoftverrel (Becton Dickinson) analizáltuk.

1. példa

Fénydózistól függő, fénnel indukált transzfekció

THX sejteket kezeltünk 20 µg AlPcS_{2a} fotoszenzitizerrel 18 órán át, majd mostuk és fotoszenzitizerrel nem tartalmazó tápoldatban 3 órán át, azután pedig 5 µg pEGFP-N1/polilizin komplexszel 1 órán át inkubáltuk végül fénnel 1, 2, 3 vagy 4 percig besugároztuk. Esetleg, az AlPcS_{2a}-val végzett kezelés után a sejteket fotoszenzitizerrel nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, fénnel 1, 2, 3 vagy 4 percig besugároztuk, majd pEGFP-N1/polilizin komplexszel 1 órán át inkubáltuk (lásd 1. ábra). A sejteket 48 órán át inkubáltuk és GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk. pEGFP-N1/polilizin komplex töltési aránya 1,7 volt.

Az 1. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a GFP transzfekciójának hatékonysága megegyezett akár a besugárzás előtt, akár pedig a besugárzás után adtuk a plazmid-pLys komplexet (azaz a pEGFP-N1/polilizin komplexet) a sejtekhez. Ugyancsak látható, hogy mindkét kezelés esetében, a transzfektált sejtek aránya függ a fényexpozíció idejétől (a maximális értéket körülbelül 2 percnél értük el, onnan az arány csökkent).

2. példa

A GFP expresszálása HCT-116 sejtekben

HCT-116 sejteket inkubáltunk először 20 µg AlPcS_{2a}-val 18 órán át, majd AlPcS_{2a}-t nem tartalmazó tápoldatban 3 órán át, azután fénnel besugároztuk. A besugárzás után a sejteket pEGFP-N1/polilizin komplexszel kezeltük 4 órán át, majd közvetlenül a kezelés előtt vagy után a 2. ábrán jelzettek szerint fénnel besugároztuk. A GFP expresszióját áramlási citometriával mértük a besugárzás után 2 nappal.

A 2. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a GFP transzfekciójának hatékonysága – akárcsak az 1. ábrán bemutatott THX sejtek esetében - megegyezett akár a besugárzás előtt, akár pedig a besugárzás után adtuk a plazmid-pLys komplexet (azaz a pEGFP-N1/polilizin komplexet) a sejtekhez. Akárcsak az 1. példában a transzfektált sejtek aránya itt is a fényexpozíció idejétől függött.

3. példa

A gelonin, fotokémiai kezelés előtti és utáni hozzáadásának szinergista hatása

A gelonin olyan növényi eredetű toxin, amely ha a sejtek citoszoljában jelen van, akkor hatékony gátolja a fehérjeszintézist. THX sejteket inkubáltunk 20 µg AlPcS_{2a}-val 18 órán át, majd fotoszenzitizerrel nem tartalmazó tápoldatban 3 órán át, azután fénnel besugároztuk. Közvetlenül a fényexpozíció után a sejteket a tápoldathoz adotti 20 µg AlPcS_{2a}-val és 1 µg/ml geloninnal együtt, vagy csak 1 µg/ml geloninnal kezeltük 18 órán át, azután a sejteket a tápoldatból eltávolítottuk (lásd 3. ábra). Fehérjeszintézist mértünk a fénykezelés után 24 órával.

A 3. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy bár a gelonin hiányában végzett fotokémiai kezelés eredményeként a fehérjeszintézis kismértékben csökkent, a fotokémiai kezelés előtt vagy után a gelonin jelenléte jelentősen nagyobb mértékű gátlást indukált a fehérjeszintézisben. Ezen adat mutatja, hogy a gelonin internalizálódott a sejtekbe, függetlenül attól, hogy a fotokémiai kezelés előtt vagy után érintkeztettük a sejtekkel.

4. példa

Az időkésleltetés hatása a fény által indukált transzfekecióra

THX sejteket inkubáltunk 20 μg AlPcS_{20} -val 18 órán át, majd fotoszenzítizálót nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át, azután fénnel 3 percig besugároztuk. A besugárzás után a sejteket a 4. ábrán feltüntetett ideig inkubáltuk, majd pEGFP-N1/polilizin komplexszel (töltési arány 1,7) 1 órán át kezeltük. A sejteket a fénybesugárzás után 48 órával GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk.

A 4. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a legjobb eredmény eléréséhez az internalizálni kívánt molekulát viszonylag röviddel a fotokémiai kezelés után kell a sejteknek kitenni, mivel a pEGFP-N1-el végzett transzfekeció féléletideje lecsökken a fényexpozíció után körülbelül 5 órával.

5. példa

A transzfekeció hatékonysága a megvilágításhoz viszonyított transzfekeciós impulzus függvényében

THX sejteket 20 μg AlPcS_{20} -val 18 órán át, majd fotoszenzítizálót nem tartalmazó tápoldatban inkubáltunk. A sejteket pEGFP-N1/polilizin komplexszel adott impulzussal (0,5 vagy 1 óra, az 5. ábrán megadott oszlopok szélessége a kezelés kezdetét és befejezését jelzik) kezeltük a 3 perces fényexpozíció előtt (negatív abszcissaértékek) vagy után (pozitív abszcissaértékek). A sejteket a fénybesugárzás után 48 órával GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk. Több kísérletből származó eredményeket normalizáltunk úgy, hogy 100%-nak vettük a transzfekeciónak a fényexpozíció előtt vagy után közvetlenül kapott hatékonyságát.

Az 5. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a legjobb transzfekeciós eredményhez a sejteket az internalizálni kívánt molekulának röviddel a fényexpozíció előtt vagy után kell kitenni.

6. példa

Fénnyel indukált transzfekeció függése a pEGFP-N1/polilizin komplexszel végzett inkubálás időtartamától

THX sejteket kezeltünk 20 μg AlPcS_{20} fotoszenzítizálással 18 órán át, azután szenzítizálót nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, majd fénnel besugároztuk és pEGFP-N1/polilizin komplexszel (töltési arány 1,7) egészen 6 órán át inkubáltuk (lásd 6A. ábra). A sejteket a fénybesugárzás után 48 órával GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk. A GFP-t expresszáló sejtek kezeléseek utáni számát a 6B. ábrán, a különböző kezeléseek specifikitását pedig a 6C. ábrán mutatjuk be.

A 6. ábrán bemutatott eredmények szerint, bár a pEGFP-N1/polilizin komplexszel végzett inkubálási idő növekedésével párhuzamosan nő a transzfekektált sejtek száma (6B. ábra), a legmagasabb specifikitású transzfekeció a legrövidebb inkubálási időknél tapasztalható (6C. ábra).

7. példa

pEGFP-N1/polilizin komplexszel, 0°C-on végzett kezelés

Ezt a kísérletet annak tesztelésére terveztük, hogy vajon a fotokémiai kezelés a sejtmembránok kismértékű károsodásához vezet-e, ezáltal a sejtekkel a fénykezelést követően érintkeztetett plazmid keresztülszivároghat-e a plazmamembránon. THX sejteket kezeltünk 20 μg AlPcS_{20} -val 18 órán át, azután szenzítizálót nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, majd fénnel besugároztuk és közvetlenül ezután pEGFP-N1/polilizin komplexszel (töltési arány 1,7) egészen 45 percen át, 0°C-on inkubáltuk. A sejteket vagy (A) tripszinnel kezeltük, átoltottuk, majd 37°C-ra transzferáltuk, vagy (B) tripszinizálás nélkül transzferáltuk 37°C-ra. A sejteket fénnel besugároztuk a 8. ábrán jelzetteknek megfelelően. A sejteket a fénybesugárzás után 48 órával GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk.

Miután a sejteket pEGFP-N1/polilizin komplexszel 45 percig 0°C-on inkubáltuk, a komplex a sejtfel-színhez rögzült, de a komplex endocitózisára nem került sor. A THX sejteket ezután vagy plazmidtól mentes tápoldatban inkubáltuk 37°C-on (8B. ábra), vagy pedig a plazmid, sejtfel-színről történő eltávolítására a sejteket tripszinnel kezeltük és 37°C-on új edényekbe oltottuk át. E kísérletek jelzik, hogy a plazmid/polilizin komplex nem szivárog át a plazmamembránon a fotokémiai kezelést követően.

8. példa

3-THPP és fénnel végzett kezelés kombinálása pEGFP-N1/polilizin komplexszel

THX sejteket kezeltünk 0,25 µg 3-THPP-val 18 órán át, azután szenzitizálót nem tartalmazó tápoldatban 4 órán át inkubáltuk, majd fénnel besugároztuk és ezután pEGFP-N1/polilizin komplexszel (töltési arány 1,7) 1 órán át inkubáltuk. A sejteket fényhatásnak tettük ki a 9. ábrán jelzettek szerint, majd a fénybesugárzás után 48 órával GFP-expresszióra nézve áramlási citometriával analizáltuk.

A 3-THPP olyan fotoszenzitizáló, amely elsősorban nem az endoszómákban vagy lizoszómákban lokalizálódik. A 9. ábrán bemutatott eredmények jelzik, hogy a fénybesugárzás előtti 3-THPP kezelésére a sejtekben csak kismértékben növekedett a GFP expressziója a megelőző példákhoz képest, amelyekben fotoszenzitizáló ágensként AlPcS₂₂-t alkalmaztunk. Ez jelzi, hogy az endoszómákban és lizoszómákban lokalizálódó foto-szenzitizáló ágens előnyös lehet.

9. példa

Fotoszenzitizáló és fénnel végzett előkezelés kombinációja lehetővé teszi a sejtek, kationos lipidekkel történő transzfekcióját

Egy nappal a kísérlet előtt, HCT-116 sejteket oltottunk át 75000 sejt/lyuk sűrűségben 12-lyukú lemezre. A sejteket AlPcS₂₂ fotoszenzitizálójával (20 µg/ml) 18 órán át, azt követően pedig fotoszenzitizálótól mentes tápoldatban 7 órás követő kezelés során („chase”) inkubáltuk, és 7 percre vörös fény hatásának tettük ki. A sejteket a pEGFP-N1 plazmid DOTAP-pal (Boehringer) képzett komplexével (5:1 DOTAP/plazmid, 1 µg pEGFP-N1) inkubáltuk 3 órán át, tápoldattal mostuk és 37°C-on inkubáltuk 21 órán át az EGFP expressziójának áramlási citometriával történő mérését (lásd anyagok és eljárások) megelőzően. A kontrol sejteket ugyan fény-hatásnak nem tettük ki, de a sejtek kezelése más különben az előzőekkel megegyezett.

A 10. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a PCI kezelés körülbelül négyszeresére fokozza a DOTAP/plazmid komplexszel végzett transzfekció hatékonyságát.

10. példa

PCI hatása a THX sejtek adenovirussal végzett transzdukciójára

Anyagok

Fluoreszein di-β-D-galaktopiranozidot (FCG) (katalógusszáma: F-1179) a Molecular Probes-től szereztünk be. Húsz mM-os törzsoldatot készítettünk oly módon, hogy a port DMSO és etanol 1:1 arányú keverékében oldottuk fel. A keveréket fokozatosan adtuk a megfelelő térfogatú vízhez úgy, hogy 8:1:1 H₂O/DMSO/etanol oldatot kapjunk.

Elkészítettük a rekombináns AdCA17lacZ vírust és emberi 293-as sejtvonalban (Ad E1-el transzformált, embrióveséből származó sejtvonal, amelyet 10% FCS-t, 10 NE/ml penicillint (Gibco BRL), 0,1 mg/ml sztreptomocint (Gibco BRL) és 2 mM glutamint tartalmazó MEM F-11 tápoldatban tartunk fenn) szaporítottuk.

Rekombináns vírus készítése

Az *E. coli*ből származó, emberi citomegalovírus promóterének szabályozása alatt álló LacZ gént kódoló AdHCMV-lacZ rekombináns adenovírust homológ rekombinációval, 293-as sejtekben alkalmazott pJM17 rendszerrel [Addison és mtsai., J. Gen. Virol. 78, 1653-1661 (1997)] állítottuk elő. Rekombináns vektorokat tisztítottuk plak-tisztítással, 293-as sejtekben magas titerig szaporítottuk és céziumklorid sávozással tisztítottuk [Hitt és mtsai., Methods Mol. Genet. 7, 13-30 (1995)].

Sejtek érzékenyítése

A THX sejteket ($4 \cdot 10^5$ sejt) 6 cm-es csészékbe transzferáltuk és 12 órán át szaporítottuk. Körülbelül 60%-os összefolyásnál a tápoldatot kicseréltük 2 ml, 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{24} -val kiegészített tápoldatra, és a csészéket tovább inkubáltuk 16-18 órán át. Az érzékenyített tartalmazó tápoldatot eltávolítottuk, és a sejteket közönséges tápoldatban, a fénykezelés és vírussal történő fertőzés előtt legalább 4 órán át tovább inkubáltuk.

Sejtek fertőzése

Három csészéről Tripszin-EDTA-val leválasztottuk a sejteket és a csészékben Bücher-kamrában végzett számolással kiszámítottuk az átlagos sejtszámot. Adenovírból hígításokat készítettünk 0,68 mM CaCl_2 és 0,5 mM MgCl_2 tartalmú PBS-ben a fertőzésre alkalmazásra kerülő sejtek számának megfelelően. Általában a sejteket 1-10 MOI (fertőzési multiplicitás) vírussal végeztük.

Mielőtt a vírust a sejtekhez adtuk volna, a sejteket vörös fénnel (Phillips TL 20 W/09, Cinemoid 35 szűrőn átszűrve, a sejteket ért fényintenzitás $13,5 \text{ mW/m}^2$ volt) 3 percig besugároztuk. Ezután a tápoldatot eltávolítottuk és 200 μl vírussuszpenziót (vagy 0,68 mM CaCl_2 és 0,5 mM MgCl_2 tartalmú PBS-t, vírussal nem kezelt kontrol) adtunk az egyes csészékhez. Harminc percig, 37°C -on végzett inkubálás után, a sejtekhez 5 ml közönséges tápoldatot adtunk és a sejteket 48 órán át szaporítottuk.

β -galaktozidáz vizsgálata

A sejteket tripszin-EDTA-val leválasztottuk és 5 ml tápoldatban felfuszpendáltuk. Öt perces centrifugálás (1000 rpm) után, a tápoldatot eltávolítottuk, a sejttöledéket 50 μl tápoldatban felfuszpendáltuk és a csöveket 5 percre 37°C -os vízfürdőbe helyeztük. Ezt követően, a sejtekhez 50 μl , 37°C -ra előmelegített, 2 mM-os FDG-oldatot adtunk és a csöveket visszatettük a vízfürdőbe 1 percre. Végül, a sejtekhez 900 μl tápoldatot adtunk és a csöveket 30-60 percig jégen inkubáltuk, majd a mintákat a fentiekben leírtak szerint, áramlási citometriával analizáltuk.

THX sejteket AlPcS_{24} -val (a 4. ábrán PS-sel jelölve) és adenovírral (a 4. ábrán „vírus”-nak jelölve) kezeltünk, az anyagok és eljárások című részben leírtak szerint 3 vagy 4 percig fénnel besugároztunk, és β -galaktozidáz (β -gal) aktivitásra nézve áramlási citometriával mértünk. A teljes β -gal aktivitást mennyiségileg úgy határoztuk meg, hogy a β -gal-ra pozitív sejtek és azok β -gal aktivitását integráltuk. A β -gal-ra pozitív sejtek száma és az átlagos β -gal aktivitás a PCI kezelés eredményeként megnőtt.

Az eredmények szerint, ha a THX sejteket a vírussal önmagában vagy a vírussal és fotoszenzitivizáló ágenssel együtt inkubáljuk, csak minimális fertőzés jelentkezik, azonban ha fotokémiai kezelést (azaz a fotoszenzitivizáló ágenszt fénnel sugározzuk be) is alkalmazunk, a sejtek transzdukcója jelentősen mértékben megnő (ahogyan azt a β -gal aktivitásban bekövetkezett növekedés mutatja).

11. példa

A fotokémiai kezelés hatása endocitózist jelző molekula intracelluláris lokalizációjára

THX sejteket oltottunk át Falcon 3001 csészékbe ($2,5 \cdot 10^4$ sejt/csésze), és a rákövetkező napon $20 \mu\text{g}$ AlPcS_{20} -val 18 órán át kezeltük. Az AlPcS_{20} mosással történt elválogatás után a sejteket AlPcS_{20} -tól mentes tápoldatban 4 órán át inkubáltuk. Ekkor a sejteket előbb 3 órán át, az endocitózist jelző FITC-dextrán markerrel (5 mg/ml) inkubáltuk, majd 4 percig fénnel besugároztuk. A nem megvilágított sejteket, a megvilágítás kivételével, hasonlóképpen kezeltük. A FITC-dextrán intracelluláris lokalizációját nem fixált sejtekben vizsgáltuk (Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóp (Oberkochen, Németország), 63-szoros nagyítású objektív, 450-490 nm tartományban áteresztő excitációs szűrő, és 510-540 nm tartományban áteresztő emissziós szűrő). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket hűtött, töltéscsatolású eszközzel (CCD) felszerelt kamerával rögzítettük.

Az eredmények (12. ábra) azt mutatják, hogy az endocitózist jelző FITC-dextrán marker hozzáadása előtt alkalmazott megvilágítással végzett PCI a marker endocitotikus vezikulumokban történő lokalizációját (a nem besugárzott sejteknél az „A” panelben látható pontok) a citoszol felé tolja el (a megvilágított sejteknek megfelelő „B” panelben látható diffúz fluoreszcencia). Így, ha a fényt az internalizálni kívánt makromolekula hozzáadása előtt alkalmazzuk, a makromolekula igen gyorsan a citoszolba transzlokálódik, lényegesen lecsökkentve ezzel a makromolekula lizoszómális lebontásának lehetőségét.

12. példa

Fotokémiai kezelések hatásai a gelonin, THX és HCT-116 sejtekre gyakorolt toxicitására

A gelonin olyan növényi eredetű toxin, amely ha a sejtek citoszoljában jelen van, akkor hatékony gátolja a fehérjeszintézist, de önmagában nem képes eljutni a citoszolba, és ezért intakt sejtekre nem nagyon toxikus. A geloninnal végzett kezeléshez 24-lyukú lemez (Nunc, Dánia) lyukaiba lyukanként $25 \cdot 10^3$ sejtet oltottunk át. A következő napon a tápoldathoz $20 \mu\text{g}$ AlPcS_{20} -t adtunk, és a sejteket 18 órán át, 37°C -on inkubáltuk. Az AlPcS_{20} hozzáadását követő összes lépést tompított fényben végeztük. Az „először fény” stratégia esetében, a sejtekből az AlPcS_{20} -t mosással eltávolítottuk, és a sejteket AlPcS_{20} -tól mentes tápoldatban inkubáltuk 4 órán át. Ekkor a sejteket (az ábrán jelzettek szerint) besugároztuk, majd 18 órán át $1 \mu\text{g/ml}$ geloninnal kezeltük. Az „utána fény” stratégiában, a sejteket $20 \mu\text{g}$ AlPcS_{20} -val és $1 \mu\text{g/ml}$ geloninnal ko-inkubáltuk 18 órán át, és az ábrán jelzettek szerinti fényexpozíció előtt, a sejteket mostuk.

A nem megvilágított sejteket – a megvilágítástól eltekintve – hasonlóan kezeltük. A kezelt sejteket tápoldattal egyszer mostuk, majd friss tápoldat hozzáadása után a további analízisig 37°C -on inkubáltuk. A fehérjeszintézis gátlását [^3H]-leucin, fehérjébe történő beépülésével vizsgáltuk. A megvilágításhoz 4 fluoreszcens fénycsőből álló fényforrást (Phillips TL 20W/09) és 550-600 nm sáv tartományban áteresztő, „hosszú tartományban áteresztő” szűrőt alkalmaztunk. A sejteket ért fényintenzitás $13,5 \text{ W/m}^2$ volt.

A példa bemutatja, hogy mind a THX (13A. ábra) és mind pedig a HCT-116 sejtek (13B. ábra) esetében az „előtte fény” stratégia jobban működik az „utána fény” stratégiánál. Így, a THX sejteknél alkalmazott legmagasabb fény dózisonál, az „előtte fény” stratégia esetében a fehérjeszintézis gátlása háromszor hatékonyabb volt, mint az „utána fény” stratégiánál. Színién látszik az, hogy mindkét sejtvonalban a geloninnak önmagában, PCI kezelés nélkül, nem volt toxikus hatása. Ez igazolja a toxin hatásainak indukálásban, fotokémiai kezeléssel elérhető mértéket és specifikusságot.

13. példa

Adenovírus által közvetített géntranszdukció fotokémiai serkentése

Lyukanként $5 \cdot 10^4$ THX sejtet 6-lyukú lemezekre transzferáltunk. A rákövetkező napon a sejtekhez 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{24} -t adtunk, és a sejteket 18 órán át, 37°C -on inkubáltuk. Az AlPcS_{24} hozzáadását követő lépéseket tompított fénynél végeztük. Az „először fény” stratégiánál, a sejtekből AlPcS_{24} -t mosással eltávolítottuk, és AlPcS_{24} -tól mentes tápoldatban 4 órán át inkubáltuk. Ezután a sejteket 3 percre megvilágítottuk, majd 1 MOI (fertőzési multiplicitási) mennyiségű AdHCMV-lacZ adenovírus-vektorral (amelyet a 10. példában AdCA17lacZ-nek is nevezünk) 30 percig kezeltük. E vektor tartalmazza az áramlási citometriával analizálható (lásd alább) β -galaktozidáz kódoló riportergént.

A „fény utána” stratégiánál, AlPcS_{24} -vel kezelt, majd mosott sejteket először adenovírussal kezeltük a fentiekben megadott ideig és koncentrációval, mostuk, és friss tápoldat hozzáadása után fénnyel besugároztuk. A nem megvilágított sejteket, a megvilágítás kivételével, azonos módon kezeltük.

A kezelt sejteket tápoldattal egyszer mostuk, majd a friss tápoldat hozzáadása után, a további analízist megelőzően 37°C -on inkubáltuk. A β -galaktozidáz expresszióját, a fénykezelés után 2 nappal, áramlási citometriával mértünk. A vírus (amelyet vagy AdHCMV-lacZ-nek vagy AdCA17lacZ-nek nevezünk) elkészítésére szolgáló eljárást, a sejtek kezelését, megvilágítást és a β -galaktozidáz expressziójának analízisét részletesen leírtuk a 10. példában.

Az eredmények (14. ábra) azt mutatják, hogy a kísérlet körülményei között az „először fény” stratégia alkalmazásával végzett fotokémiai kezelés (az 14. ábra jobb felén lévő oszlopok) a β -galaktozidáz expresszáló sejtek számát hatszorosára – 2,5%-ról 15%-ra – növelte. Az is látható, hogy az „először fény” eljárás hatása csaknem azonos volt a „fény utána” eljárás (az 14. ábra bal felén lévő oszlopok) hatékonyságával.

14. példa

A inkubációs idő hatása a fénnel indukált transzfekció hatékonyságára

Lyukanként $5 \cdot 10^4$ THX sejtet 6-lyukú, vagy $7,5 \cdot 10^4$ HCT-116 sejtet 12-lyukú lemezekre transzferáltunk. A rákövetkező napon a sejtekhez 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{24} -t adtunk, és a sejteket 18 órán át, 37°C -on inkubáltuk. Az AlPcS_{24} hozzáadását követő lépéseket tompított fénynél végeztük. A sejtekből AlPcS_{24} -t mosással eltávolítottuk, és AlPcS_{24} -tól mentes tápoldatban 4 órán át inkubáltuk. Ezután a sejteket 3 percre (THX sejtek) vagy 7 percre (HCT-116 sejtek) megvilágítottuk, majd pEGFP-N1/polilizin (5 $\mu\text{g/ml}$ pEGFP-N1) komplexet adtunk hozzájuk a 15. ábrán jelzett időtartamokig. A kontrol sejteket ugyan fényhatásnak nem tettük ki, de a sejtek kezelése máskülönben az előzőekkel megegyezett. A kezelt sejteket tápoldattal egyszer mostuk, majd friss tápoldat hozzáadása után az EGFP expressziójának áramlási citometriával végzett analíziséig (lásd anyagok és eljárások) 37°C -on inkubáltuk. A megvilágításhoz 4 fénycsőből álló fényforrást (Phillips TL 20W/09) és 550-600 nm tartományban áteresztő, „hosszú tartományban áteresztő” szűrőt alkalmaztunk. A sejteket ért fényintenzitás $13,5 \text{ W/m}^2$ volt. A pEGFP-N1/polilizin komplexet (töltési arány: 1,7) külön-külön előállított plazmid és polilizin oldatok óvatos összekeverésével készítettük: 5 μg pEGFP-N1 plazmidot 75 μl vízben feloldottunk és 5,3 μg polilizint is feloldottunk 75 μl vízben. A két oldatot összekevertük és 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, tápoldattal 1 ml-re hígítottuk, és a sejtekhez adtuk.

Az eredmények (15. ábra) azt mutatják, hogy a THX sejtek és a HCT-116 sejtek, DNS/polilizin komplexekkel történő transzfekcióját az „előtte fény” fotokémiai kezeléssel erősen lehet indukálni. Látható, hogy a transzfekciót a DNS-sel már rövid (legalább minimum 30 perces) inkubálással hatékonyan lehet serkenteni. Az

inkubációs idő növelésével nő a fény által indukált transzfekció, azonban úgy látszik, hogy a DNS-sel végzett, körülbelül 2 órás inkubálás után a transzfekció szintje lecsökken.

15. példa

TPPS₂₀ fotoszenzitizeráló alkalmazásával végzett „először fény” stratégia hatása a THX sejtek, poli-L-lizin által közvetített transzfekciójára.

Tetrafenolperfin diszulfonátot (TPPS₂₀) (katalógusszám: #04197) a Porphyrin Products (USA, UT) cégtől szereztünk be. A TPPS₂₀-t DMSO-ban oldottuk fel.

A pEGFP-N1 plazmidot a Clontech Laboratories Inc.-től (CA, USA, katalógusszám: 6085-1) kaptuk. Az alkalmazott tételt (katalógusszám: #EGFP-N1-1002) az ELIM Pharmaceuticals, Inc. (CA, USA) állította elő és steril vízben oldva, 5 mg/ml koncentrációban szállította. Ebből steril TE-pufferrel (pH 7,4, 1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 0,5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk és -20°C-on tároltuk.

Az emberi melanómából származó THX sejteket 10% újszülött borjúeredetű szérumot, penicillint/sztreptomcint és glutamint tartalmazó RPMI tápoldatban tenyésztettük. Tompított fényben, a tápoldatot eltávolítottuk és a sejtekhez 2 µg/ml TPPS₂₀-t tartalmazó tápoldatot adtunk. A sejteket (fénytől védve) 37°C-on 18 órán át inkubáltuk. A sejteket tápoldattal háromszor mostuk, és a PLL-L („utána fény”) mintákhoz 1 ml, pEGFP-N1/poli-L-lizin komplexet tartalmazó tápoldatot adtunk. A komplex 5 µg pEGFP-N1-et tartalmazott és a poli-L-lizin (PLL) – DNS töltési arány 1,7 volt. További 4 órás, 37°C-on, sötétben végzett inkubálás után a tápoldatot eltávolítottuk, és a sejteket tápoldattal egyszer mostuk. A sejtekhez 1 ml tápoldatot adtunk és a sejteket kék fényel besugároztuk a 16. ábrán jelzettek, és az anyagok és eljárások című részben leírtak szerint. Az L-PLL („először fény”) minták esetében, az első 4 órás inkubálás pEGFP-N1/PLL komplex nélküli tápoldatban történt, a komplexet közvetlenül a megvilágítás után adtuk a sejtekhez, majd további 4 órás inkubálás után eltávolítottuk. A sejteket 2 napig inkubáltuk (még mindig fénytől védve), azután áramlási citometriával EGFP expresszióra nézve analizáltuk. Ehhez az analízishez a sejteket tripszinezttük (Tripszin-EDTA, Sigma, MO, USA), 400 µl RPMI tápoldatban felfuszpendáltuk, 50 mm lyukbőségű nyolcszűrőn át szűrtük és FACS-Calibur áramlási citométerben (Becton Dickinson) analizáltuk. Az EGFP-t 510-540 nm filteren át, 488 nm-en végzett excitációt követően mértük. Az elpusztult sejteket az életképesektől propidium joddal (1 µg/ml), az egyedülálló sejteket a kettős sejtektől pedig impulzus eljárással különböztettük meg. Minden egyes mintára 10000 eseményt gyűjtöttünk és az adatokat CELLQuest szoftverrel (Becton Dickinson) analizáltuk.

Eredmények

Ahogy a 16. ábrán, a THX sejtek, poli-L-lizinnel közvetített transzfekciójának esetében látszik, a transzfermolekula besugárzás utáni („először fény”) hozzáadásán alapuló megközelítés, akárcsak az „utána fény” megközelítés működik, amikor fotoszenzitizerként TPPS₂₀-t alkalmazunk.

16. példa

TPPS₄ fotoszenzitizeráló alkalmazásával végzett „először fény” stratégia hatása a THX sejtek, poli-L-lizin által közvetített transzfekciójára.

THX sejteket szaporítottunk és kezeltünk a 15. példában leírtak szerint, azzal a különbséggel, hogy a TPPS₂₀ helyett TPPS₄ fotoszenzitizert (75 µg/ml) alkalmaztunk.

Eredmények

A 17. ábrából világosan kitűnik, hogy a THX sejtek, poli-L-lizinnel közvetített transzfekciójának esetében, ha fotoszenzitivizálóként TPPS₄-et alkalmazunk, az „először fény” megközelítés kissé jobban működik, mint az „utána fény” megközelítés, de mindkét eljárással sikerült transzfekciót elérnünk.

5 **17. példa**

TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” stratégia hatása a HCT-116 sejtek, poli-L-lizin által közvetített transzfekciójára.

HCT-116 sejteket szaporítottunk és kezeltünk a 15. példában leírtak szerint.

Eredmények

10 A 18. ábrán látszik, hogy a HCT-116 sejtek, poli-L-lizinnel közvetített transzfekciójának esetében, az „először fény” megközelítés, akárcsak az „utána fény” megközelítés egyaránt működik, amikor fotoszenzitivizálóként TPPS_{2a}-t alkalmazunk.

18. példa

15 TPPS₄ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” stratégia hatása a HCT-116 sejtek, poli-L-lizin által közvetített transzfekciójára.

HCT-116 sejteket szaporítottunk és kezeltünk a 15. példában leírtak szerint, azzal a különbséggel, hogy a TPPS_{2a} helyett TPPS₄ fotoszenzitivizálót (75 µg/ml) alkalmaztunk.

Eredmények

20 A 17. ábrából világosan kitűnik, hogy a HCT-116 sejtek, poli-L-lizinnel közvetített transzfekciójának esetében, ha fotoszenzitivizálóként TPPS₄-et alkalmazunk, az „először fény” megközelítés és az „utána fény” megközelítés egyaránt működik.

19. példa

TPPS₄ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” PCI stratégia hatása a DOTAP által közvetített transzfekciójára.

25 HCT-116 sejteket 10% újszülött borjúeredetű szérumot, penicillint/sztreptomicint és glutamint tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük. Tömpítotti fényben, a tápoldatot eltávolítottuk és a sejtekhez 75 µg/ml TPPS₄-et tartalmazó tápoldatot adtunk. A sejteket (fénytől védve) 37°C-on, 18 órán át inkubáltuk. A sejteket tápoldattal háromszor mostuk, és a DOTAP-L („utána fény”) mintákhoz 1 ml, 1 µg pEGFP-N1 és 5 µg DOTAP komplexét tartalmazó tápoldatot adtunk. További 4 órás, 37°C-on, sötétben végzett inkubálás után a tápoldatot eltávolítottuk, és a sejteket tápoldattal egyszer mostuk. A sejtekhez 1 ml tápoldatot adtunk és a sejteket kék fényel besugároztuk a 20. ábrán jelzettek, és az anyagok és eljárások című részben leírtak szerint. Az L-DOTAP („először fény”) minták esetében, az első 4 órás inkubálás pEGFP-N1/DOTAP komplex nélküli tápoldatban történt, a komplexet közvetlenül a megvilágítás után adtuk a sejtekhez, majd további 4 órás inkubálás után eltávolítottuk. A sejteket 1 napig inkubáltuk (még mindig fénytől védve), azután áramlási citometriával EGFP expresszióra nézve analizáltuk a 15. példában leírtak szerint.

Eredmények

30 A 20. ábrán megfigyelhető, hogy a HCT-116 sejtek, DOTAP kationos lipiddel közvetített transzfekciójánál, ha fotoszenzitivizálóként TPPS₄-et alkalmazunk, akkor az „előtte fény” megközelítés lényegesen jobban működik, mint az „utána fény” megközelítés. Az „előtte fény” megközelítés különösen előnyösnek tűnik a kationos lipidek által közvetített transzfekció esetében.

20. példa

TPPS₂ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” PCI stratégia hatása a THX sejtek SuperFect® által közvetített transzfekciójára.

A SuperFect®-et a Qiagen AG-től szereztük be.

Plazmid/ SuperFect® komplexek előállítása

Plazmid/ SuperFect® komplexeket az alábbiak szerint állítottunk elő:

(i) pEGFP-N1-et hígítottunk (szérum, fehérjék és antibiotikumok nélküli) RPMI 1640 tápoldatban. (ii) A plazmid oldatához SuperFect®-et adtunk (2 µl/µg DNS), és az egészet 10 mp-es vortexeléssel összekevertük. (iii) Az oldatot 10-20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a komplex kialakulásának lehetővé tétele céljából. (iv) A sejtek szaporítására alkalmazott (szérumot és antibiotikumokat tartalmazó) tápoldatból 400 µl-t adtunk a transzfekciós komplexeket tartalmazó csövekhez és a csövek tartalmát kétszeri fel-le pipetázással összekevertük, és a teljes mennyiséget azonnal a sejtekre transzferáltuk.

A sejtek kezelése

Tizenkétlyukú lemezek (Costar Corning, NY, USA) lyukaiba 75000-75000 sejtet transzferáltunk, és 6 órán át inkubáltuk. Ezekhez 1 ml, 0,7 µg/ml TPPS₂-t tartalmazó tápoldatot adtunk, és a sejteket 18 órán át (5% v/v CO₂, 37°C) inkubáltuk. A sejteket tápoldattal háromszor mostuk és szérumot tartalmazó tápoldatban további 4 órán át inkubáltuk (5% v/v CO₂, 37°C). A sejteket 4 fluoreszcens csővel (Osram 18 W/67), amelyek fluoreszcenciamaximuma 420 nm körül van, megvilágítottuk. A plazmid/SuperFect® komplexeket a fénykezelés után közvetlenül adtuk a sejtekhez, azután a sejteket a komplexekkel együtt inkubáltuk 1 vagy 4 órán át. A sejteket RPMI tápoldattal négyszer mostuk, és 1 ml tápoldat hozzáadása után 2 napig tovább inkubáltuk, azután áramlási citometriával EGFP expresszióra nézve analizáltuk a 15. példában leírtak szerint.

Eredmények

A 21. ábrán látható, hogy az összes vizsgált körülmény mellett, a PCI lényeges mértékben fokozta a SuperFect®-tel végzett transzfekciót. Például, 0,75 µg DNS és 1 óra transzfekciós idő esetében a transzfekció kilencszeres, 4 óra transzfekciós időnél pedig tízszeres növekedést tapasztaltunk.

21. példa

TPPS₂ fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” PCI stratégia hatása a THX sejtek adenovírus által közvetített transzfekciójára.

HCT-116 sejteket 10% FCS-t (újszülött borjúeredetű szérum), penicillint/sztreptomícint és glutamint tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük. Tompított fényben, a tápoldatot eltávolítottuk és minden egyes lyukba 1 µg/ml TPPS₂-t tartalmazó tápoldatot adtunk. A sejteket (fénytől védve) 37°C-on, 18 órán át inkubáltuk. A sejteket tápoldattal háromszor mostuk, majd Ad-HCMV-LacZ adenovirussal fertőztük különböző időpontokban a megvilágítás (ami mindig 4 órával a fotoszenzitivizáló eltávolítása után történt) előtt vagy után. A sejteket még 2 napig inkubáltuk (még mindig fénytől védve), a β-galaktozidáz aktivitásának áramlási citometriás analízise előtt (lásd 10. példa, anyagok és eljárások).

Eredmények

A 22. ábra mutatja be a fénykezelés hatásának időzítése és a vírus bevitel közötti viszonyt, a PCI, adenovírus által közvetített géntranszdukcióra gyakorolt hatása esetében. Látható, hogy az „előtte fény” megköze-

lítésben (az Y-tengely jobb oldalán) a PCI megvilágítás legalább 13 órán át hatékony, így a vírus beadható a megvilágítást követő legalább 13 órán át, anélkül, hogy a PCI elveszítené a transzdukcióna gyakorolt pozitív hatásait. Ez klinikai nézőpontból igen lényeges szempont, mivel a klinikai orvosnak nagy flexibilitást biztosít a páciens kezelésének megtervezésében és más kezelésekkel – például sebészi beavatkozásokkal - való koordinálásában.

5 **22. példa**

TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” PCI stratégia hatása a THX sejtek, poli-D-lizin által közvetített transzfekcióira.

HCT-116 sejteket szaporítottunk, kezeltünk és analizáltunk a 15. példában leírtak szerint, azzal a különbséggel, hogy a pEGFP-N1-el kialakításra kerülő komplexben poli-L-lizin helyett poli-D-lizint alkalmaztunk.

10 Eredmények

A 23. ábrából kitűnik, hogy az „először fény” recept poli-D-lizin transzfekciós ágenssel is működik.

23. példa

TPPS_{2a} fotoszenzitivizáló alkalmazásával végzett „először fény” PCI stratégia hatása a bleomicin citosztatikus ágenssel történő sejtipusztításra.

15 Tetrafenolporfirin diszulfonátot (TPPS_{2a}) (katalógusszám: #04197) a Porphyrin Products (USA, UT) cégtől szereztünk be. A TPPS_{2a}-t DMSO-ban oldottuk fel.

Kínai aranyhórcsóg tüdejéből származó V-79 fibroblaszt sejtvonalat alkalmaztunk ebben a kísérletben.

A MTT-t (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium bromid) a Sigma-tól (MO, USA; katalógusszám: M 2128) szereztük be, 5 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk PBS-sel, sterilre szűrtük és 4°C-on tároltuk.

20 Bleomicint (ASTA Medica) (15000 IE/KY) a Norwegian Radium Hospital gyógyszertárából be. Mennyiségileg 1 IE megfelel 1 mg bleomicinnek. A bleomicin port steril, 0,9% NaCl oldatban oldottuk fel, 2 mM végkoncentrációban.

Sejtenyésztése

25 A V-79 sejteket 10% újszülött borjúeredetű szérumot, 100 NE/ml penicillint, 100 µg/ml sztreptomocint és 2 mM glutamint tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban (mindegyik a Gibco BRL-től, Paisley, UK), 37°C-on, 5%-os CO₂-ben, párás környezetben tenyésztettük.

A sejtek kezelése

30 Tizenkétlyukú lemezek (Costar Corning, NY, USA) lyukaiba 75000-75000 sejtet transzferáltunk, és 6 órán át inkubáltuk. A lyukak közül néhányba 1 ml, 0,7 µg/ml TPPS_{2a}-t tartalmazó tápoldatot adtunk, és a sejteket 18 órán át (5% v/v CO₂, 37°C) inkubáltuk. A sejteket tápoldattal háromszor mostuk és szérumot tartalmazó tápoldatban további 4 órán át inkubáltuk. A tápoldatot eltávolítottuk, új tápoldatot mértünk be és a sejteket 4 fluoreszcens csővel (Osram 18 W/67), amelyek fluoreszcenciamaximuma körülbelül 420 nm, megvilágítottuk.

35 A besugárzás után közvetlenül különböző dózisokban bleomicint adtunk a sejtekhez. A bleomicinnel történt 1 vagy 4 órás inkubálás után, a sejteket RPMI tápoldattal egyszer mostuk, majd a sejtekhez 1 ml tápoldatot adtunk és 3 napig tartó inkubálás után az MTT vizsgálattal sejt-túlélést mértünk. Ez az eljárás azon alapul, hogy a vízoldékony tetrazólium-sót (MTT) az élő, metabolitikusan aktív sejtekben lévő mitokondriális dehidrogenázok bíborszínű, oldhatatlan formazánná redukálják. Egy milliliter, 0,25 µg MTT-t tartalmazó tápoldatot adtunk a sejtekhez, majd 4 órán át (37°C-on, 5%-os (v/v) CO₂) inkubáltuk. Az eredményül kapott formazánkristályokat lyukanként 200 µl izopropanolban (Sigma, MO, USA) feloldottuk. Az oldatot 96-lyukú

40

lemezre transzferáltuk és Multiskan EX mikrolemez leolvasóban (Labsystems, Finnország), 570 nm hullámhosszot áteresztő szűrő alkalmazásával mérést végeztünk. A sejt-túlélést a fénykezelést nem kapott kontrol sejtek százalékában fejeztük ki.

Eredmények

- 5 A 24. ábra bemutatja, hogy az „először fény” megközelítéssel végzett PCI is fokozni tudta az alacsony molekulatömegű, klinikailag jóváhagyott kemoterápiás ágens (bleomicin) biológiai hatását. Láthatjuk, hogy a 100 µM dózisonál, a bleomicin toxicitása a fényindukció hatására lényeges mértékben nőtt (a 24. ábrán ■ és *). A bleomicin legalacsonyabb alkalmazott dózisának (a 24. ábrán ♦) hatástalansága azt mutatja, hogy e megnö-
- 10 vekedett citotoxicitás nem önmagában a fotokémiai kezelésnek az eredménye, mivel e mintasor ugyanazt a fotokémiai kezelést kapta, mint a 100 µM bleomicinnel kezelt sorozat, azonban mégsem tapasztaltuk fény által indukált hatásokat a sejtek túlélésén.

24. példa

Geloninnal végzett PCI, egerekben lévő daganatok kezelésére in vivo modellben

Állatok

- 15 Balb/c (nu/nu) csupasz nőtény egereket tenyésztettünk az Institute for Cancer Research Animal Department-jében. Az egereket speciális, patogénektől mentes körülmények között tartottuk. Vízet és élelmet megfelelő rendszerességgel biztosítottunk. Az egerekkel kapcsolatos minden tevékenységet a Norwegian Radium Hospital állatgondozási bizottsága engedélyezett a Nemzeti Etikai Bizottság állategészségügyre vonat-
- 20 kozó útmutatásai alapján. Az (5-8 hetes korú) egerek átlagos testtömege 20-25 g volt a kísérlet kezdetekor, és a kísérleti csoportok legalább 5-5 egérből álltak. A kísérletben alkalmazott, emberi eredetű WiDr adenokarcinómát Balb/c (nu/nu) egerekbe töréni sorozatos transzplantálással tartottuk fenn. A daganatokat szikével elhomogenizáltuk és az oldatból 20 µl-t injektáltunk (s.c.) az egyes egerek jobboldali csípőjébe. A daganatok méretét hetente kétszer-háromszor mértük meg úgy, hogy két, egymásra merőleges átmérőt mértünk, és ezekből az értékekből, az alábbi képlettel számítottuk ki a daganat térfogatát:

25
$$v = (W^2 * L) / 2$$

ahol, W a mért daganat szélessége, L pedig a hosszúsági átmérője.

Kezelés

- Az egereket véletlenszerűen osztottuk szét az 1. táblázatban és a 25. ábrán feltüntetett csoportokba. AIPcS₂₀-ból készített törzsoldatból PBS-sel 1,25 mg/ml koncentrációjú hígítást készítettünk, és amikor az ege-
- 30 rekben a daganatok mérete elérte a körülbelül 100 mm³ térfogatot az AIPcS₂₀ oldatból intraperitoneálisan annyit adtunk be, hogy az állatokban a végkoncentráció 10mg/kg legyen. Az AIPcS₂₀ beadása után 48 órával, a daganatokat vörös fénnel, 16 percig besugároztuk (lásd alább). A fényexpozíció után közvetlenül a daganatokba gelonint (50 µg összmenyiség, 2 mg/ml-es oldatban, azaz 25 µl) injektáltunk. Az AIPcS₂₀ beadása után az egereket 1 hétig sötétben tartottuk.

- 35 Fénykezelés

- A daganatokat 150 mW/cm²-t emittáló, 580 nm hosszú áteresztésű és 700 nm rövid áteresztésű szűrővel szűrt 150 W halogén lámpával (Xenophot HLX64640) világítottuk meg. Az állatokat, a daganat feletti terület kivételével, alumínium fóliával takartuk. A daganat feletti területnél a fóliába, a daganat átmérőjénél 2 mm-rel nagyobb átmérőjű lyukat vágunk. A daganatokat 145 J/cm² fénynek tettük ki. A daganatok méretét hetente
- 40 kétszer-háromszor mértük meg a fentiekben leírtak szerint. Az egereket előltük, amikor a daganatok átmérője

elérte a körülbelül 20 mm átmérőt. A daganattól mentes állatokat a megvilágítás után 30 nappal pontoztuk (1. táblázat), és a daganatoknak az egyes csoportokban mért átlagos térfogatát feljegyeztük (25. ábra).

Eredmények

1. táblázat

5 Az egereket a fentiekben leírtak szerint kezeltük és a daganatok megjelenését a besugárzás után 30 nappal rögzítettük.

Csoportszám	Kezelés	daganattól mentes állatok száma a megvilágítás után 30 nappal	daganattól mentes állatok %-a a megvilágítás után 30 nappal
1	kezeletlen	1/8	13
2	PBS + fény	0/7	0
3	gelonin	0/8	0
4	gelonin + „először fény”	0/5	0
5	AlPcS _{2a}	0/10	0
6	AlPcS _{2a} + gelonin	0/7	0
7	AlPcS _{2a} + fény	2/11	18
8	AlPcS _{2a} + fény + „először fény”	4/5	80

10 Az 1. táblázatból látszik, hogy az „először fény” megközelítés és gelonin alkalmazásával végzett PCI (8. csoport) az egerek 80%-át (5 egerből 4-et) kigyógyított a daganatos megbetegedésből. Ezzel szemben, a gelonin önmagában, sem fénykezeléssel (4. csoport) sem pedig fénykezelés nélkül (3. csoport) (AlPcS_{2a} nélkül) hatástalan volt. A gelonin AlPcS_{2a}-val kombinálva, fénykezelés nélkül (6. csoport) szintén semmilyen hatást sem mutatott. Alacsony gyógyulási arányt tapasztaltunk a kezeletlen állatoknál (1. csoport), feltehetően a daganatok spontán gyógyulásából adódóan. Alacsony gyógyulási arányt tapasztaltunk az AlPcS_{2a}-t és fénykezelést kapott állatokban (7. csoport) is, a gelonintól függetlenül jelentkező fotodinamikus terápiás (PDT) hatásnak 15 köszönhetően. Azonban, a PDT hatás (18%-os gyógyulás) szignifikánsan alacsonyabb volt ahhoz képest, amit a geloninnal végzett PCI kezelésnél tapasztaltunk (80%, 8. csoport). Mivel a geloninnak önmagában egyáltalán nincs hatása, a PCI csoportban kapott magas gyógyulási arány nem magyarázható a PDT és gelonin additív hatásával, de magyarázható olyan szinergista hatással, amelyben a PCI kezelés realizálja a gelonin toxikus potenciálját.

20 A 25. ábra mutatja be a PCI kezelés hatását a kezelt csoportok némelyikében lévő daganatok átlagos térfogatára. Látható, hogy a csak gelonint kapott csoportban (△) a daganat ugyanolyan gyorsan nő, mint a foszfáttal puffertelt sóoldat (PBS) placebo és megvilágítás kombinációjával kezelt állatokban (*). A csak fotokémiai kezelést, de gelonint nem kapott állatokban (◇) a daganatnövekedés lelassult, de a megvilágítás után körülbelül 15 nappal a daganatok ismét növekedésnek indultak. Ezzel szemben, a teljes gelonin-PCI kezelést kapott állatokban (*) még 33 nappal a megvilágítás után sem tapasztaltunk növekedést a daganatok átlagos térfogatában.

Szabadalmi igénypontok

1. *In vitro* vagy *ex vivo* eljárás molekulák bevitelére sejt citoszoljába *azzal jellemezve*, hogy a sejtet fotoszenzitivizáló ágenssel érintkeztetjük, amely ágens endoszómákba, lizoszómákba, endoplazmatikus retikulumba vagy Golgi-készülékbe lokalizálódik, a sejtet a bevinni kívánt molekulával (transzfermolekula) érintkeztetjük és a sejtet a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására alkalmas hullámhosszú fénnel sugározzuk be, ahol a besugárzást a sejtnek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végezzük, ahol
- (i) a transzfermolekula nem könnyen hatol át sejtmembránokon, és/vagy
- (ii) a fotoszenzitivizáló ágens vagy a transzfermolekula, vagy mindkettő egy vagy több hordozómolekulához, célbajuttató molekulához vagy vektorhoz van kapcsolva, asszociálva vagy konjugálva.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejtet a besugárzás utáni időpontban érintkeztetjük a transzfermolekulával.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejtet 0-4 órával a besugárzás után érintkeztetjük a transzfermolekulával.
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejtet a besugárzással egyidőben érintkeztetjük a transzfermolekulával.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejtet 30 perc és 6 óra közötti időtartamig érintkeztetjük a transzfermolekulával.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a transzfermolekula fehérje, peptid, antitest vagy antigén, vagy ezek bármelyikének fragmentuma.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a transzfermolekula vagy annak része vagy fragmentuma a sejt felszínén kerül bemutatásra vagy oda expresszálódik.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejt antigént bemutató sejt.
9. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a transzfermolekula citotoxikus drog.
10. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a transzfermolekula nukleinsav-molekula.
11. A 10. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav-molekulái vektormolekulába építjük be.
12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a fotoszenzitivizáló ágens TPPS₄, TPPS_{2a}, AlPcS_{2a} vagy más amfifil fotoszenzitivizáló.
13. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a fotoszenzitivizáló ágens 5-aminolevulinsav vagy 5-aminolevulinsav észtere vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója.
14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a fotoszenzitivizáló ágens 4-24 órán keresztül, a besugárzás előtt érintkeztetjük a sejtekkel.
15. A 14. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a fotoszenzitivizáló ágens 4-24 órán keresztül, közvetlenül a besugárzás előtt érintkeztetjük a sejtekkel.
16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a fotoszenzitivizáló ágens el-távolítjuk, miután a besugárzás előtt 1-4 órán keresztül érintkeztetjük a sejtekkel.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike *azzal jellemezve*, hogy hordozómolekula, célbajuttató molekula vagy célbajuttató vektor, amelyhez vagy amellyel a transzfermolekula kapcsolva, asszociálva vagy konjugáltatva van, adenovírus, polikation, kationos lipid vagy peptid vagy célbajuttató vektor.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a transzfermolekula vektorhoz van kapcsolva, asszociálva vagy konjugáltatva, és a vektor hordozómolekulához, célbajuttató molekulához vagy célbajuttató vektorhoz van kapcsolva, asszociálva vagy konjugáltatva.

19. A 11-18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vektor adenovírus.

20. A 17. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a polikation poli-L-lizin, poli-D-lizin, vagy SuperFect®.

21. A 17. vagy 18. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a kationos lipid DOTAP.

22. Az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a hordozómolekula liposzómán vagy lipiden alapuló konstrukció, amely előnyösen legalább egy kationos lipidet tartalmaz.

23. Az 1-8. vagy a 10-22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a sejteknek, amelyekbe a molekulákat bevittük, legalább 50%-át nem öljük el.

24. Az 1-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a besugárzási lépést 1-10 percre végezzük.

25. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott transzfermolekula és fotoszenzitivizáló ágens alkalmazása betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a fotoszenzitivizáló ágens és külön a transzfermolekula egy adott páciens sejtjeivel vagy szöveteivel érintkeztetendő, és a sejtek a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel besugárzandók, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végezhető, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

26. Az 1-25. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott transzfermolekula alkalmazása betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a betegség, rendellenesség vagy fertőzés páciens sejtjeinek vagy szöveteinek a gyógyszerrel történő érintkeztetésével kezelendő, és külön az 1-25. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott fotoszenzitivizáló ágens érintkeztetendő a páciens sejtjeivel vagy szöveteivel, és a sejtek besugárzandók a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végezhető, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

27. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott transzfermolekulát és külön fotoszenzitivizáló ágens tartalmazó készítmény, betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére vagy megelőzésére történő külön vagy szekvenciális alkalmazásra, ahol a fotoszenzitivizáló ágens és külön a transzfermolekula egy adott páciens sejtjeivel vagy szöveteivel érintkeztetendő, és a sejtek a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel besugárzandók, és a besugárzás a sejtek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végezhető, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

28. Az 1-27. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott transzfermolekula betegség, rendellenesség vagy fertőzés kezelésére történő alkalmazásra, ahol a betegség, rendellenesség vagy fertőzés páciens sejtjeinek vagy szöveteinek a gyógyszerrel történő érintkeztetésével kezelendő, és külön az 1-27. igénypontok bármelyike szerinti meghatározott fotoszenzitivizáló ágens érintkeztetendő a páciens sejtjeivel vagy szöveteivel, és a sejtek besugárzandók a fotoszenzitivizáló ágens aktiválására hatásos hullámhosszúságú fénnel, és a besugárzás a sejt-

nek a transzfermolekulával történő érintkeztetését megelőzően vagy azzal egy időben végzendő, ahol a transzfermolekula terápiás molekula.

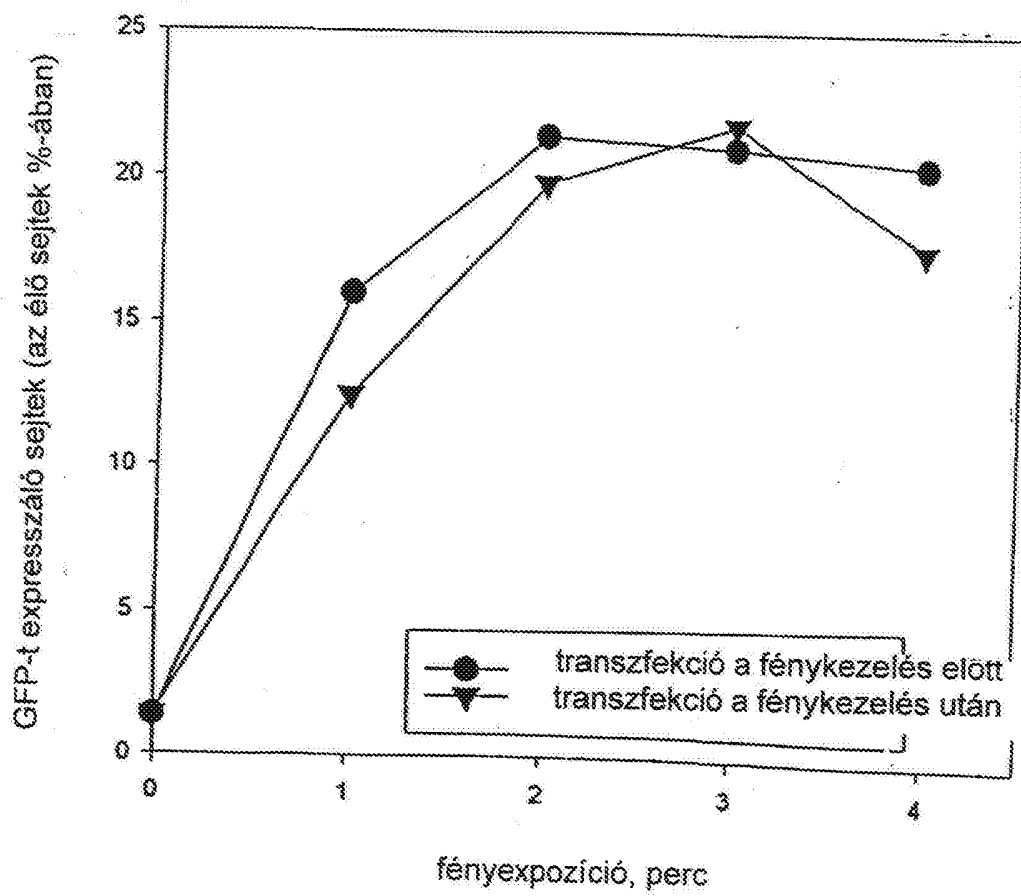
29. A 25-28. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, készítmény vagy transzfermolekula, ahol a sejtek általi felvételre szolgáló eljárás az 1-5, 14., 15., 16., 23. vagy 24. igénypontok bármelyike szerinti eljárással hajtandó végre.

30. A 25-29. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, készítmény vagy transzfermolekula, ahol a transzfermolekula antigén molekula és a transzfermolekula vagy annak része vagy fragmense a sejt felszínén bemutatandó vagy oda expresszálandó.

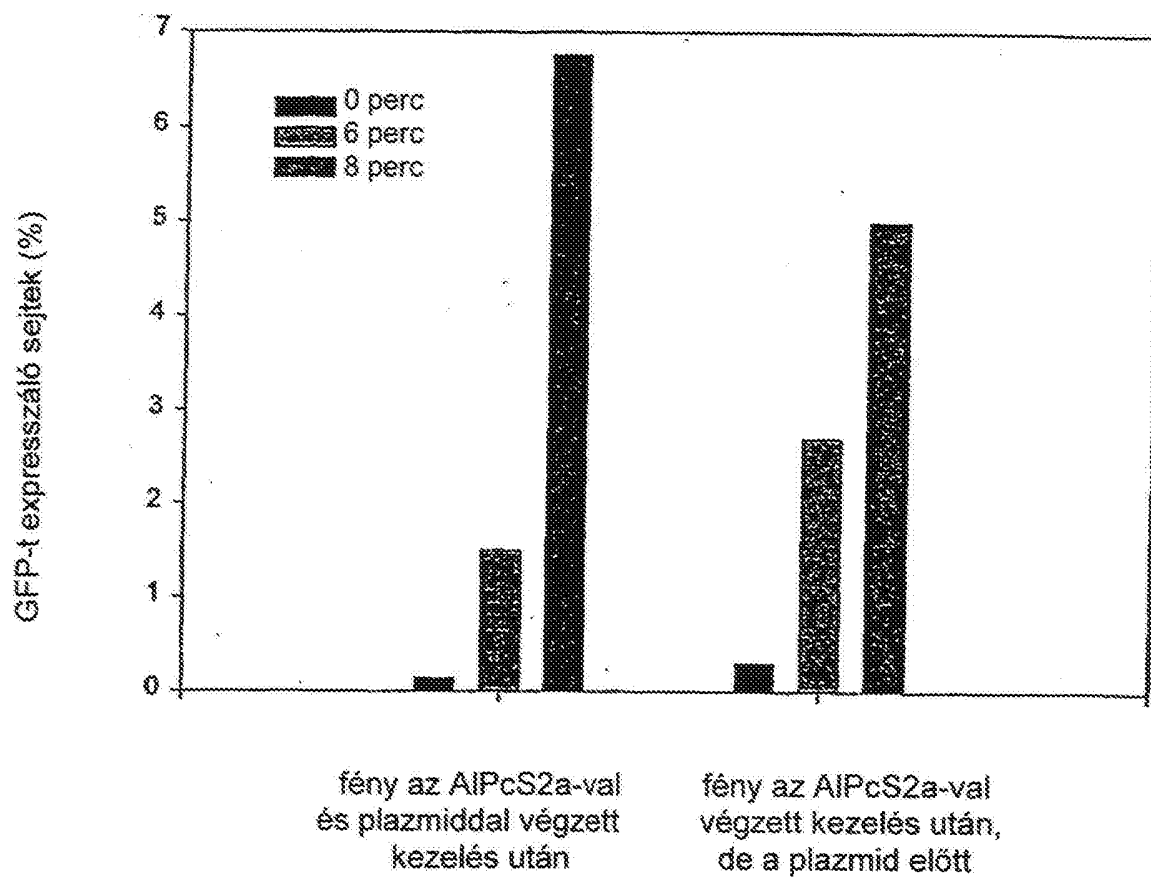
31. A 25-29. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, készítmény vagy transzfermolekula génterápiára, immunválasz stimulálására vagy rák kezelésére vagy megelőzésére.

PCT/GB01/05299

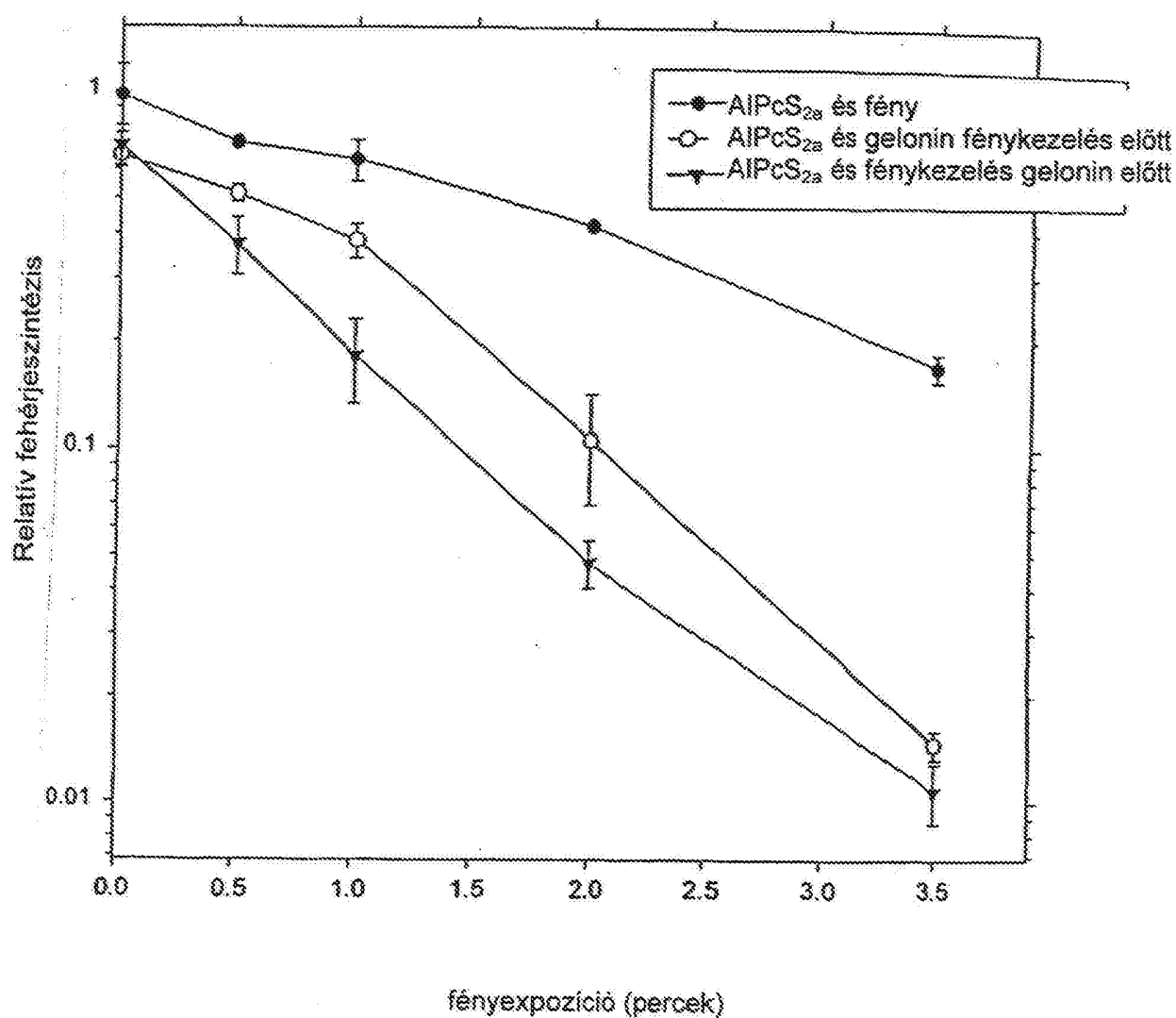
1/17



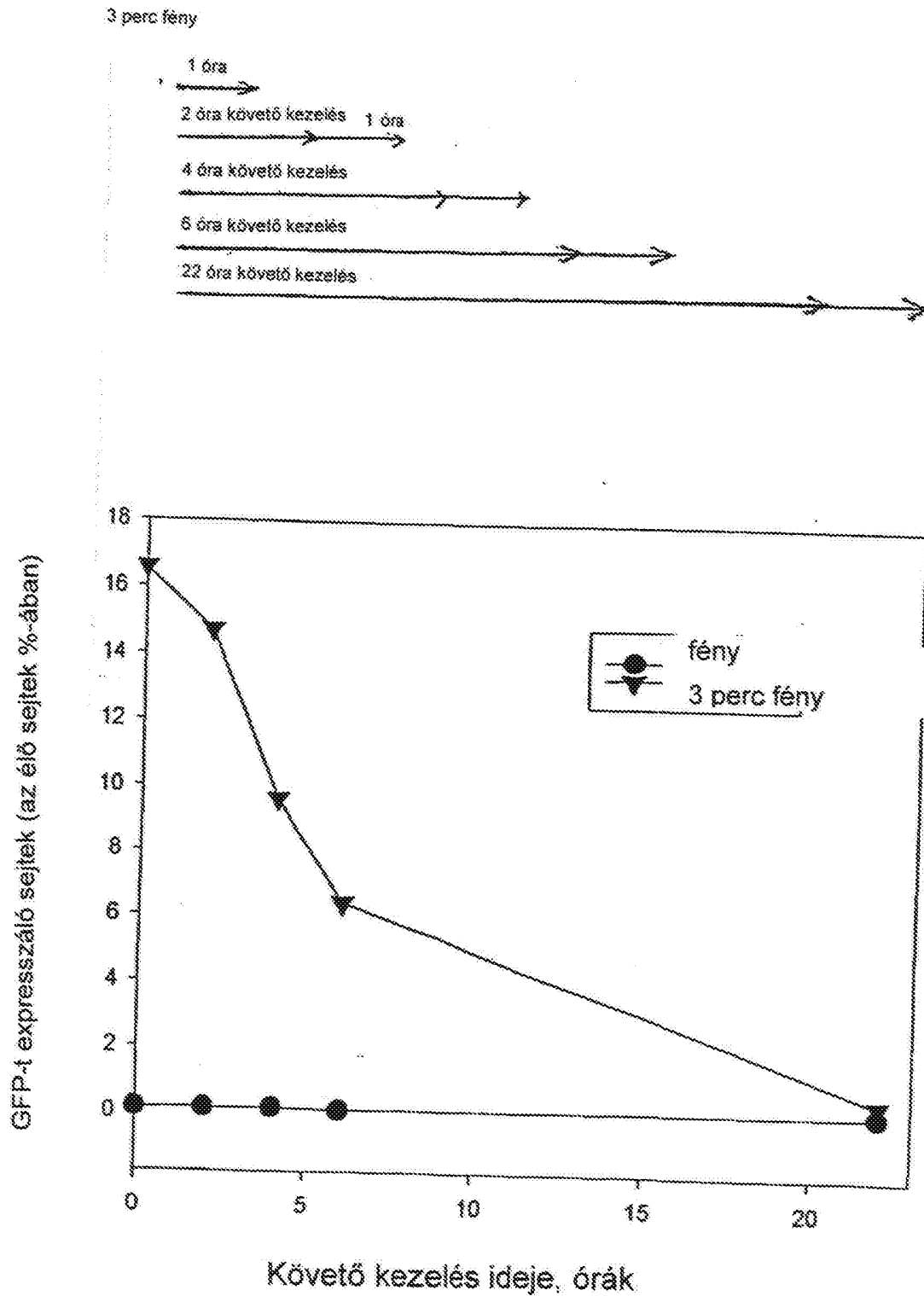
1. ábra



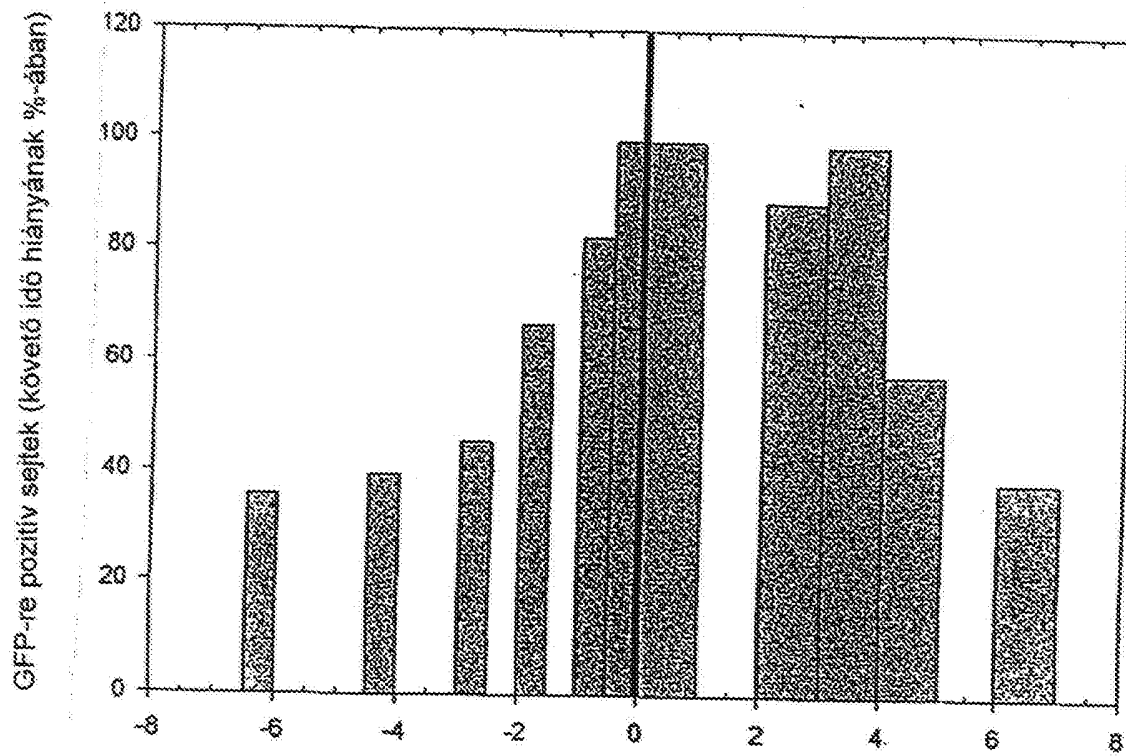
2. ábra



3. ábra

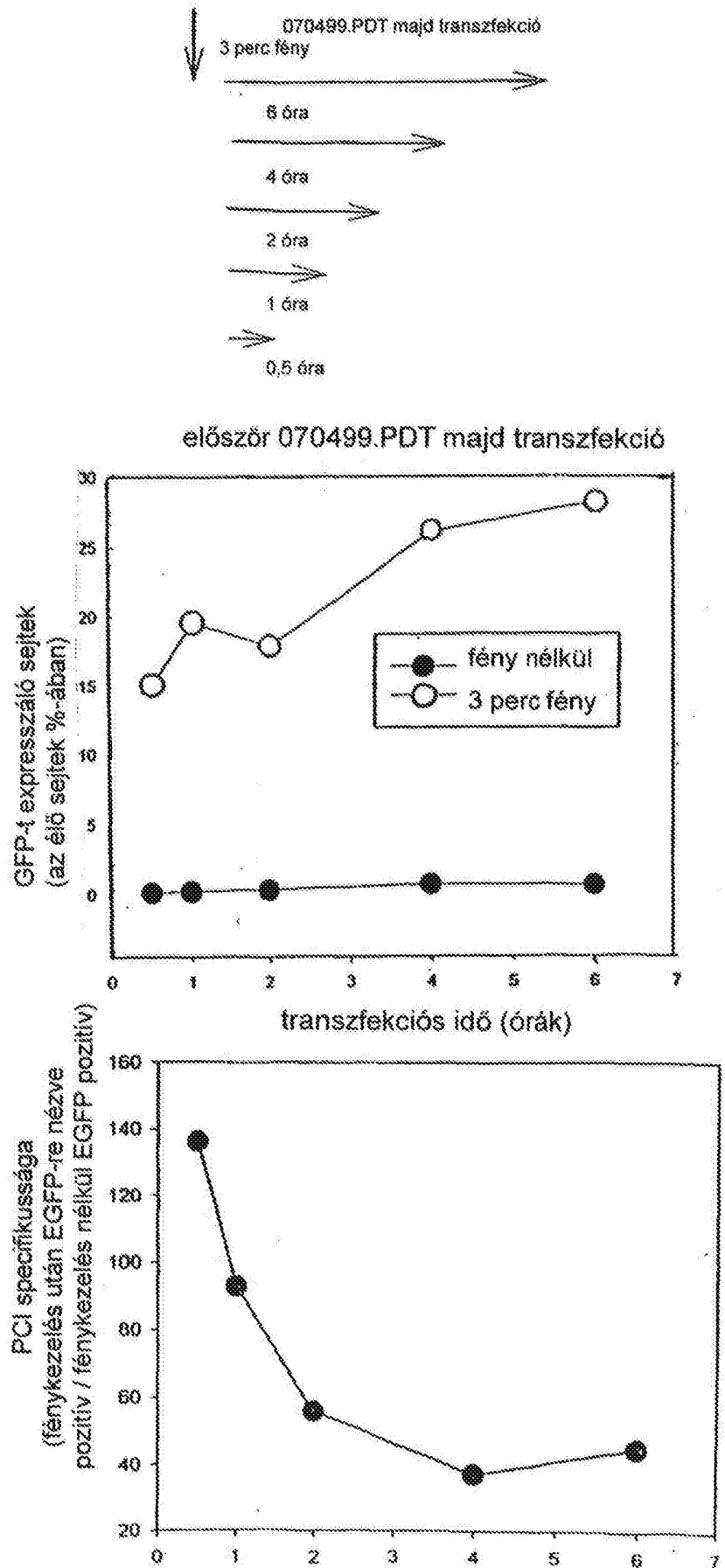


4. ábra

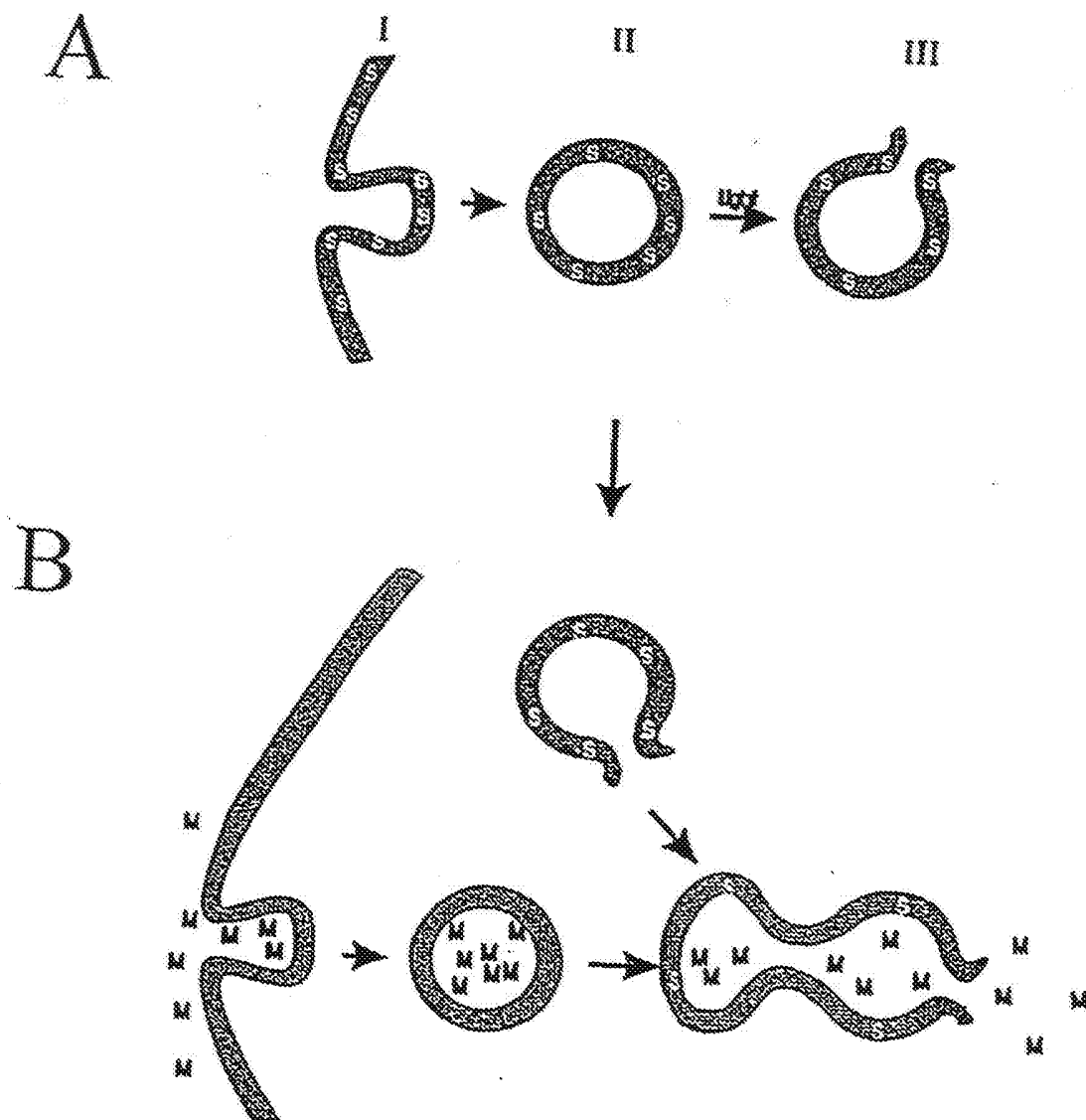


a plazmiddal történt kezelés időpontja (h, a megvilágításhoz képest)

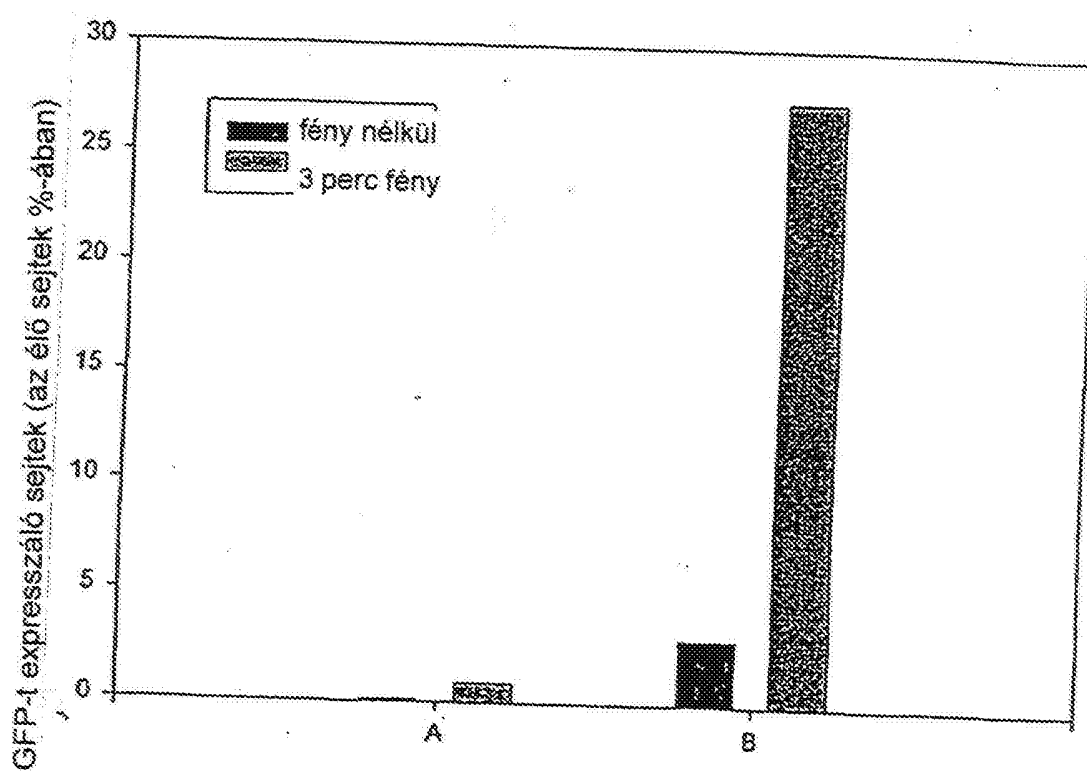
5. ábra



6. ábra



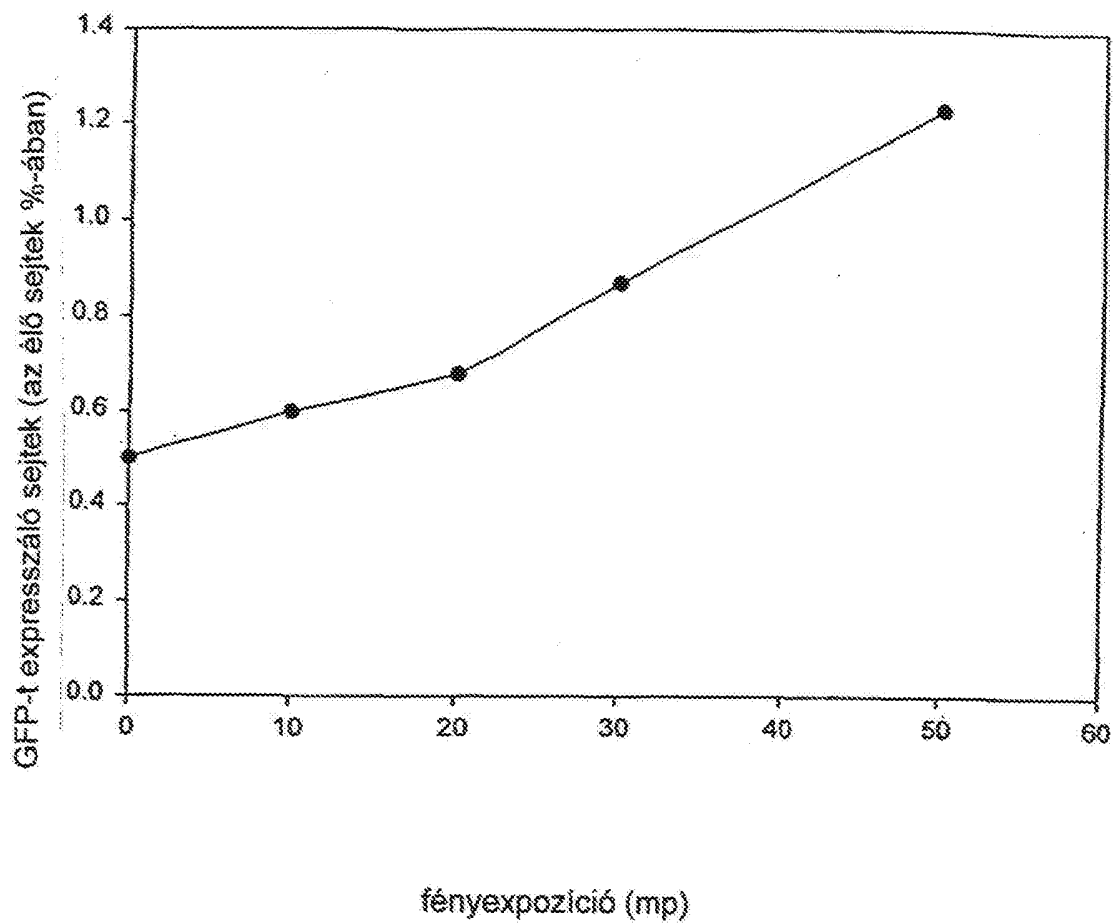
7. ábra



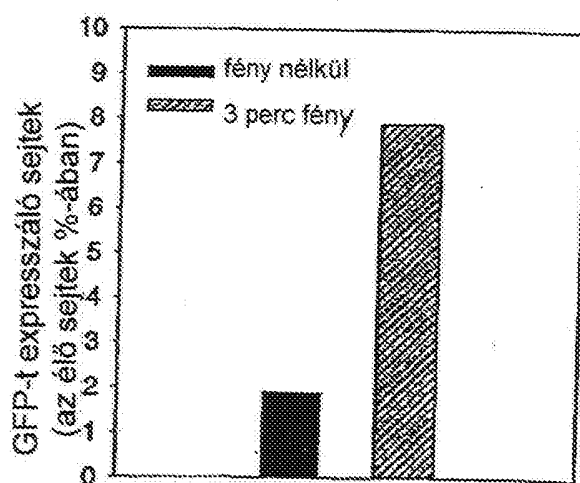
8. ábra

PCT/GB01/05299

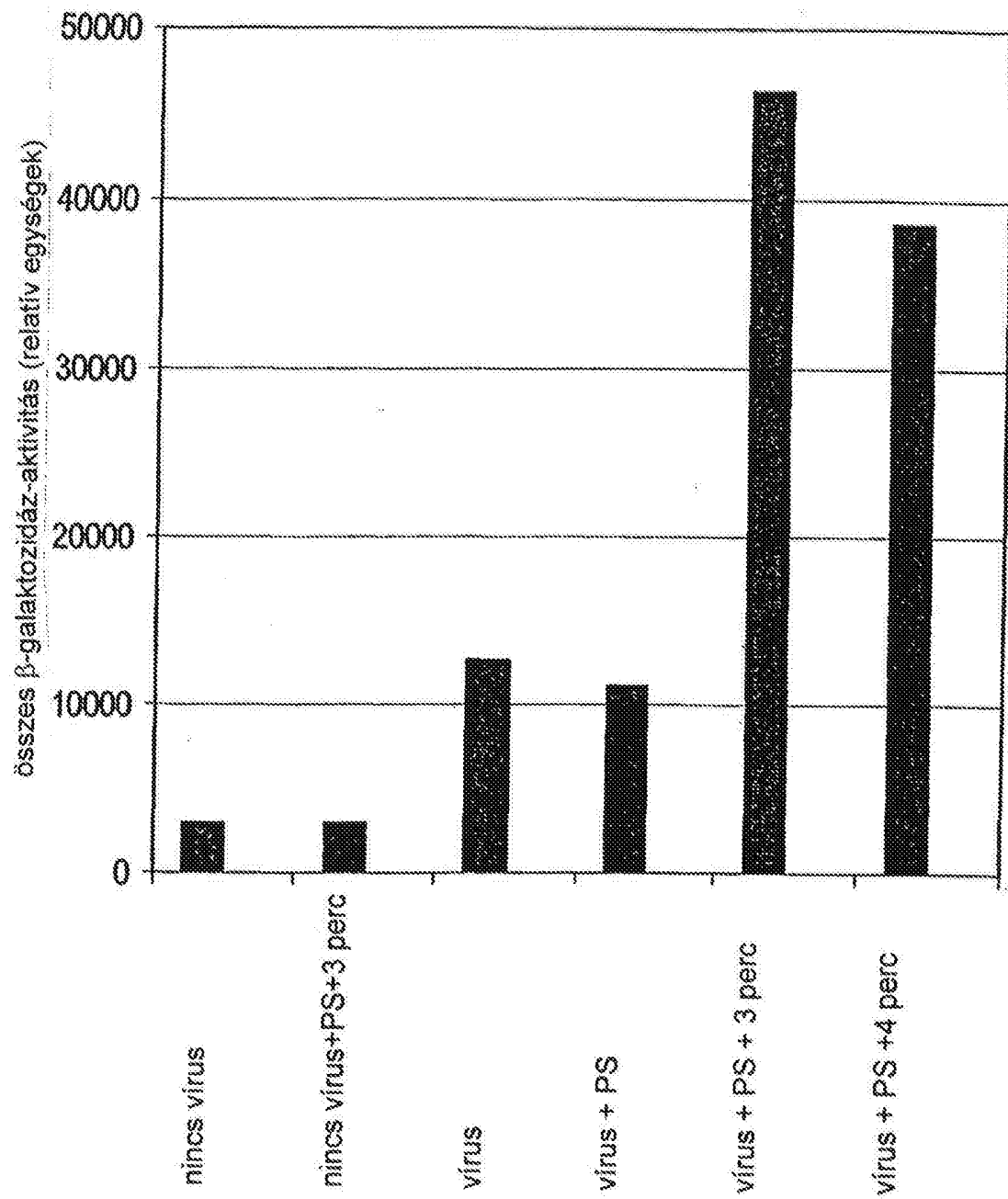
9/17



9. ábra



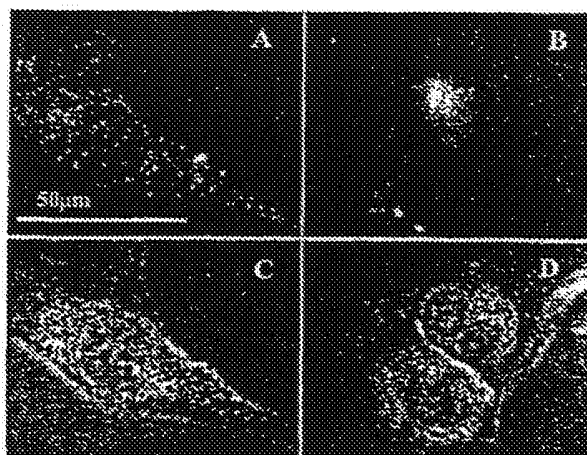
10. ábra



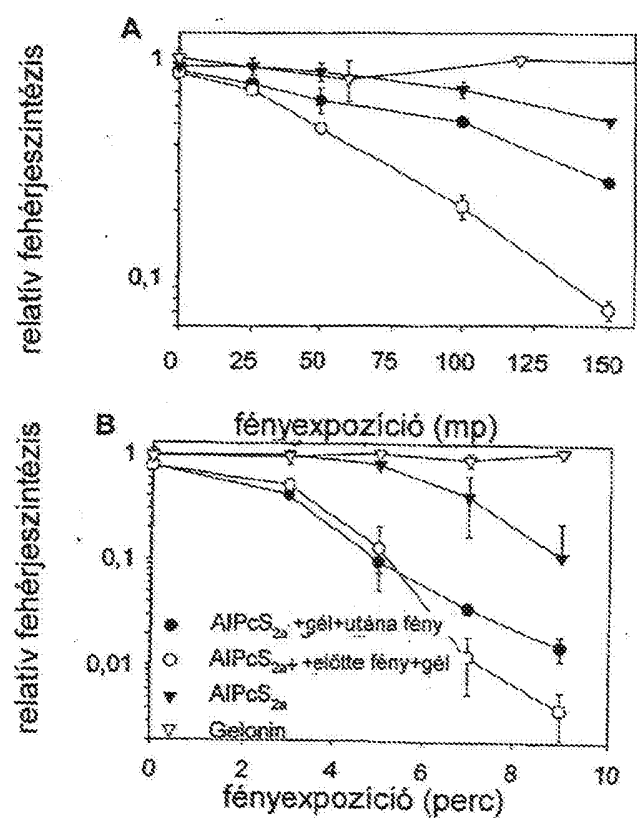
11. ábra

PCT/GB01/05299

11/17



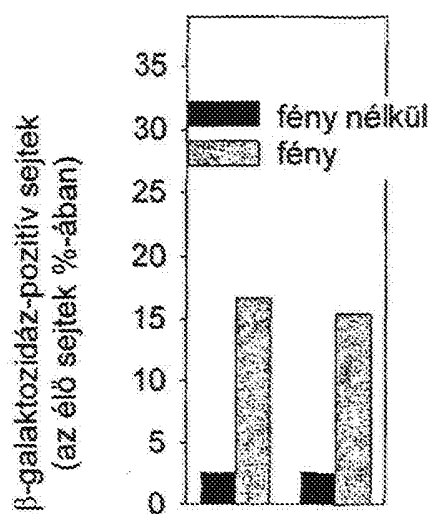
12. ábra



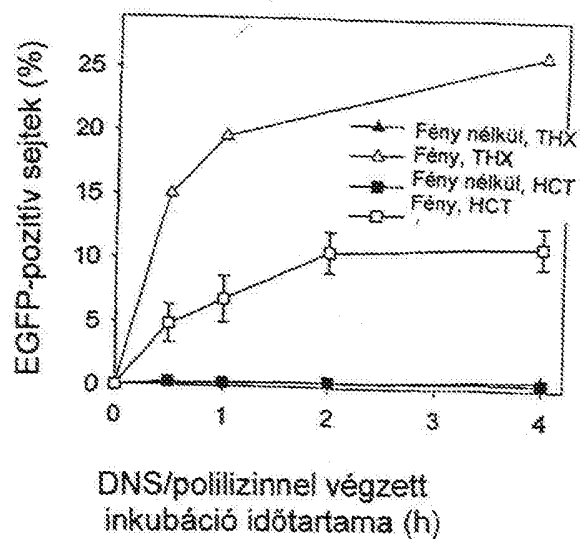
13. ábra

PCT/GB01/05299

12/17

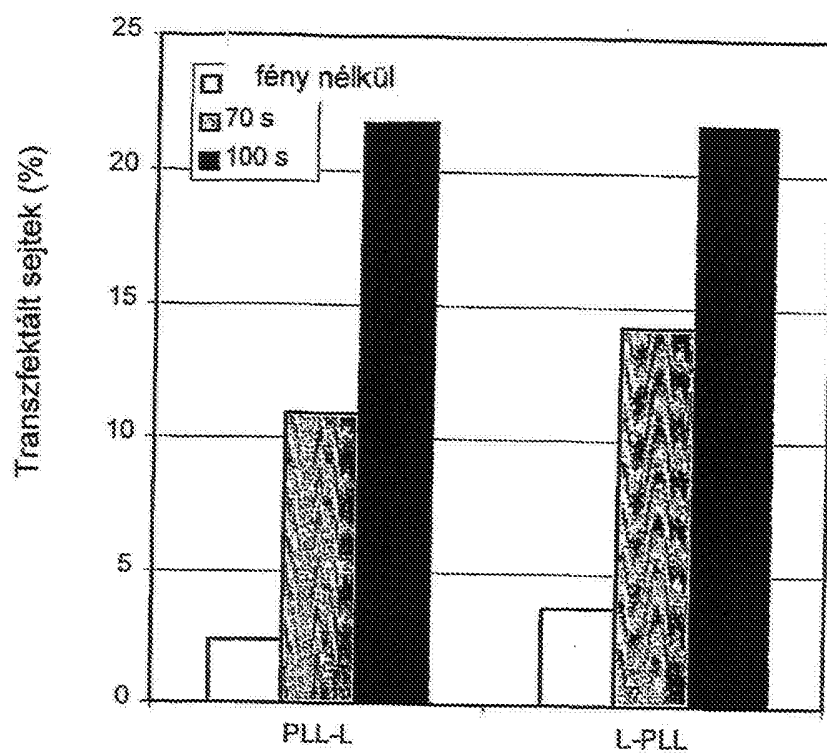


14. ábra

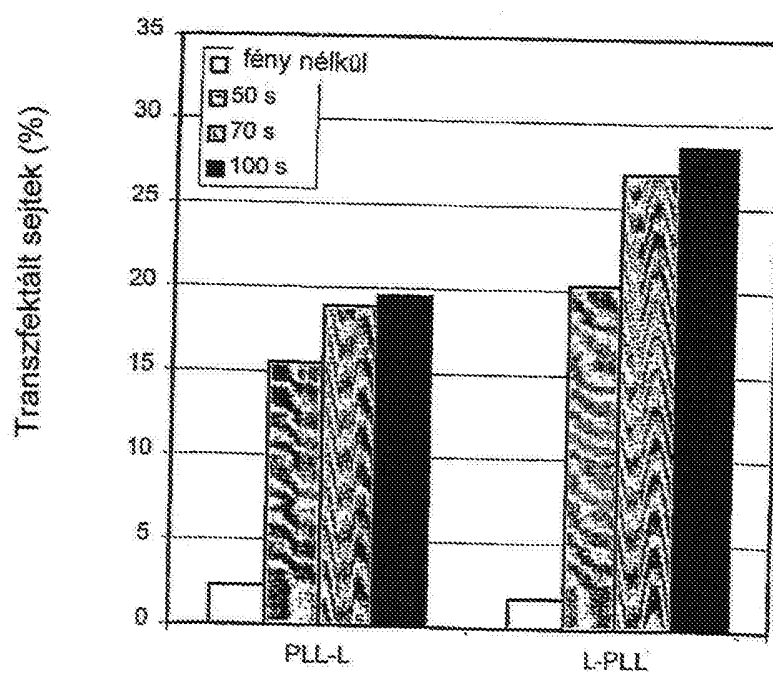


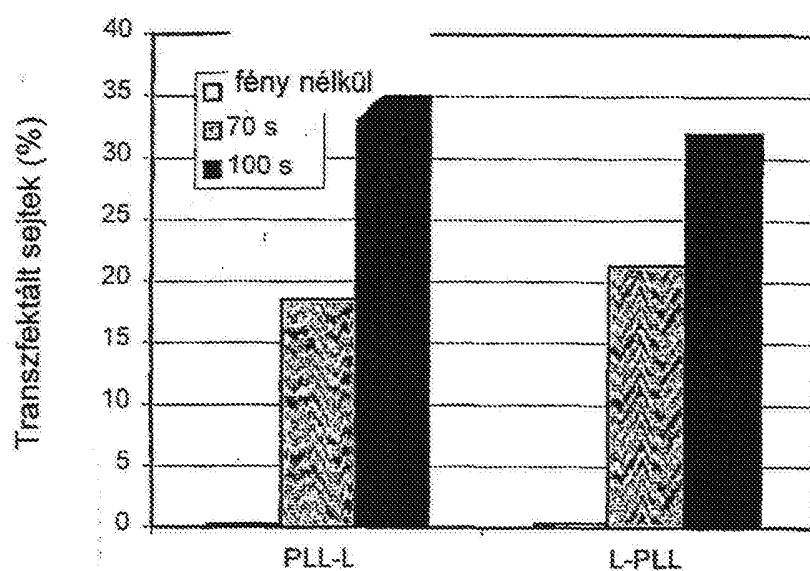
15. ábra

16. ábra

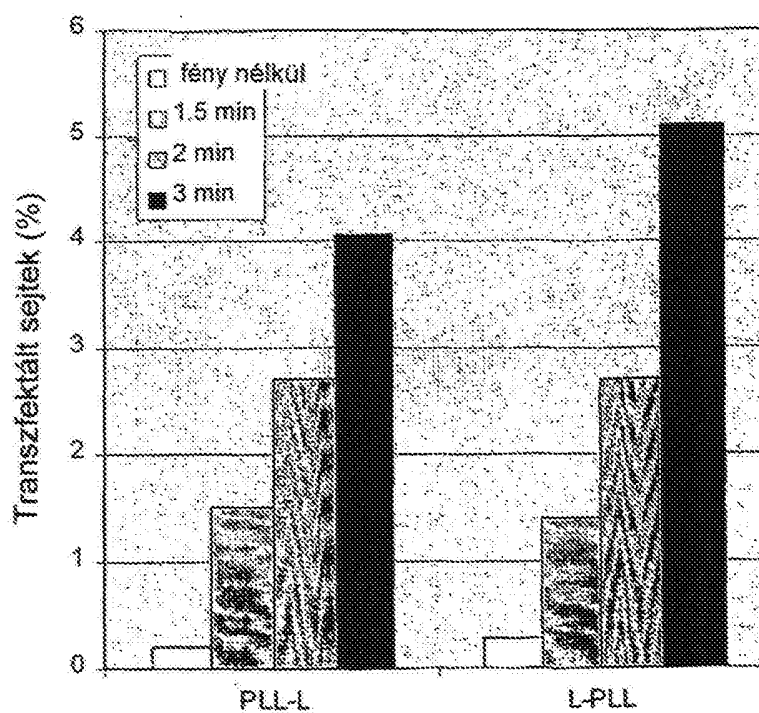


17. ábra

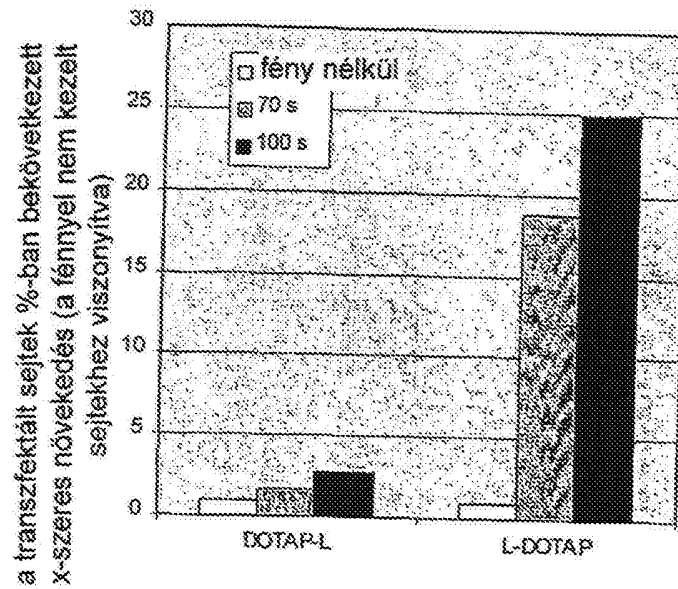




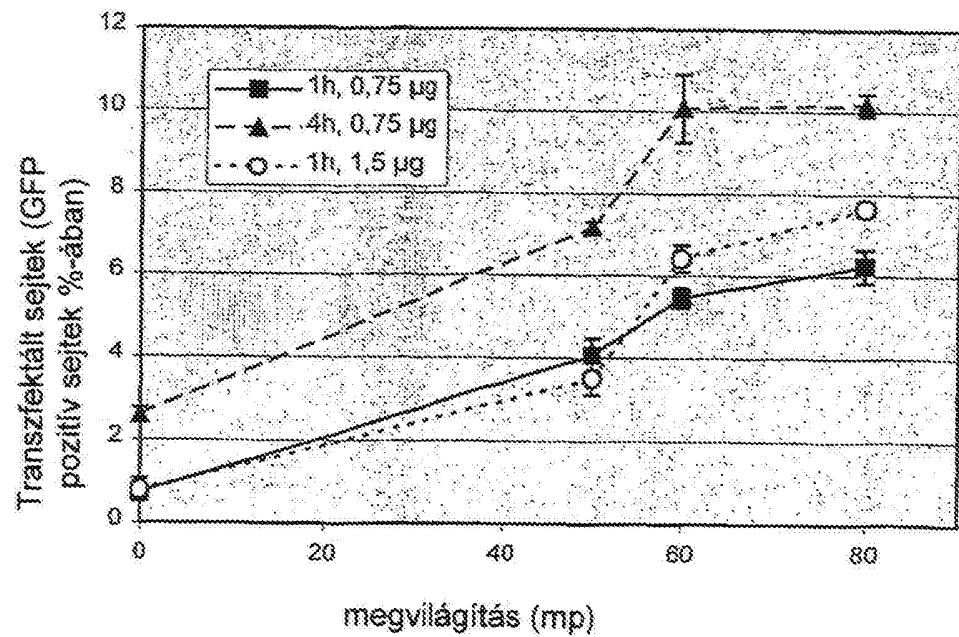
18. ábra



19. ábra



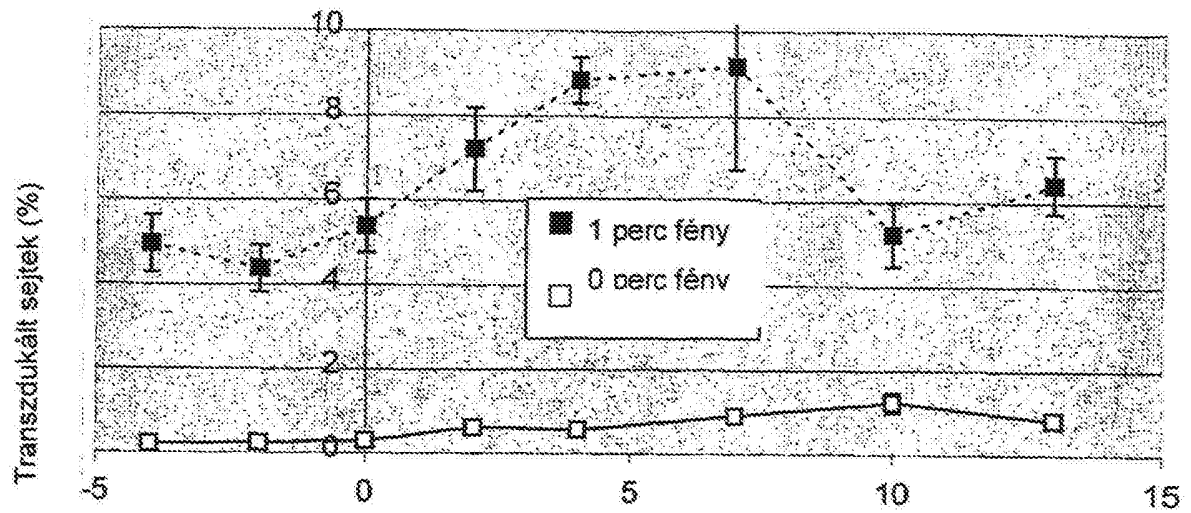
20. ábra



21. ábra

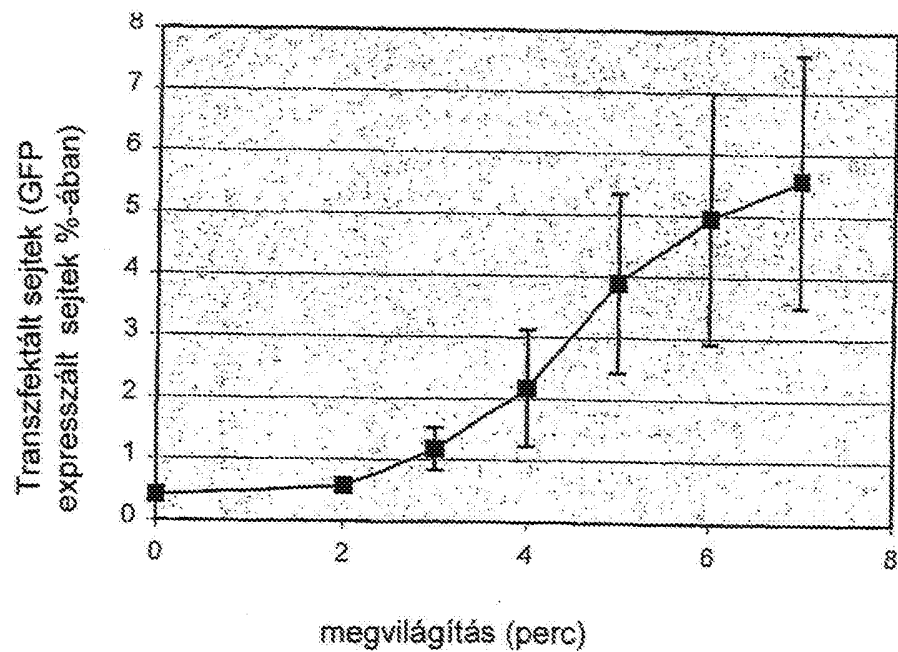
PCT/GB01/05299

16/17



a vírus hozzáadásának időpontja (óra, a megvilágítás előtt (-) vagy után (+))

22. ábra

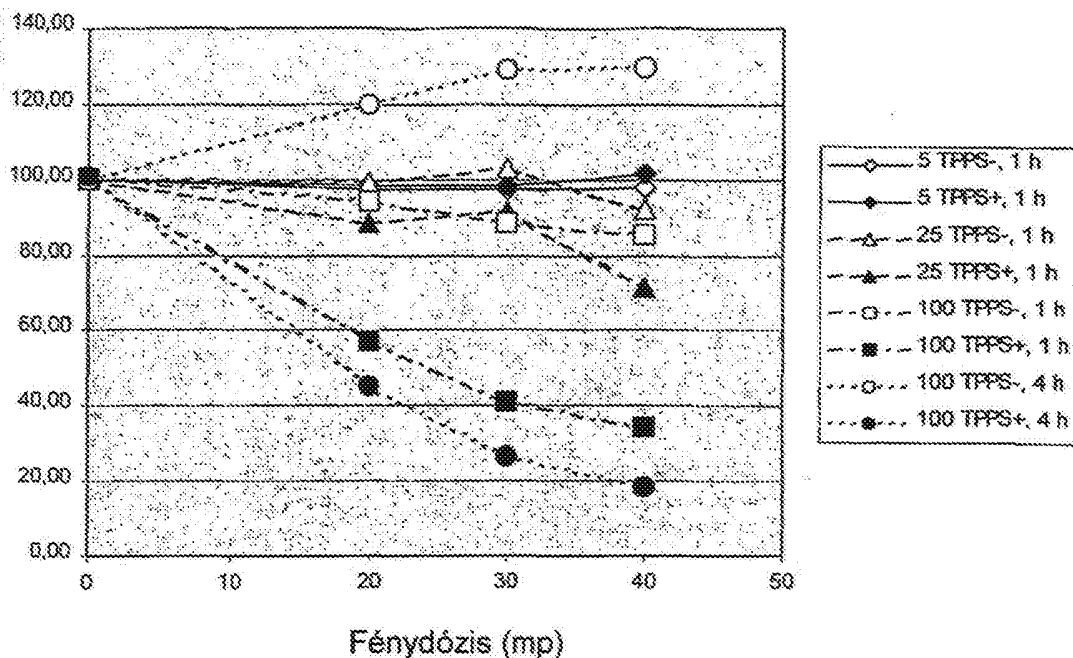


23. ábra

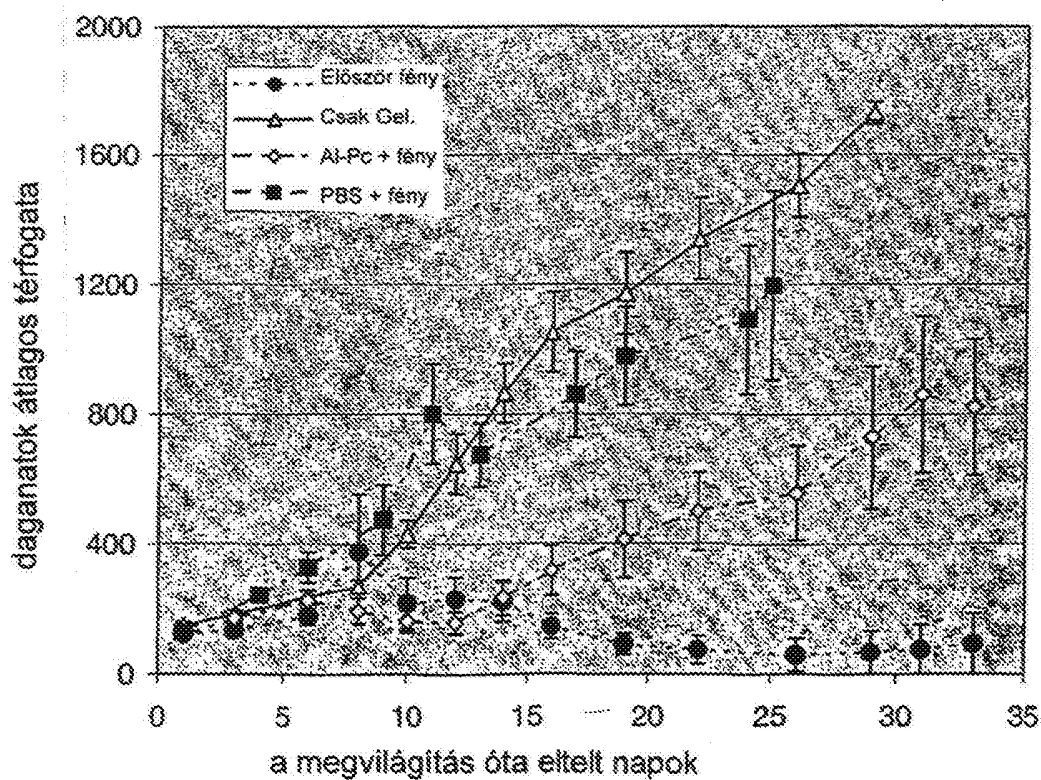
PCT/GB01/05299

17/17

egyes sorozatok esetében, a túlélő sejtek száma a 0 fény mintához viszonyítva



24. ábra



25. ábra