



HU000227604B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **227 604**(13) **B1****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 02441**(22) A bejelentés napja: **2000. 03. 10.**(40) A közzététel napja: **2002. 10. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2011. 09. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 39/00** (2006.01)**A61K 41/00** (2006.01)**C12N 5/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/GB 00/00903

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0054802

(30) Elsőbbségi adatok:

9905911.5**1999. 03. 15.****GB**

(73) Jogosult(ak):

PhotoCure ASA, Oslo (NO)

(72) Feltaláló(k):

Tjelle, Torunn E., Oslo (NO)**Prasmickaite, Lina, Oslo (NO)****Berg, Kristian, Heggedal (NO)****Hogset, Anders, Oslo (NO)**

(74) Képvisező:

dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és**Védjegy Iroda Kft., Budapest**(54) **Eljárás antigének expresszáltatására antigén-prezentáló sejtek felszínén fotokémiai internalizációval**

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás vakcinázásra, amely szerint fotodinamikus kezeléssel („photodynamic treatment”; PDT) vakcinakomponenseket juttatunk sejtekbe antigénprezentálás elérésére. A találmány tárgyát képezik továbbá vakcinakészítmények ilyen eljárásokban történő alkalmazásra.

A találmány szerinti megoldás alkalmas különböző antigénmolekulák hatásos prezentálása útján történő vakcinázásra.

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

Eljárás ~~vakcinázásra~~ antigénnek expozíció-
tárára antigén-prezentáló sejtek felvételére fotodinami-
ai indukálással

A találmány tárgya eljárás vakcinázásra, amely szerint fotodinamikus kezeléssel („photodynamic treatment”; PDT) vakcinakomponenseket juttatunk sejtekbe antigénprezentálás elérésére. A találmány tárgyat képezik továbbá vakcinakészítmények ilyen eljárásokban történő alkalmazásra.

A találmány szerinti megoldás alkalmas különböző antigénmolekulák hatásos prezentálása útján történő vakcinázásra.

A molekulák többsége nem jut át könnyen át sejtmembránokon. Molekulák élő sejtek citoszoljába történő bejuttatására alkalmas eljárások előnyösen alkalmazhatók biológiai folyamatok befolyásolására és tanulmányozására. A leggyakrabban alkalmazott ilyen eljárások közül megemlítendőek a következők: mikroinjektálás, üres vörösvértest („red blood cell ghost”) által közvetített fúzió és liposzómafúzió, pinoszomák ozmotikus lizise, „scrape loading” (sejtek makromolekulák jelenlétében történő lekaparása, ezáltal azoknak a sejt citoszoljába történő bejuttatása), elektroporáció, valamint a kalcium-foszfát és vírus által közvetített transzfekció. Ezek a technológiák alkalmasak sejtek tanulmányozására tenyésztetben, bár számos esetben nehezen kivitelezhetőek, időigényesek, nem elég eredményesek, vagy jelentős mértékű sejtpusztulást idéznek elő. Ezek a technológiák tehát nem optimálisak biológiai vagy orvosi kutatások-

ra, vagy terápiára, ahol feltétel, hogy a sejtek életképesek és/vagy működőképesek maradjanak.

Jól ismert, hogy a porfirinek és számos egyéb fotoszenzibilizáló vegyület citotoxikus hatású lehet sejtekre és szövetekre. Ezek a hatások azon a tényen alapulnak, hogy fény hatására a fotoszenzibilizáló vegyület toxikussá válhat vagy toxikus anyagokat bocsáthat ki a sejtet vagy biomolekulákat, például sejtmembránokat és sejtstruktúrát károsító naszcensz O vagy más oxidáló gyök formájában, és ez a sejt- vagy membránkárosodás végsősoron a sejt pusztulásához vezethet. Ezek a hatások kiaknáthatók különböző rendellenességek vagy zavarok, elsősorban tumoros betegségek kezelésére. A kezelést fotodinamikus kezelésnek (PDT) nevezzük, és aszerint úgy járunk el, hogy fotoszenzibilizáló vegyületet (fotokemoterápiás szert) juttatunk a test érintett részébe, majd azt fotoaktiváló fénysugárzásnak tesszük ki, miáltal a fotoszenzibilizáló hatóanyagot aktiváljuk, és citotoxikus formává alakítjuk, ezáltal az érintett sejteket elpusztítjuk vagy proliferációs képességüket megszüntetjük. Ismerünk olyan fotoszenzibilizáló vegyületeket, amelyek előnyösen vagy szelektív módon a kívánt célhelyre jutnak el, például tumorba vagy más lézióba.

Fotoszenzibilizáló vegyületek széles skálája ismert, például a pszoralenek, porfirinek, klorinok és ftalocianinok. Ilyen vegyületek fény hatására toxikussá válnak.

Fotoszenzibilizáló vegyületek különböző módon, közvetlen vagy közvetett úton fejthetik ki hatásukat. Bizonyos fotoszenzibilizáló vegyületek például fény hatására közvet-

lenül toxikus formává alakulnak, míg mások toxikus anyagok, például naszcens oxigén vagy egyéb oxigé származék szabad gyök képződését váltják ki, amelyek különösen roncsoló hatásúak sejt-komponensekre és bi-molekulákra, például lipidekre, proteinek-re és nukleinsavakra.

A porfirintermészetű fotoszenzibilizáló vegyületek közvetett úton fejtik ki hatásukat toxikus vegyületek keletkezésének kiváltásával, és azokat különösen előnyös jelölteknek tartják PDT-re. A porfirinek a heminszintézis természetben előforduló prekursorai. Közelebbről, hemin képződik, ha vas (Fe^{3+}) épül be protoporfirin-IX-molekulába (Pp) a ferrokkelátképző enzim hatására. A Pp különösen hatékony fotoszenzibilizáló vegyület, míg a heminnek nincs fotoszenzibilizáló hatása. A technika állása szerint különböző porfirinalapú vagy porfirinszerű fotoszenzibilizáló vegyületek ismertek, és ezek leírása megtalálható a szakirodalomban.

A citotoxikus hatás elsősorban naszcens oxigén képződésén keresztül érvényesül. Ennek a reaktív köztiterméknek igen rövid ($<0,04 \mu s$) a féleletideje a sejtekben. A PDT elsődleges citotoxikus hatása tehát fénykezelés során érvényesül, a naszcens oxigén (1O) képződéséhez igen közel. Az 1O reakcióba lép proteinekkel (hisztidinnel, triptofánnal, metioninnel, ciszteinnel, tirozinnel), DNS-sel (guaninnal), telítetlen zsírsavakkal és koleszterinnel, és oxidálja azokat. A PDT alkalmazásának egy előnye az, hogy a hatás fénynek ki nem tett szövetekben nem érvényesül, azaz szelektív PDT-hatás érhető el. Bőséges szakirodalmi adat áll rendelkezésre.

kezésre PDT hatékonyságára vonatkozólag nem-kívánatos sejt-populáció, például tumoros sejtek elpusztítására. A szabadalmi adatbázisokban számos fotodinamikus vegyület leírása megtalálható, amelyekben azokat egymagukban vagy más célba-juttató vegyülettel, például tumoros sejtek receptordeterminánsai ellen irányuló immunglobulinokkal konjugálva alkalmazzák, miáltal még sejtspecifikusabb komplexeket kapunk. Ezen felül, bizonyos fotokémiai vegyületek, például hematoporfirin-származékok azzal a tulajdonsággal bírnak, hogy malignus sejtekben halmozódnak fel. Ilyen eljárások és vegyületek leírása megtalálható például az NO 173 319 számú norvég szabadalmi leírásban, és a NO 90 0731, 176 645, 176 947, 180 742, 176 786, 301 981, 300 499 és 891 491 számú norvég szabadalmi bejelentésekben.

A WO 93/14 142 számú nemzetközi közzétételi iratban hatóanyagbejuttatásra alkalmas rendszert ismertetnek, amely tumorelleses hatóanyagot és fényvel aktiválható komponenst (például fotoszenzibilizáló vegyületet) tartalmaz kopolimer hordozóhoz kapcsoltan. A komplex, sejtekhez történő hozzáadását követően pinocitózissal vagy fagocitózissal a sejt belsejébe jut, és endoszómákban és liposzómákban halmozódik fel. A liposzómákban, a tumorelleses hatóanyag és a polimer közti kötés hidrolizálódik, és az előbbi passzív módon ki-diffundálhat a liposzóma membránján át a citoszolba. A fenti eljárás alkalmazhatósága tehát kisméretű molekulákra korlátozódik, amelyek képesek a liposzóma membránján át-diffundálódni. Miután időt hagytunk a diffundálásra, megfelelő hullámhosszú és energiájú fényforrást alkalmazunk a

fénnyel aktiválható (fényérzékeny) vegyület aktiválására. A tumorellenes hatóanyag és fényérzékeny vegyület együttes hatására a sejt elpusztul.

A fent ismertetett PDT-eljárások tehát a sejtstruktúra roncsolásával vezetnek sejtpusztuláshoz.

Másrészt, a WO 96/07 432 számú nemzetközi közzétételi iratban olyan eljárásokat ismertetnek, amelyben a fotodinamikus hatást kihasználva egyébként membrán-impermeabilis molekulákat juttatnak sejtek citoszoljába úgy, hogy nem okoznak kiterjedt sejtkárosodást vagy sejtpusztulást. Ebben az eljárásban a molekula fotoszenzibilizáló vegyülettel együtt (közelebbről, endocitózissal) jut a sejt intracelluláris vezikulumába (például lizoszómába vagy endoszómába). Ezután, a sejtet a fotoszenzibilizáló vegyületet „aktiváló” fénynek tesszük ki, miáltal a vezikulum membránja megreped vagy szétszakad, és a vezikulum tartama, köztük a bejuttatott molekula kiszabadul a sejt belsejébe, azaz a citoszolba. Azt találták, hogy ezzel az eljárással a sejtek többségének működőképessége vagy életképessége nem károsodik. Az ilyen, „fotokémiai úton történő bejuttatásnak” („*photochemical internalisation*”; PCI) elnevezett eljárás alkalmazását javasolták különböző molekulák széles skálájának, például terápiás hatóanyagoknak citoszolba, azaz a sejt belső terébe történő bejuttatására.

Azt találtuk, hogy ilyen eljárás nem csak molekuláknak a sejt belső terébe történő bejuttatására alkalmazható előnyösen, hanem azok sejtfelületen történő prezentálására vagy expresszáltatására is. Miután tehát egy molekula a

sejt citoszoljába jutott, és ott felszabadult, a sejt felszínére kerülhet, ahol a sejt külső részén, például annak felszínén prezentálódhat. Ilyen eljárás különösen előnyösen alkalmazható vakcinázásra, ahol a vakcinakomponensek, azaz antigének vagy immunogének a sejtbe juttathatók úgy, hogy a sejt felszínén prezentálódjanak, ezáltal immunválaszt váltanak ki, annak kialakulását megkönnyítsék, vagy felerősítsék.

Általánosságban, a találmány tárgyát képező eljárás antigénmolekula vagy annak része sejt felszínén, előnyösen antigénprezentáló sejten történő expresszáltatására, amelyben valamely molekulát fotokémiai úton juttatunk be a sejt citoszoljába úgy, hogy a molekula vagy annak része a sejt felszínén prezentálódjék.

A leírás szerinti értelemben „expresszáltatáson” vagy „prezentálódáson” azt értjük, hogy a molekula vagy annak része a sejt felszínén jelenik meg úgy, hogy a molekula vagy annak legalább egy része a sejtet körülvevő környezetben van jelen, és hozzáférhető a sejtet körülvevő környezet számára. A „felszínén” történő expresszió megvalósítható oly módon, hogy az expresszálandó molekula érintkezzen a sejtmembránnal és/vagy a membránon jelen lévő vagy azon megjelenített komponensekkel.

Ilyen antigénprezentáció előnyösen immunválasz kialakulásához vezet, és előnyösen, az antigénmolekulát vagy annak részét tartalmazó vagy abból álló egységgel történő későbbi találkozással szemben védettséget eredményező immunválaszt

vált ki; következésképp, a találmány szerinti megoldás különösen előnyösen alkalmazható vakcinázásra.

Még közelebbről, a találmány egy szempontja szerint a találmány tárgyát képező eljárás antigénmolekula vagy annak része expresszáltatására a sejt felszínén, amely szerint:

a sejtet az antigénmolekulával és fotoszenzibilizáló vegyülettel érintkeztetjük, miáltal a molekula és fotoszenzibilizáló szer a sejt intracelluláris, membránnal határolt terébe (vezikulumába) kerül;

a sejtet a fotoszenzibilizáló szer aktiválására alkalmas hullámhosszú fénnel sugározzuk be úgy, hogy az intracelluláris vezikulum membránja megrepedjen, és a molekula a sejt citoszoljába jusson a sejt elpusztítása nélkül, miáltal a felszabadult antigénmolekula vagy annak része a sejt felszínén prezentálódik.

A leírás szerinti értelemben „megrepedt” vezikulumon azt értjük, hogy a vezikulum membránjának integritása végérvényesen vagy időlegesen elegendő mértékben károsodott ahhoz, hogy az abban található antigénmolekulák kiszabaduljanak belőle.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát képezik antigénmolekulát és fotoszenzibilizáló vegyületet tartalmazó készítmények antigénmolekula vagy annak része sejt felszínén történő expresszáltatására, ezáltal előnyösen, immunválasz stimulálására. Előnyösen, a készítmények gyógyászatiilag elfogadhatóak, és gyógyászatiilag elfogadható kötőanyagokat vagy hígítóanyagokat is tartalmaznak.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát antigénmolekula és fotoszenzibilizáló szer alkalmazása képezi az antigénmolekula vagy annak része sejtfelszínen történő expresszáltatására alkalmas gyógyszer előállítására, ezáltal immunválasz stimulálására.

A találmány egy még további szempontja szerint, szintén a találmány tárgyát képezi antigénmolekulát és fotoszenzibilizáló vegyületet tartalmazó kombinált készítmény - ahol a komponensek beadása történhet egyidejűleg, külön-külön vagy egymást követően -, antigénmolekula vagy annak része sejtfelszínen történő expresszáltatására, ezáltal előnyösen, immunválasz stimulálására.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát képezi reagenskészlet antigénmolekula vagy annak része sejtfelszínen történő expresszáltatására, amely:

az antigénmolekulát tartalmazó első tartályt; és
fotoszenzibilizáló vegyületet tartalmazó második tartályt
foglal magában.

A találmány szerinti megoldással összhangban, az antigénmolekula bármely molekula lehet, amennyiben az vagy annak része - az immunrendszernek megfelelő módon prezentálva - képes immunválasz kiváltására. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint tehát, az antigénmolekula vakcinaantigén vagy vakcinakomponens, például polipeptid-tartalmú entitás.

A technika állása szerint számos ilyen antigén vagy antigénhatású vakcinakomponens ismert, ilyen például vala-

mennyi bakteriális vagy virális antigén, vagy bármely patogén species antigénje vagy antigénkomponense, például paraziták vagy magasabb rendű organizmusok antigénjei vagy antigénkomponensei. Míg a vakcinák antigénkomponensei hagyományosan teljes (élő vagy elölt vagy attenuált) organizmusok voltak, azaz a vakcinák teljes sejt vakcinák voltak, egyre több vizsgálat és szakirodalomban leírás foglalkozik alegység vakcinákkal, azaz organizmusok meghatározott antigénkomponensein, például proteineken, peptideken vagy akár szénhidrátokon alapuló vakcinákkal. A találmány szerinti megoldásban antigénmolekulaként bármely ilyen „alegység” alapú vakcinakomponens alkalmazható. Előnyösen azonban peptidvakcinákat alkalmazunk. A találmány szerinti antigénmolekula tehát előnyösen peptid (amely a leírás szerinti értelemben lehet rövid vagy hosszú peptid, azaz peptid, oligopeptid vagy polipeptid, vagy proteinmolekula vagy annak fragmentuma, például 5-500, például 10-250, például 15-75 vagy 8-25 aminosavból álló peptid). Az expresszálandó vagy prezentálandó antigénmolekula részein előnyösen az antigénfeldolgozás során a sejtben keletkező fragmentumokat értünk. Ilyen fragmentumok keletkezhetnek azonban más módon is, amit az antigének megfelelő tervezésével (például pH-szenzitiv kötések beiktatásával) vagy más úton történő sejtfeldolgozással érhetünk el. Ezeknek a részeknek elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy immunválaszt váltsanak ki; például, a peptideknek több mint 5, például előnyösen több mint 10 vagy 20 aminosavból kell felépülniük.

A szakirodalomban nagyon sok peptidvakcina jelöltet leírtak, például vírusos betegségek és fertőzések kezelésére, például AIDS/HIV fertőzés, vagy influenza, kutya (canine) parvovirus, szarvasmarha leukémia vírus, hepatitis, stb. kezelésére (lásd például Phanuphak és mtsai.: Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 15(1), 41 (1997); Naruse: Hokkaido Igaku Zasshi 69(4), 811 (1994); Casa és mtsai.: J. Virol. 69(11), 7274 (1995); Belyakov mtsai.: Proc. Natl. Sci. USA 95(4), 1709 (1998); Naruse mtsai.: Proc. Natl. Sci. USA 91(20), 9588 (1996); Kabeya mtsai.: Vaccine 14(2) 1118 (1996); Itoh mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(23), 9174 (1986). Hasonlóképp, bakteriális peptideket, vagy akár más organizmusokból vagy speciekből származó peptidantigéneket is alkalmazhatunk.

Patogén organizmusokból származó antigéneken felül, peptideket alkalmazhatunk vakcinaként tumorok vagy más betegségek, például sclerosis multiplex ellen. Mutáns onkogén peptidek ígéretesnek tűnnek például tumorvakcina-antigénként történő alkalmazásra, citotoxikus T-limfocitaválasz stimulálására [Schirmacher: Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 121, 443 (1995); Curtis: Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers 17, 316 (1997)]. Egy szintetikus úton előállított peptidvakcinát arra nézve is megvizsgálták, hogy mennyire alkalmas áttétes melanoma kezelésére [Rosenberg és mtsai.: Nat. Med. 4(3), 321 (1998)]. Sclerosis multiplex kezelésére szánt T-sejt-receptor-peptidvakcinát írtak le Wilson és mtsai. [J. Neuroimmunol. 76(1), 15 (1997)]. A találmány szerinti

antigénmolekulaként bármely ilyen peptidvakcina-komponens alkalmazható, és valójában bármely peptid, amelynek peptidvakcinaként történő alkalmazását a szakirodalomban leírták vagy felvetették. A peptid lehet tehát szintetikus vagy izolált, vagy valamely organizmusból más módon származtatott peptid.

A találmány szerinti eljárásokban bármely sejtet alkalmazhatunk, amely képes felszínén a citoszoljába juttatott vagy szállított molekula expresszáására vagy prezentálására.

Mivel a találmány szerinti eljárás elsősorban antigénprezentálásra vagy vakcinázásra alkalmazható, a sejt általában immuneffektor-sejt, azaz az immunválaszban szerepet játszó sejt. Más sejtek is prezentálhatnak azonban antigéneket az immunrendszer számára, és ezek ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartoznak. Előnyösen tehát, a találmány szerinti sejtek antigénprezentáló sejtek. Az antigénprezentáló sejtek szerepet játszhatnak az immunválasz bármely vonatkozásában vagy „ágában”, ezen belül a humorális és sejt által közvetített immunitásban, például az ellenanyag-termelés stimulálásában, vagy „idegen” antigéneket felszínükön expresszáló sejtek felismerésében és elpusztításában (vagy más módon történő eltávolításában) potenciálisan részt vevő citotoxikus vagy ölősejtek stimulálásában. A leírás szerinti értelemben „immunválasz stimulálásán” értjük tehát bármely típusú immunválasz stimulálását, és annak bármely mechanizmussal történő stimulálását.

Citotoxikus sejtek vagy ellenanyagtermelő sejtek stimulálásához antigéneket kell prezentáltatnunk az antigénprezentáló sejtek által a stimulálandó sejteknek meghatározott módon, például MHCII-molekulákkal kapcsolatosan (CD8⁺ citotoxikus sejtek aktivációjához például MHCII-típusú antigénprezentálásra van szükség).

Antigénprezentáló sejtek a technika állása szerint ismertek, és azok leírása megtalálható a szakirodalomban; ilyen sejtek például limfociták (T- és B-limfociták), dendritikus sejtek, makrofágok, stb. További ilyen sejtek lehetnek tumorsejtek, például melanomasejtek.

Ahhoz, hogy antigéneket antigénprezentáló sejtek által citotoxikus T-sejtek (CTL-ek) számára prezentálhassunk, az antigénmolekulának be kell jutnia az antigénprezentáló sejt citoszoljába [Germain: Cell 76, 287 (1994)]. A találmány szerinti eljárással az antigénmolekula hatékonyan bejuttatható a citoszolba.

Miután az antigént a sejt citoszoljában a fotokémiai eljárással felszabadítottuk, az a sejt antigénfeldolgozó gépezete révén átalakul, és megfelelő módon, például MHCII-molekulákhoz kötődve a sejt felszínén prezentálódik. A feldolgozódás magában foglalhatja az antigén lebontását, például protein- vagy polipeptidantigén peptidekre történő lebontását, amelyek ezután az MHC-molekulákkal képeznek komplexet, és prezentálódnak. A találmány szerinti sejt felszínén expresszálandó vagy prezentálódó antigénmolekula tehát lehet a bejutott („endocitózissal bekerült”) antigénmolekula része vagy fragmentuma.

Az antigéneket endocitózis révén antigénprezentáló sejtek vehetik fel, ahol azok az endocita-vezikulumokban peptidekre bomolhatnak le. Ezek a peptidek az endoszómákban MHCII-molekulákhoz kötődhetnek, és a sejtfelszínre kerülhetnek, ahol peptid-MHCII-komplexeket CD4⁺ „T-helper” sejtek („segítő T-sejtek”) ismerhetik fel, és immunválaszt válthatnak ki. További lehetőség szerint, proteinek a citoszolban bomolhatnak le, például proteaszomák által, és TAP (antigénprezentálással kapcsolatos transzporter) révén az endoplazmatikus retikulumba juthatnak, ahol a peptidek MHCI-molekulákhoz kötődhetnek, és a sejt felszínére kerülhetnek az 1. ábrán bemutatottak szerint [Yewdell és Bennik: Adv. Immunol. 52, 1 (1992)]. Amennyiben a peptid idegen antigénből származik, a peptid-MHCI-komplexet CD8⁺ citotoxikus T-sejtek (CTL-ek) ismerik fel. A CTL-ek a peptid-MHCI-(HLA) komplexhez kötődnek, aktiválódnak, proliferálódni kezdenek, és CTL-klónokat képeznek. A célsejt vagy sejtfelszínükön ugyanazt a peptid-MHCI-komplexet hordozó egyéb célsejteket a CTL-klónok elpusztítják. Az idegen antigén ellen akkor jön létre immunválasz, ha az elegendő mennyiségben jut be a citoszolba [Yewdell és Bennik: (lásd fenn) (1992); Rock: Immunology Today 17, 131 (1996)].

Ez a mechanizmus képezi az alapját többek között tumorvakcinák kifejlesztésének. A gyakorlatban az jelenti a legnagyobb problémát, hogy miként juttassunk elegendő mennyiségű antigént (vagy antigénfragmentumot) a citoszolba. Erre kínál megoldást a találmány szerinti PCI-eljárás. Az eljárás elvét az 1. ábrán szemléltetjük; az ábrán látható, hogy

a PCI miként alkalmazható CTL-ek stimulálására. Az eljárás szerint, peptidet vagy proteint adunk extracellulárisan antigénprezentáló sejtekhez. P jelentése endocitózissal bejutott és PCI-eljárással felszabadított peptid. Ezután, a peptid vagy protein proteázok révén részlegesen lebontódik, és MHCI- (HLA) molekulákkal komplexet képezve a sejtfel-színre jut, ahol azt CTL-ek ismerhetik fel.

Amint azt a csatolt példákban részletesen leírjuk, ki-mutattuk, hogy a fotokémiai úton történő antigénbejuttatás hatékonyan alkalmazható tumorspecifikus antigének citoszol-ba történő bejuttatására.

Az antigénmolekulát és/vagy fotoszenzibilizáló vegyüle-tet meghatározott sejtekhez vagy szövetekhez irányíthatjuk például célzó-molekulák, például célspecifikus szállító-vagy hordozórendszerek vagy hordozómolekulák alkalmazásá-val. Az antigénmolekulát és/vagy fotoszenzibilizáló vegyü-letet eljuttathatjuk például a sejthez vektor- vagy hordo-zórendszer, például helyreállított („rekonstituált”) LDL-részecskék alkalmazásával. A hordozómolekulát összekapcsol-hatjuk vagy konjugálhatjuk az antigénmolekulával, a foto-szenzibilizáló vegyülettel vagy mindkettővel, és alkalmaz-hatunk azonos vagy különböző hordozómolekulákat. Az anti-génmolekulát és/vagy fotoszenzibilizáló vegyületet konju-gálhatjuk továbbá meghatározott helyre célzott ligandummal, például meghatározott sejttípusokra vagy meghatározott sejtstruktúrákra specifikus ligandummal, mint például bizo-nyos sejttípusokon expresszá-lódó felszíni antigént, például tumorspecifikus antigént felismerő ellenanyaggal. Ez a mec-

hanizmus fokozhatja a fotoszenzibilizáló vegyület és/vagy antigénmolekula receptor által közvetített endocitózis révén történő felvételét. Ilyen célzó molekulák, hordozók vagy vektorok alkalmazhatók továbbá az antigénmolekula és/vagy fotoszenzibilizáló vegyület intracelluláris térbe történő bejuttatására.

Az intracelluláris, membránnal határolt kamra lehet bármely, a sejtben található ilyen tér. Előnyösen, ez a tér membránvezikulum, elsősorban endoszóma vagy lizoszóma. Az intracelluláris kamra lehet továbbá Golgi-apparátus vagy endoplazmatikus retikulum. Csak arra van szükség, hogy az antigénmolekula és fotoszenzibilizáló vegyület ugyanabba az intracelluláris kamrába (kamrákba) jusson.

A fotokémiai úton történő bejuttatáson alapuló eljárás részletes leírása megtalálható a WO 96/07 432 számú nemzetközi közzétételi iratban (amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi). PDT- eljárásokra („*photodynamic treatment*”; fotodinamikus kezelési eljárásokra) vonatkozólag ugyancsak bőséges anyag áll rendelkezésre a szakirodalomban.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható fotoszenzibilizáló vegyület bármely vegyület lehet, amely intracelluláris terekbe, elsősorban endoszómákba vagy lizoszómákba jut. A technika állása szerint ilyen fotoszenzibilizáló vegyületek széles skálája ismert, és azok leírása megtalálható a szakirodalomban, például a WO 96/07 432 számú nemzetközi közzétételi iratban. Ebben a vonatkozásban megemlíten-dők a di- és tetraszulfonált alumínium-ftalocianin, szulfo-

nált tetrafenilporfinok (TPPS_n), níluskék, klorin-e_s származékok, uroporfirin I, filloeritrin, hematoporfirin és metilénkék, amelyekről kimutatták, hogy megtalálhatók természetben jelenlevő sejtek endoszómájában és lizoszómájában. Az említett vegyületek a legtöbb esetben endocitózis révén jutnak be.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, fotoszenzibilizáló vegyületeként alkalmazhatunk például porfirinokat, ftalocianinokat, purpurinokat, klorinokat, benzoporfirineket, naftalocianinokat, kationos festékeket, tetraciklineket vagy lizomotrópikus gyenge bázisokat vagy azok származékait [Berg és mtsai.: Photochemistry and Photobiology 65, 403 (1997)].

Fotoszenzibilizáló vegyületeként előnyösen alkalmazhatunk például TPPS₄-et [Zabner és mtsai.: J. Biol. Chem. 270, 18 997 (1995) 18 997 (1995)], TPPS_(2a)-t vagy AlPcS_(2a)-t.

A találmány szerinti megoldással összhangban, a fotokémiai úton történő bejuttatást végezhetjük a technika állása szerint ismert és szokásosan alkalmazott PDT-eljárásokkal vagy ilyen eljárások megfelelően módosított, a találmány szerinti eljárásban hatásos változataival. Az antigénmolekulát és fotoszenzibilizáló vegyületet a sejtekhez adhatjuk például a technika állása szerint ismert PDT-eljárások vonatkozásában ismert alkalmazási vagy adagolási eljárásokkal, az ilyen eljárásokkal kapcsolatban leírt módon.

A találmány szerinti eljárások alkalmazhatók *in vitro* vagy *in vivo*; *in situ* kezelésre vagy *ex vivo* kezelésre, amelyet kezelt sejtek beadása követ.

A találmány egy további szempontja szerint tehát, a találmány tárgyát antigénmolekulát vagy annak részét felszínén expresszáló antigénprezentáló sejt képezi, amely az említett eljárással állítható elő (vagy azzal lett előállítva). A találmány egy még további szempontja szerint, a találmány tárgyát képezi ilyen sejtek populációja vagy tenyésze, elsősorban ilyen sejtek életképes és funkcionálisan intakt populációja vagy tenyésze, valamint ilyen sejtek (vagy sejtpopulációk vagy -tenyészetek) alkalmazása kezelésre, közelebbről, immunválasz stimulálására, és elsősorban CTL-ek stimulálására.

A találmány tárgyát képezi továbbá ilyen sejtek (vagy sejtpopulációk vagy -tenyészetek) alkalmazása immunválasz, és elsősorban CTL-ek stimulálására alkalmas gyógyszer (például vakcinakészítmény) előállítására.

In vivo alkalmazás esetén, a készítményt bármely, a technika állása szerint ismert vagy szokásos módon beadhatjuk, például injektálással, infúzióval, lokálisan - belső vagy külső testfelületre -, stb. *In vivo*, a találmány szerinti megoldás bármely szövet esetében alkalmazható, amely tartalmazza a célsejteket, ezen belül testfolyadékokat tartalmazó terek és szilárd („solid”) szövetek esetében. Bármely szövet kezelhető, amennyiben a fotoszenzibilizáló vegyületet a célsejtek felveszik, és azokhoz fény megfelelően eljuttatható.



A találmány szerinti készítmény tehát bármely alkalmas módon formulázható, a gyógyszergyártásban ismert szokásos technológiákkal és eljárásokkal, például egy vagy több gyógyászatiilag elfogadható hordozó vagy kötőanyag alkalmazásával. A készítmények, hordozóanyagok, kötőanyagok természeté, az adagolás, stb. könnyen megválasztható a beadás kívánt módjának, a vakcinázás céljának, stb. megfelelően. Az adagok ugyancsak egyszerűen meghatározhatók, és azok mennyisége függhet az antigénmolekula természetétől, a vakcinázás céljától, a beteg korától, a beadás módjától, stb.; a fotoszenzibilizáló vegyülettel kapcsolatban az is figyelembe veendő, hogy az mennyire hatékony / képes besugárzás hatására membránok roncsolására.

A fényel történő besugárzást, a fotoszenzibilizáló vegyületet aktiválására, szintén a technika állása szerint jól ismert technológiákkal és eljárásokkal végezhetjük. A fény hullámhosszát és intenzitását az alkalmazott fotoszenzibilizáló vegyületnek megfelelően választhatjuk meg. Alkalmas fényforrások a technika állása szerint jól ismertek.

A korábbiakban már említettek, és a WO 93/14 142 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertettek szerint, az ily módon végzett fotokémiai bejuttatás nem károsítja a sejtek életképességét és működését. Közelebbről azt találtuk, hogy ha sejtek populációját vagy halmazát a találmány szerinti eljárással kezeljük, a sejtek többsége nem pusztul el, és lényegében funkcionálisan intakt állapotban túléli a kezelést.

A leírás szerinti értelemben, „a sejtek elpusztítása nélkül” kifejezésen a fenti állapotot értünk. Más szóval, a kifejezésen azt értjük, hogy a sejtek populációjában vagy halmazában lényegében valamennyi sejt életben marad, vagy a sejtek jelentős többsége (például azok legalább 75%-a, előnyösebben legalább 80%-a, 85%-a, 90%-a vagy 95%-a) nem pusztul el.

Világos, hogy amikor sejtek populációját vagy halmazát fénysugárzásnak tesszük ki, lehetséges, hogy a sejtek egy bizonyos csoportja vagy a szövet bizonyos része több fényt kap vagy más módon nagyobb PCI-hatásnak lesz kitéve, mint a sejtek más csoportjai vagy a szövet egyéb részei.

A sejtek túlélésére vonatkozó százalékos értékek tehát nem szükségszerűen érvényesek egyformán a teljes besugárzott populáció minden részére, és azok a besugárzott populációban maradt élő sejtek százalékos arányára vonatkoznak, csupán azzal a megkötéssel, hogy a besugárzott sejtek elegendő része maradjon életben. Az említetteken felül, a besugárzással kiváltott sejtpusztulás bizonyos időt, például több órát vehet igénybe. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a végsősoron elpusztuló sejtek is képesek lehetnek felszínükön antigénmolekulákat expresszálni, ezáltal azok is szerepet játszhatnak a találmány szerinti eljárásokban, alkalmazásokban, stb. Ennek megfelelően, a százalékos (%) sejtpusztulás a sejtek azon részére vonatkozik, amelyek életben maradnak a besugárzást követő néhány órán át (például a besugárzást követően 4 óráig), de elő-

nyösen azokra a sejtekre vonatkozik, amelyek 4 óráig vagy annál tovább maradnak életben a besugárzást követően.

A találmány szerinti eljárások úgy módosíthatók, hogy a fénydózis és a fotoszenzibilizáló vegyület koncentrációja egymáshoz viszonyított arányának megválasztásával a szabályozás a túlélő sejtek egy részét vagy bizonyos hányadát érintse. Ismét, ilyen eljárások a technika állása szerint ismertek.

A találmány szerinti eljárás hatékony módot kínál antigénmolekulák széles skálájának bejuttatására. A találmány szerinti eljárás számos olyan jellemzővel bír, amely különösen alkalmassá teszi vakcina bejuttatásra: 1) nem korlátozza a bejuttatandó molekula mérete, amennyiben azt a célsejt képes endocitózissal felvenni; 2) sejtproliferációtól független; 3) helyspecifikus, amennyiben csak a fénynek kitett területeken fejti ki hatását; és 4) nem onkogén. Ezen felül, fotokémiai bejuttatási eljárást kombinálhatjuk egyéb elveken alapuló eljárásokkal, hogy hely- vagy szövet-specifikus droghatást érjünk el, például úgy, hogy azt specifikus ligandumokkal célzottan sejtfelszíni struktúrákhoz juttatjuk el, szövetspecifitást kölcsönző szabályozó génelemeket alkalmazunk, vagy betegség-specifikus hatóanyagokat alkalmazunk, miáltal lényegében szinergista hatást érhetünk el a hatóanyagok célsejtekre kifejtett specifitása vonatkozásában.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban konkrét megvalósítási példákon és a csatolt ábrákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az

ismertetettekre korlátoznánk. Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán azt szemléltetjük vázlatosan, hogy a PCI miként alkalmazható CTL-ek stimulálására. Peptidet vagy proteint (P) adunk extracellulárisan antigénprezentáló sejtekhez. P endocitózissal a sejtbe jut, és PCI révén a citoszolba szabadul ki. Ezután, a peptid vagy protein proteaszomák révén részlegesen lebontódik, és MHC I- (HLA-) molekulával kapcsolódva a sejtfelszínre jut, ahol a komplex felismerhetővé válik CTL-ek számára.

A 2. ábrán peptid fotokémiai úton kiváltott átrendeződését mutatjuk be. BL2-G-E6-sejteket inkubáltunk fluoreszcenncel jelölt P21^{Flu}-eredetű 5-21 Val¹²-peptiddel és AlPcS_{2a}-val. A sejteket fluoreszcens mikroszkóppal fluoreszcenncel jelölt peptid és AlPcS_{2a} elhelyezkedésére vizsgáltuk az előtt (felső képek) és 30 perccel azután (alsó képek), hogy a sejteket 4 percig vörös fénynek tettük ki. A vonal 20 µm-t jelent.

A 3. ábrán CD8⁺ T-limfocitaklon citotoxicitását mutatjuk be FM3-melanomasejtekre MART-1-peptid PCI-eljárással történő bejuttatását követően.

A 4. ábrán azt szemléltetjük, hogy a PCI alkalmas HRP bejuttatására a citoszolba. NHIK-3025-sejteket kezeltünk 3,2 µg/ml TPPS_{2a}-val és 1 mg/ml HRP-vel, 18 órán át. Ezután, a tápközeget hatóanyagmentes tápközegre cseréltük, majd a sejteket az ábrán jelölt dózissal fénynek tettük ki. Meghatároztuk a HRP-aktivitást intakt sejtekben (●), és elektropermeabilizálás és sűrűséggradiens-centrifugálás

A

technológiákkal a citoszolmentes sejtalkotóktól (▼) szétválasztott a citoszolban (X).

Az 5. ábrán GFP fotokémiai úton kiváltott expresszióját ábrázoltuk. A: GFP expressziója pEGFP-N1-pLys-kompleksszel $AlPcS_{2a}$ és fény nélkül kezelt THX-sejtekben, valamint $AlPcS$ jelenlétében, az ábrán jelölt ideig történő fénykezelést követően. A sejteket áramlásos citometriával analizáltuk, a vonaltól jobbra eső sejteket tekintettük pozitívnak GFP-expresszióra nézve. B: GFP-expresszió 18 óráig fotoszenzibilizáló vegyülettel ($20 \mu g/ml$ $AlPcS_{2a}$ vagy $0,25 \mu g/ml$ 3-THPP) kezelt, majd 6 óráig pEGFP-N1-pLys-kompleksszel transzfektált, a sejtek 50%-át inaktiváló fénynek kitett THX-sejtekben. A GFP-expressziót áramlásos citometriával analizáltuk az 5.A. ábránál leírtak szerint.

Besugárzás

Két különböző, 4-4 fluoreszcens csőnyalábot tartalmazó fényforrást alkalmaztunk a sejtek kezelésére. $TPPS_4$ -vel, $TPPS_{2a}$ -val és 3-THPP-vel (Porphyrin Products, Logan, UT) kezelt sejteket kék fénynek tettünk ki („Model 3026” készülék alkalmazásával; Appl. Photophysics, London, UK) úgy, hogy a sejteket $1,5 mW/cm^2$ fényintenzitás érje; míg az $AlPcS_{2a}$ -vel (Porphyrin Products, Logan, UT) kezelt sejteket „Cinemoid 35” filteren szűrt vörös fénynek tettük ki (Philips TL 20W/09) úgy, hogy a sejteket $1,35 mW/cm^2$ fényintenzitás érje.

Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat

A sejteket fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk Berg K. és mtsai. által leírtak szerint [Biochem. Biophys. Acta

1370, 317 (1998)]. Fluoreszcenciával jelölt molekulák vizsgálatához a mikroszkópot 450-490 nm gerjesztő filterrel, 510 nm dikroikus sugárnyaláb-felbontóval és 510-540 nm sávszűrő emissziós filterrel szereltük fel.

Plazmid-pLys-komplexek előállítása, és sejtek kezelése

Plazmid-pLys-komplexeket (komponensarány: 1,7) oly módon állítottunk elő, hogy 5 µg plazmidot (pEGFP-N1 Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA) - 75 µl HBS-ben - óvatosan 5,3 µg pLys-vel (molekulatömeg: 20 700; Sigma, St. Louis, MO) elegyítettünk, 75 µl HBS-ben. Az oldatot 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, tápközeggel hígítottuk, és a sejtekhez adtuk.

THX-sejteket inkubáltunk 20 µg/ml AlPcS_{2a}-val 18 óráig, 37°C-on, majd a sejteket mostuk, és 3 órán át szenzibilizáló vegyülettől mentes tápközeggel, majd 2 órán át plazmid-pLys-komplexekkel inkubáltuk. A pEGFP-N1/pLys-kezelt THX-sejteket egyszer mostuk, 2 órán át adalékokat nem tartalmazó tenyésztő tápközeggel inkubáltuk, majd fénynek tettük ki.

A sejteket 2 napig 37°C-on inkubáltuk, azokból szubkulturát készítettünk, és további 5 napon át inkubáltuk, mielőtt a GFP-expressziót áramlásos citometriával analizáltuk.

HCT-116-sejteket inkubáltunk 20 µg/ml AlPcS_{2a}-val 18 óráig, majd a sejteket mostuk, és 6 órán át plazmid-pLys-kompleksszel transzfektáltuk azt megelőzően, hogy plazmidmentes tápközegben fénynek tettük ki.

Miután a sejteket 40 órán át, 37°C-on inkubáltuk, a GFP-expressziót mikroszkóppal vizsgáltuk.

Analízis áramlásos citometriával

A sejteket tripszineztek, centrifugáltuk, 400 µl tenyésztő tápközegben szuszpendáltuk, és 50 µm átmérőig átteresztő nylon filteren átszűrtük. Ezután, a sejteket "FACStar plus" áramlásos citométerben analizáltuk (Becton Dickinson). A zöld fluoreszcens proteint (GFP) 510-530 nm filteren át mértük 488 nm-re hangolt argonlézerrel (200 mW) történő gerjesztést követően. Az AlPcS_{2a}-t 650 nm longpass filteren át mértük 351-356 nm-re hangolt kriptonlézerrel (50 mW) történő gerjesztést követően. Sejtdubletteket a GFP fluoreszcenciajelének megfelelő impulzusszélességre történő kapuzással különítettünk el az egyedülálló sejtektől. Az adatokat "PC Lysys II" programcsomaggal analizáltuk (Becton Dickinson).

Fluoreszcenccel jelölt peptid előállítás, és sejtek kezelése

A fluoreszcenccel jelölt Val¹²-p21^{ras}-peptidet (5-21 aminosavakat) Alan Cuthbertson szintetizálta és bocsátotta rendelkezésünkre. BL2-G-E6-sejteket inkubáltunk 30 µg/ml fluoreszcenccel jelölt p21^{ras}-eredetű peptiddel 18 órán át, majd AlPcS_{2a}-val 18 órán át, végül hatóanyagmentes tápközegben 1 órán át, mielőtt azokat vörös fénynek tettük ki.

1. példa

„Fotokémiai úton történő bejuttatási eljárás („photochemical internalisation”; PCI) alkalmas peptidok sejtek citoszoljába juttatására

Annak megállapítására, hogy a PCI-eljárás mennyiben alkalmas tumorspecifikus peptidok citoszolba történő bejuttatására, fluoreszceinnel jelölt, az 5-21. aminosavakat tartalmazó, Val¹²-mutációt hordozó p21^{ras}-peptidet (G12V) alkalmaztunk [Gjertsen M.K. és mtsai.: Int. J. Cancer 72, 784 (1997)]. BL2-6 elnevezésű egér-fibroblasztokban, a ras-peptid elhelyezkedése jó egyezést mutatott az AlPcS_{2a} lokalizációjával, ami a peptid endocitózissal történő felvételére utal (2. ábra). Miután a sejteket 4 percig fénynek tettük ki, a fluoreszceinnel jelölt ras-peptid és az AlPcS_{2a} diffúz módon a citoplazmában oszlott el. Hasonló hatást nem figyeltünk meg a csak fluoreszceinnel jelölt ras-peptiddel kezelt és fénynek kitett sejtekben (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel).

2. példa

PCI alkalmazása antigénprezentáció kiváltására és CD8⁺ T-limfociták által közvetített sejtpusztulás

Tíz (10) % borjúszérummal („fetal calf serum”; FCS) kiegészített RPMI-1640-tápközegben tenyésztett, MART-1-peptidet nem expresszáló FM3-melanomasejteket (2x10⁵/lyuk, 6 lyukú lemezek) 10 µg/ml AlPcS_{2a} fotoszenzibilizáló vegyülettel kezeltünk 18 órán át. Ezután, a sejteket EDTA-val, Dulbecco-féle foszfátpufferes fiziológiás sóoldatban levá-

lasztottuk (PBS) a hordozóról, és oldatban tartottuk, miá-
latt a sejteket 1 órán át, 100% FCS-ben, ^{51}Cr -mal
(60 $\mu\text{Ci/ml}$ Na_2CrO_4) feltöltöttük, majd 5 órán át, 10% FCS-t
tartalmazó RPMI-1640-tápközegben 5 $\mu\text{g/ml}$ MART-1-peptiddel
inkubáltuk; eközben a sejteket folyamatosan oldatban tar-
tottuk. A MART-1-peptid a következő szevenciájú volt:
TAEFAAGIGILTVILG. Ezután, a sejteket 10% FCS-t tartalmazó
RPMI-1640-tápközeggel kétszer mostuk, és 96-lyukú lemezekre
oltottuk (2000/lyuk sűrűségben, 100 μl tápközegben (RPMI-
1640 - 10% FCS). Ezt követően, a sejteket a 3. ábrán jelölt
ideig „Cinemoid 35” filteren szűrt fénynek tettük ki (Phi-
lips TL 20W/09) úgy, hogy a sejteket 1,35 mW/cm^2 fényinten-
zítás érje [Rodal és mtsai.: J. Photochem. Photobiol. B:
Biol. 45, 150 (1998)]. Tizennyolc (18) órával a fénykeze-
lést követően a tápközeget eltávolítottuk, és MART-1 / HLA-
A2-specifikus citotoxikus T-límfcitákat (CTL-sejteket,
40 000/lyuk, 100 μl térfogatban) tartalmazó tápközeget ad-
tunk a sejtekhez. Négy (4) órás inkubációt követően, a táp-
közeget elválasztottuk az FM3-sejtektől, és meghatároztuk a
tápközegbe kibocsátott ^{51}Cr mennyiségét (a lizálódott sej-
tek számának mutatójaként), valamint a korábbiakban ismer-
tetettek szerint mértük a spontán és maximális ^{51}Cr -
felszabadulást [Fossum és mtsai.: Cancer Immunol.
Immunother. 40, 165 (1995)]. A specifikus krómfelszabadulás
százalékos arányát a következő képlet alapján számítottuk:
[(kísérletben mért felszabadulás - spontán felszabadu-
lás)/(maximális felszabadulás - spontán felszabadulás) x 100.
A 3. ábrán bemutatott eredmények alapján látható, hogy az



FM3-sejtek MART-1-peptid PCI-eljárással történő bejuttatását követően fénydependens módon érzékennyé válnak CD8⁺ T-limfociták citotoxikus hatására.

3. példa

A PCI kiváltja az endocitált molekula nagy részének felszabadulását

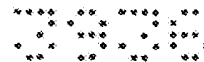
A címben szereplő állítást tormaperoxidáz (HRP) PCI által indukált internalizációja/endocitózisa segítségével igazoltuk.

HRP alkalmazásával kimutattuk (lásd 4. ábra), hogy a PCI az endocitált HRP nagy részének (>60%-ának) citoszolba történő felszabadulását eredményezi.

A végrehajtott kísérletben NHIK 3025 sejteket (humán cervix-ből származó in situ karcinómasejtek) kezeltünk a TPPS_{2a} jelű fotoszenzibilizáló ágenssel (3,2 µg/ml) és 1 mg/ml HRP-vel, 18 órán keresztül. Ezt követően a tápközeget hatóanyagmentes tápközegre cseréltük a 4. ábrán bemutatott hosszúságú fénydózisokkal történő kezelést megelőzően. A HRP-aktivitást Steinman és mtsai. (J. Cell. Biol. 68: 665-687, 1976.) publikációja szerint határoztuk meg. A citoszolt a citoszolmentes sejtalkotóktól elektropermeabilizálással és sűrűséggrádiens-centrifugálásos technikával választottuk el (Berg és mtsai., Int. J. Cancer 59: 814-822, 1994.).

4. példa

A PCI alkalmas funkcionális gének hatékonyabb szállítására



Ennek szemléltetésére, THX-sejteket transzfektáltunk zöld fluoreszcens proteínt (GFP) kódoló plazmid (pEGFP-N1) pLys-komplexével. A GFP expresszióját áramlásos citometriával (5.A és 5.B ábrák) és fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). Az 5.A ábrán látható, hogy az AlPcS_{2a} és fénykezelés a GFP-t expresszáló sejtek százalékos arányának nagyfokú fokozódásához vezetett. A riportertermolekulára pozitív sejtek aránya a fénykezelés nélkül mérhető 1%-ról 50%-ra emelkedett 5 perces fénykezelést követően. A GFP-expresszió fény hatására nem nőtt azokban a sejtekben, amelyeket pEGFP-pLys-kompleksszel kezeltünk fotoszenzibilizáló vegyület hiányában. Egy semleges plazmid (humán oxigenázt kódoló plazmid) és pLys komplexe nem indukált zöld fluoreszcenciát AlPcS_{2a} -val és fénykezeléssel kombinálva (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). Következésképp, a PCI fénydependes módon, jelentős mértékben képes fokozni funkcionális gének transzfekciójának hatékonyságát THX-sejtekbe. Hasonló eredményeket kaptunk TPPS_2 fotoszenzibilizálóként, BHK-21- és HCT-116-sejtek célsejteként történő alkalmazásával (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). A 3-THHP elnevezésű, alapvetően nem lizoszómális lokalizációjú szenzibilizáló vegyület csak kismértékben fokozta a GFP expresszióját (5.B ábra). A pLys-vel komplexet nem képző pEGFP-N1 PCI-eljárással történő bejuttatása nem indukálta a GFP expresszióját (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel).



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *In vitro* eljárás antigén-molekula vagy annak része expresszáltatására limfocita, dendritikus sejt és makrofág közül választott antigén-prezentáló sejt felszínén, *azzal jellemezve*, hogy egy molekulát fotokémiai úton a sejt citoszoljába juttatunk, miáltal a molekula vagy annak része a sejt felszínén prezentálódik.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejtet az antigén-molekulával vagy annak részével és fotoszenzibilizáló vegyülettel érintkeztetjük, miáltal a molekula és fotoszenzibilizáló vegyület a sejt egy intracelluláris, membránnal határolt térrészébe jut;

a sejtet a fotoszenzibilizáló vegyület aktiválására alkalmas hullámhosszú fényvel sugározzuk be, miáltal az intracelluláris térrész membránja megreped, és a molekula a sejt citoszoljába jut a sejt elpusztítása nélkül, majd a felszabadult antigén-molekula vagy annak része a sejt felszínén prezentálódik.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immunválasz stimulálására képes antigén-molekulát expresszáltatunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigén-molekulaként vakcinaantigént vagy vakcinakomponenst expresszáltatunk.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigén-molekulaként pepidet expresszáltatunk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejtet fotoszenzibilizáló vegyületként porfirinnal, ftalocianinnal, purpurinnal, klorinnal, benzoporfirinrel, naftalocianinnal, kationos festékkel, tetraciklinnel vagy lizomotrópikus gyenge bázissal vagy azok valamilyen származékával érintkeztetjük.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fotoszenzibilizáló vegyületként $\text{TPPS}_{4^{-}}$, $\text{TPPS}_{2a^{-}}$ vagy $\text{AlPcS}_{2a^{-}}$ -molekulát alkalmazunk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antigén-molekulát és/vagy fotoszenzibilizáló vegyületet egy vagy több célbajuttató- vagy hordozómolekulához kapcsoljuk.

9. Antigén-molekula és fotoszenzibilizáló vegyület alkalmazása az antigén-molekula vagy annak része sejtfelszínén történő expresszáltatására és ezáltal immunválasz vagy CTL-ek stimulálására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a sejtet az antigén-molekulával és fotoszenzibilizáló vegyülettel érintkeztetjük, miáltal a molekula és fotoszenzibilizáló vegyület a sejt egy intracelluláris, membránnal határolt térrészébe jut;

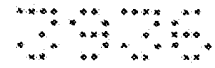
a sejtet a fotoszenzibilizáló vegyület aktiválására alkalmas hullámhosszú fényvel sugározzuk be, miáltal az intracelluláris térrész membránja megreped, és a molekula a sejt citoszoljába jut a sejt elpusztítása nélkül; és

a felszabadult antigén-molekula vagy annak része a sejt felszínén prezentálódik.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol antigén-molekulaként az előző igénypontok bármelyikében definiált antigén-molekulát, fotoszenzibilizáló vegyületként az előző igénypontok bármelyikében definiált fotoszenzibilizáló vegyületet, és sejtként az előző igénypontok bármelyikében definiált sejtet alkalmazunk.

12. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, vakcinázásra alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

13. A 9-12. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, vírusos betegségek, tumor vagy *sclerosis multiplex* kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.




14. Az 1-5. vagy 8. igénypontok bármelyikében definiált antigén-molekulát, valamint a 2. vagy 6-8. igénypontok bármelyikében definiált fotoszenzibilizáló vegyületet tartalmazó kombinált készítmény egyidejűleg, külön-külön vagy egymást követően – antigén-molekula vagy annak része sejtfelszínen való expresszáltatására – történő alkalmazásra.

15. Reagenskészlet antigén-molekula vagy annak része sejtfelszínen történő expresszáltatására történő alkalmazásra, amely reagenskészlet

1-5. vagy 8. igénypontok bármelyikében definiált antigén-molekulát tartalmazó első tartályt; és

2. vagy 6-8. igénypontok bármelyikében definiált fotoszenzibilizáló vegyületet tartalmazó második tartályt tartalmaz.

30 lap
3 ábralap

33 oldal


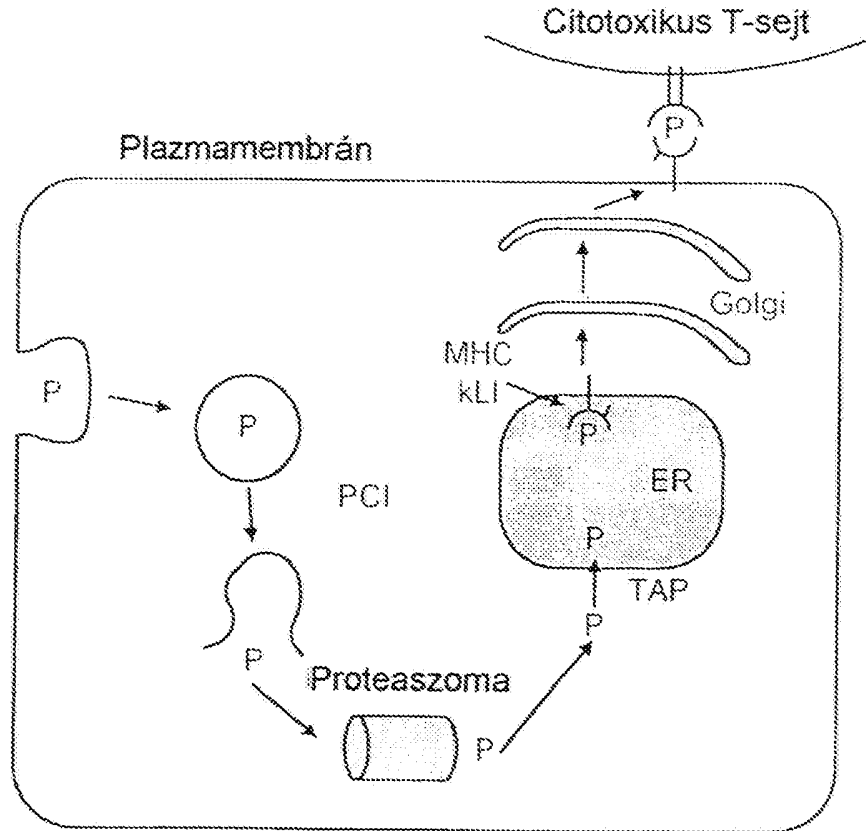
A meghatalmazott:

DANUBIA

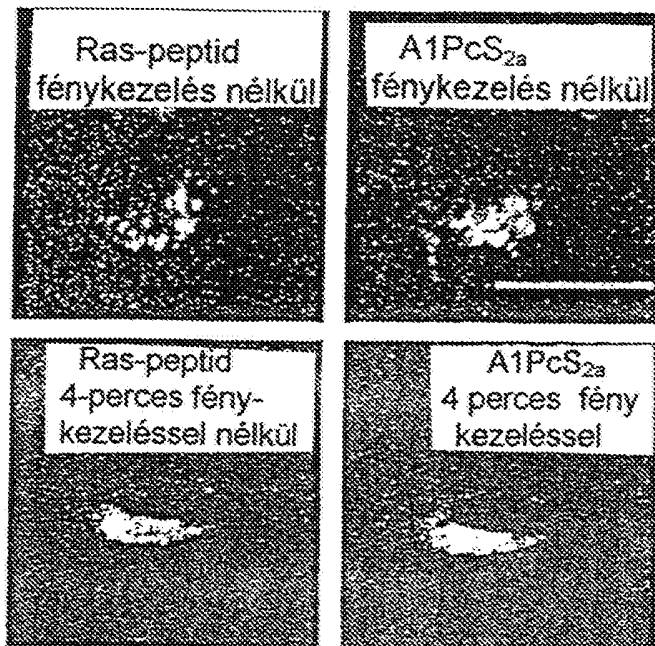
Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.


Dr. Bethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

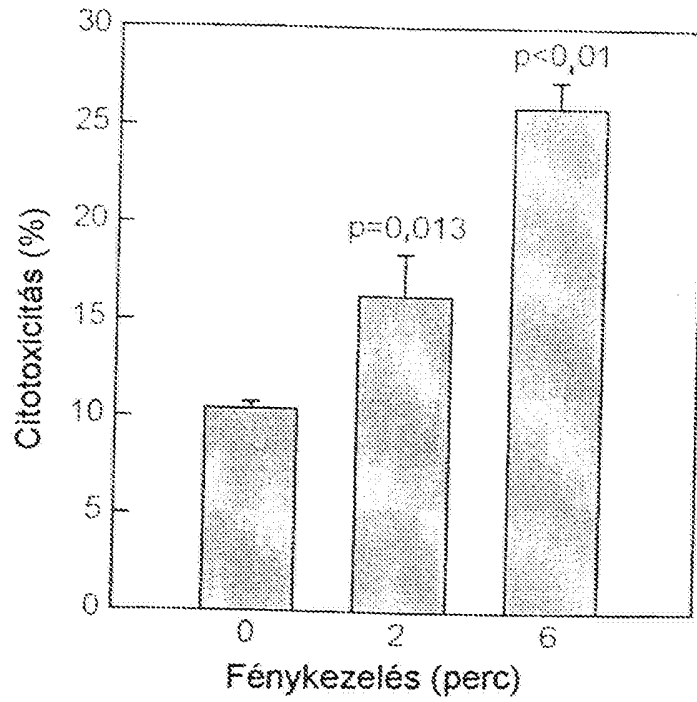


1. ábra

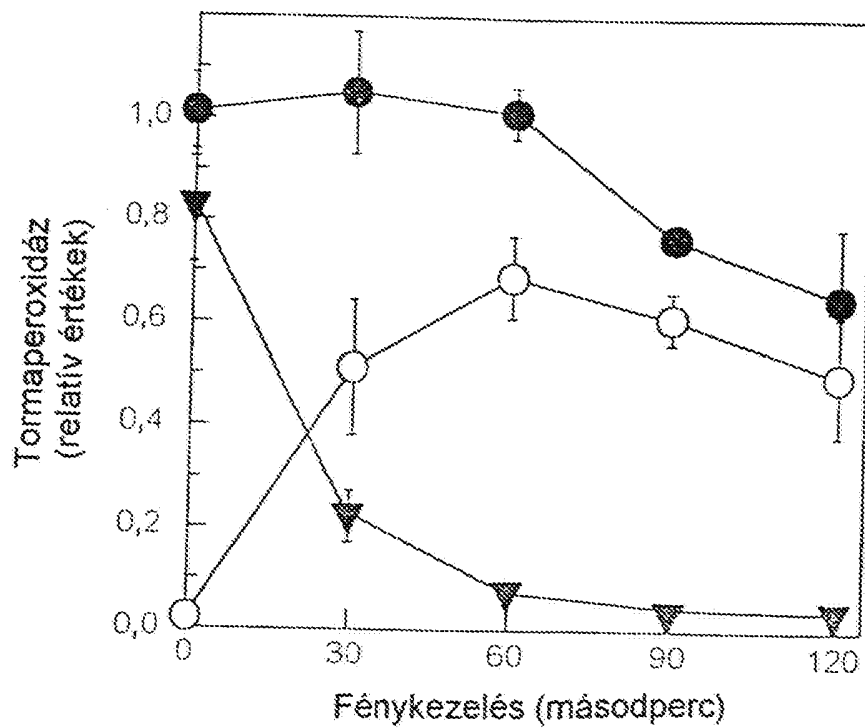


2. ábra

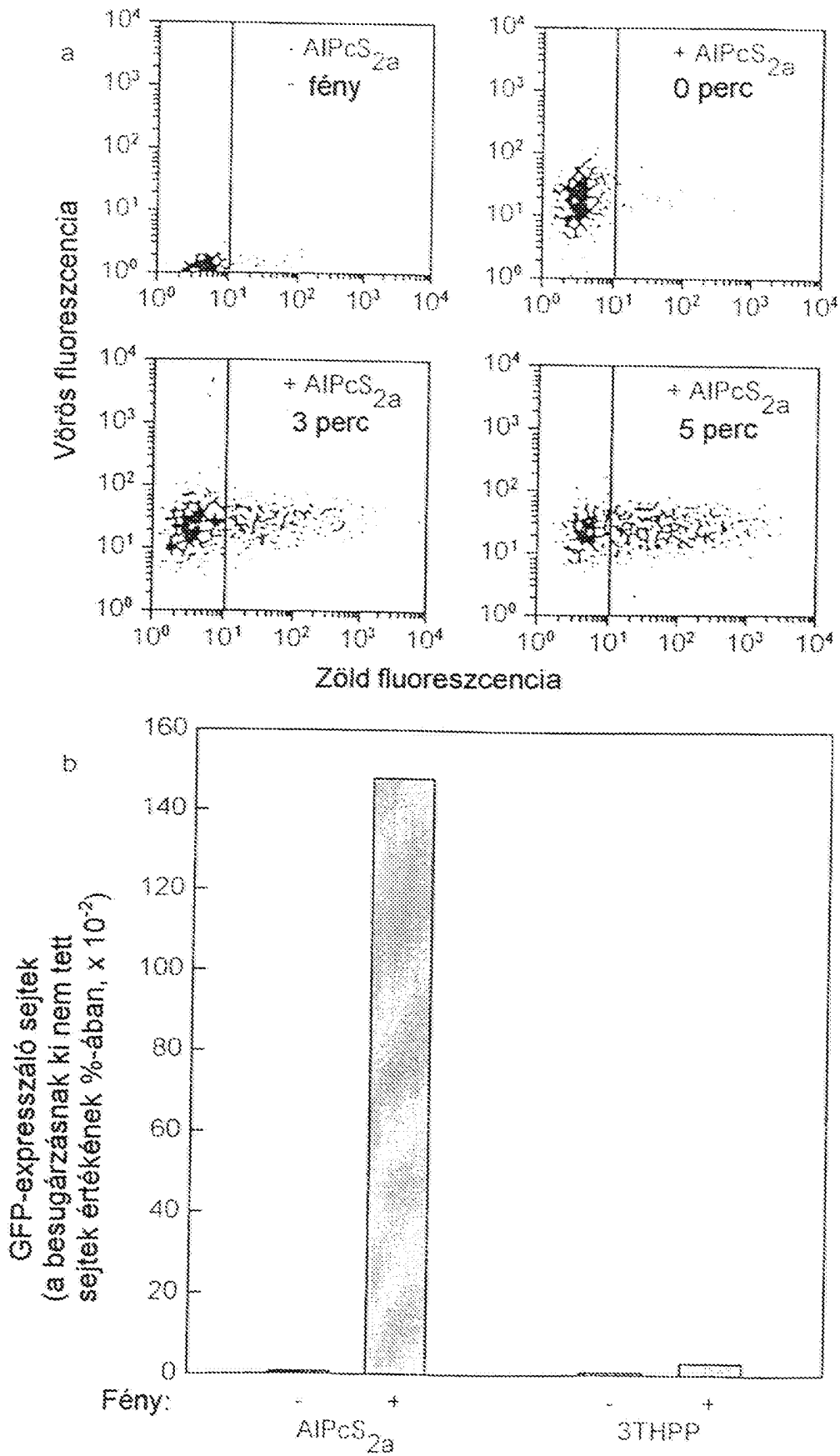
PCT/GB00/00903



3. ábra



4. ábra



5. ábra