

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

212 924 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 5459/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 05. 24.
(30) Elsőbbségi adatok:
357 035 1989. 05. 25. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/02954
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/14837

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 37/10

A 61 K 37/22

(40) A közzététel napja: 1992. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1996. 12. 30.

(72) Feltalálók:

Barchfeld, Gail, Alameda, Kalifornia (US)
van Nest, Gary, El Sobrante, Kalifornia (US)
Ott, Gary, Livermore, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Chiron Corp., Emeryville, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

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

(54) **Szubmikronális olajcsepp-emulziót tartalmazó adjuváns készítmény**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya adjuváns készítmény, mely

- (1) egy metabolizálható olajat és
(2) egy vagy több emulgeálószer tartalmaz, ahol az
említett olaj és az említett emulgeálószer olajcsep-
pecskéket tartalmazó olaj-a-vízben emulzió formá-
jában van jelen,

melyre jellemző, hogy az olajcseppek számának leg-
alább 80%-a 0,5 µm-nél kisebb átmérőjű, és a készít-
mény polioxi-propilén-polioxi-etilén tömbkopolimer-
től vagy tokoltól mentes.

A jelen találmány vakcinák hatásosságának fokozására alkalmas immunológiai adjuvánsokra vonatkozik, ezen belül olaj-víz emulziókat tartalmazó adjuvánsokra, melyek egy metabolizálható olajat és emulgeálószer tartalmaznak olaj-a-vízben emulzió formájában, ahol az olajcseppek számának legalább 80%-a 0,5 µm-nél kisebb átmérőjű és a készítmény tömbkopolimertől mentes.

A rekombináns technológiával előállított új alegység vakcinák (subunit vaccines) megjelenésével fokozódott az igény a biztonságos és hatékony adjuvánsok előállítására. A hagyományos élő vírust tartalmazó vakcinák nem igényeltek adjuvánsokat. Az elpusztított vírusok alkalmazásával létrehozott vakcinák általában sokkal erősebb immunogenitással rendelkeznek, mint az alegység vakcinák, és sokkal hatékonyabban működnek adjuvánsok nélkül, vagy azokkal együtt, melyek az immun választ stimuláló képességgel rendelkeznek. Az új, rekombináns eredetű alegység vakcinák a biztonság, és a termelési költségek szempontjából a hagyományos vakcinákkal szemben jelentős előnyökkel rendelkeznek, és általában izolált fehérjékből, vagy fehérje elegyekből állnak, melyek a teljes vírussal összehasonlítva korlátozott immunogenitással rendelkeznek. Az ilyen anyagokra a jelen találmány során általánosságban mint molekuláris antigénekre hivatkozunk, ezzel megkülönböztetjük ezeket az eddig vakcinaként alkalmazott teljes szervezetektől (vagy azok részeitől). Ezek a vakcinák a betegség gátlásának eléréséhez szükséges teljes hatékonyságuk kifejtéséhez jelentős immunstimulátor képességgel rendelkező adjuvánsokat igényelnek.

Jelenleg az Amerikai Egyesült Államokban humán alkalmazásra engedélyezett adjuvánsok kizárólag a timósói lehetnek (alum). Ezeket az adjuvánsokat alkalmazzzák az egyes vakcinákban, így például a hepatitisz B, a gyermekparalízis, a veszettség és az influenza ellen, de ugyanakkor nem alkalmazhatók más, például sejt-közvetített immunitás stimulálását igénylő védelem esetén. A beszámoló az azt mutatják, hogy a timósó alkalmazásának tökéletesítésére irányuló eljárások sikertelennek bizonyultak a számarköhögés és a tifuszos vakcinák hatékonyságának fokozására, és csak kis mértékű hatást értek el az adenovírus vakcinák esetében. A timósó sok esetén felmerült problémák közé tartozik a granulómák indukálása a befecskendezés helyén, és a timósó készítmények módosulása az egyes tételek esetében.

A teljes Freund-féle adjuváns (complete Freund's adjuvant) (CFA) hatékony immunstimulátor, melyet kísérleti jelleggel számos antigén esetében sikeresen alkalmaztak. A CFA három alkotót tartalmaz: egy ásványi olajat, egy emulzifikáló anyagot, például Arlacel-A-t, és elölt mikrobaktériumot, például *Mycobacterium tuberculosis*. A vizes antigén oldatot ezekkel az alkotókkal elegyítjük, így víz-olaj emulziót hozunk létre. Azonban a CFA számos mellékhatást okoz, így fájdalmat, kelések képződését és lázat, ezek megakadályozzák a humán és az állategészségügyi célokra történő felhasználását. A nem teljes Freund-

féle adjuváns (incomplete Freund's adjuvant) (IFA) a CFA-hoz hasonló anyag, de nem tartalmaz bakteriális alkotót. Bár az IFA az Amerikai Egyesült Államokban humán alkalmazásra nem engedélyezett, más országokban számos vakcina típus esetében alkalmazták. Az IFA-t sikeresen alkalmazták humán esetekben, így például a gyermekparalízis és az influenza ellen, valamint számos állati vakcinához, beleértve a veszettséget, a kutya-betegséget és a száj- és köröm-fájást. A kísérletek eredményei szerint mind az olaj, mind az emulzifikáló anyag, melyet az IFA-ban alkalmaztak, az egereknél rákot okoz, ez azt mutatja, hogy humán alkalmazás esetén célszerű lenne egy alternatív adjuváns bevezetése.

A muramil-dipeptid (MDP) a mikobakteriális sejt-fal-komplex legkisebb egysége, mely a CFA esetében megfigyelt hatásjavító aktivitást hozza létre; lásd Ello-uz és társai (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59:1317. Az MDP számos szintetikus analógját hozták létre, melyek széles körű adjuváns hatással és mellékhatásokkal rendelkeznek [Chedid és társai (1978) *Prog. Allergy*, 25:63]. Az a három analóg, melyek különösképpen megfelelőek a vakcina adjuvánsként történő alkalmazásra, az MDP treonil származéka, lásd Byars és társai (1987) *Vaccine*, 5:23; az MDP N-butil származéka, lásd Chedid és társai (1982) *Infect. and Immun.*, 35:417; és a muramil-tripeptid lipofilezett származéka, lásd Gisler és társai (1981) *Immunomodulation of Microbial Products and Related Synthetic Compounds*, Y. Yamamura és S. Kotani, eds., *Excerpta Medica*, Amsterdam, p. 167. Ezek a vegyületek hatásosan stimulálják a humorális és a sejt-közvetített immunitást, és csak kis mértékű toxicitással rendelkeznek.

Egy sokat ígérő lipofilezett MDP származék az N-acetil-muramil-L-alanin-D-izoglutaminil-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3,3-(hidroxifoszforil-oxi)]-etilamid (MTP-PE). Ez a muramil-tripeptid foszfolipid végződéseket tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a molekula hidrofób részének a környezet lipid részével való asszociációját, míg a muramil-tripeptid rész a környezet lipid részével asszociálódik. Így maga az MTP-PE is szerepelhet emulzifikáló szerként, stabil olaj-a-vízben emulziók létrehozásakor.

A jelen feltalálók MTP-PE-vel elvégzett laboratóriumi kísérletei azt mutatták, hogy az az adjuváns hatásosan stimulálta az anti-HSV gD antitestek titerét a herpes simplex vírus gD antigén ellen, és ezt a hatást rendkívüli mértékben fokozta, amikor az MTP-PE és a gD inkább az olajba (IFA) szabadult ki, mint a vizes közegbe. Mivel az IFA humán célokra történő alkalmazását nem engedélyezték, az MTP-PE-t és az antigént más olaj-szolgáltató rendszerekben is megvizsgáltuk. Tengerimalacokban a 0,008% Tween 80-at tartalmazó 4%-os szkvalén emulzióban a HSV gD nagyon jó immunitást mutatott. Ez a szubkután tűn történő átnyomással emulgeált készítmény, a MTP-PE-LO (kevés olaj) meglehetősen labilis volt. Mindazonáltal a készítmény a tengerimalacok esetében magas antitest titeret mutatott, és az immunizált tengerimalacok esetében megfelelő védelmet mutatott a HSV indukálás esetén.

A készítmény az állat talpába történő beadás esetén mutatta a legnagyobb aktivitást, de intramuszkuláris adagolás esetén is elfogadható antitest titereket mutatott. Ezeket az eredményeket két beszámoló ismerteti (Sanchez-Pescador és társai, J. immunology 141, 1720-1727, 1988; a Technological Advances in Vaccine Development, Lasky és társai, ed., Alan R. Liss, Inc., p. 445-469, 1988). Az MTP-PE-LO készítmény hatásosnak bizonyult tengeri malacokban az élesztő sejtek által termelt HIV burok fehérjék ellen adott immunválasz stimulálása során. Az MTP-PE készítmény mind az ELISA antitest titereket, mind a vírus semlegesítő antitest titereket magas szinten stimulálta. Ugyanakkor ugyanez a készítmény nagyobb állatokon, például kecskén és babuinon vizsgálva nem volt hatásos. Így egyértelmű, hogy humán célokra, illetve nagyobb állatok esetében molekuláris antigének céljából további adjuváns készítmények vizsgálata szükséges.

A fentieknek megfelelően a jelen találmány tárgya a molekuláris antigénekre adott immunválasz stimulálására alkalmas adjuváns készítmény létrehozása, mely nagy emlősök esetén alkalmazható.

Meglepő módon úgy találtuk, hogy kielégítő adjuváns készítményt ad egy metabolizálható olajat és egy emulgeálószer tartalmazó anyag, melyben az olaj és az emulgeálószer 1 µm átmérőnél kisebb cseppecskéket tartalmazó olaj-a-vízben emulzió formájában van jelen, és amelyben a vegyület valamely tömbkopolimertől vagy tokoltól mentes. Az ilyen tömbkopolimereket az olaj-a-vízben emulzió létrehozásánál eddig alapvető fontosságúnak hitték. A készítmény adott esetben egy immunstimuláló anyagot is tartalmazhat (ahol adott esetben az immunstimuláló anyag az emulgeáló anyaggal azonos is lehet).

A találmány tárgya adjuváns készítmény, mely

- (1) egy metabolizálható olajat és
- (2) egy vagy több emulgeálószer tartalmaz, ahol az említett olaj és az említett emulgeálószer olajcseppecskéket tartalmazó olaj-a-vízben emulzió formájában van jelen,

ahol az olajcseppek számának legalább 80%-a 0,5 µm-nél kisebb átmérőjű és a készítmény tömbkopolimertől vagy tokoltól mentes.

Laboratóriumi vizsgálatokban, melyeket az alábbi példákban részletesen ismertetünk, a találmány szerinti adjuvánsok meglepően jobbnak bizonyultak, mint az olyan olajat és emulgeálószer tartalmazó adjuváns készítmények, melyekben az olajcseppek a találmány szerinti méretnél jóval nagyobbak voltak. Az US-A 4 409 209 számú szabadalmi leírás két lipofil foszforil-muramil peptidet ismerteti; azonban nem tesz említést emulziókról. Így találmányunk tárgyától alapvetően eltér, jóllehet, a találmányunk szerinti adjuváns adott esetben tartalmazhat ilyen vegyületeket.

Az US-A 4 693 998 számú szabadalmi leírás muramil peptideket ismerteti. Ezen dokumentum 21. oszlopának 61. és azt követő sorai víz-az-olajban emulziókat ismertetnek, melyek az ott említett muramil-peptidek alkalmazásával készültek. Ugyanakkor a találmány szerinti adjuváns lényege, hogy az olaj-a-vízben emulzió.

Az US-A 4 168 308 (Re-Issue no. 32 393) számú szabadalmi leírás speciális gyógyszerek, így fájdalomcsillapítók, izomlazítók és vazodepresszánsok bevitelére alkalmas rendszert ismertet. Az ott ismertetett rendszer lipofil gyógyszerhordozó rendszer. A leírás sehol nem tesz említést immunstimulációról, adjuvánsokról vagy vakcinákról. A találmányunk szerinti anyag nem egyszerűen maga a szubmikronális olaj-a-vízben emulzió, hanem szubmikronális olaj-a-vízben emulziós adjuváns, és azoknak megfelelő alkalmazása.

Az US-A 4 784 845 számú szabadalmi leírás emulziókat alkalmazó gyógyszeradagolási rendszert ismertet. A rendszer szubmikronális olaj-a-vízben emulziókat alkalmaz hidrofób gyógyszerek szolubilizálására. Az emulziók olajtartalma 5-50%. A leírás szerint az emulziórészek kis mérete előnyös az adagolás esetén esetleg fellépő tüdőkapilláris-elzáródások lehetőségének csökkentésére. Ugyanakkor semmilyen említést nem tesznek arról, hogy milyen az emulziórészecskék mérete, és hogy az befolyásolná az adjuváns tulajdonságokat. A hivatkozott leírás egyáltalán nem tesz említést immunstimulációról, adjuvánsokról és vakcinákról, hanem csak és kizárólag gyógyszeradagoló rendszert ismertet.

A találmány szerinti adjuváns készítmények alkotórészei általánosan ismertek, bár eddig még nem kerültek alkalmazásra ilyen összetételben, ilyen módon, és ilyen cseppecske átmérő alkalmazása esetén. Tehát az alkotók, bár az alábbiakban általánosan és részletesen ismertetjük azokat, a szakmában jól ismertek, és az itt alkalmazott kifejezések, mint például az emulgeálószer az immunstimuláló szer, a muramil-peptid és a lipofilezett muramil-peptid, a szakmai gyakorlattal rendelkezők számára szintén jól ismertek, és így nem szorulnak további részletes ismertetésre. Az említett készítmények egyik alkotója metabolizálható, nem-toxikus olaj, mely előnyös esetben 6-30 szénatomot tartalmaz, beleértve, mégpedig korlátozások nélkül az alkánokat, alkéneket, alkineket és az ezeknek megfelelő savakat és alkoholokat, ezek étereit és észtereit valamint mindezek elegyeit. Az olaj növényi eredetű, állati eredetű vagy szintetikus előállított olaj lehet, mely a kezelt alany testében metabolizálódhat, és amely a kezelt alanyra nézve nem toxikus. A kezelt alany állat lehet, tipikusan emlős, előnyös esetben humán. Az ásványi olajok és hasonlóképpen a toxikus desztillált petróleum olajok a találmány tárgykörébe nem tartoznak bele, alkalmazásuk alapvetően ki van zárva.

A találmány szerinti készítményt alkotó olaj hosszú szénlancú alkán, alkén, alkin lehet, ezek sav- vagy alkohol-származékai vagy ezek sóinak szabad savas formája, vagy egy észter, mint például mono-, di-, vagy tri-észter, mint például az 1,2-propándiol, vagy a hasonló poli-hidroxi-alkoholok trigliceridjei és észterei. Az alkoholok mono- vagy polifunkcionális savak, például ecetsav, propánsav, citromsav és hasonló alkalmasításával lehetnek acilezve. A hosszú szénlancú alkoholok éter származékai, amelyek szintén olajok, és megfelelnek az itt felsorolt kritériumoknak, szintén alkalmazhatók.

Az alkán, alkén vagy alkin rész, és ezek sav vagy alkohol származékai 6–30 szénatomot tartalmazhatnak. Ez a rész egyenes vagy elágazó láncszerkezettel rendelkezik. Teljesen telített lehet, illetve egy vagy több kettős-, illetve hármas-kötést tartalmazhat. Azokban az esetekben, amikor mono- vagy poli-észter, illetve éter alapú bázist alkalmazunk, a zsírsav vagy zsíralkohol részben megtalálható 6–30 szénatom a limitáló tényező, és nem a teljes szénatomszám.

Számos metabolizálható olaj, elsősorban az állati, a növényi illetve a hal eredetű olajok alkalmazhatók a találmányban. A kezelt gazdaszervezet által metabolizálható olaj, illetve az olaj-komponens keléseket, granulomákat, rákot, vagy (állatgyógyászati alkalmazás esetén) a vakcinával kezelt madarak, vagy állatok húsát – a nem-metabolizált olajnak a fogyasztóra gyakorolt mérgező hatása következtében – fogyasztásra alkalmatlanná teszik.

A növényi olajok forrásai az alábbiak lehetnek: mogyoró, mag, illetve gabona eredetűek. A legegyszerűbben beszerezhetőek a földimogyoró olaj, a szójabab olaj, a kókuszdió olaj, az olíva olaj és a dió olajak. A csíra olajok az alábbiak lehetnek: a pórsáfrány olaj, a gyapotmag olaj, a napraforgó olaj, a szezámag olaj és hasonlók. A gabona eredetű olajok csoportjában a kukorica olaj a legáltalánosabb, de más gabona eredetű olajok is alkalmazhatók, például a búza, a zab, a rozs, a rizs és hasonlók.

A glicerín és az 1,2-propándiol 6–10 szénatomszámú zsírsav észterei, melyek a gabona eredetű olajok között a természetben nem fordulnak elő, megfelelő kiindulási anyagok, dió, illetve gabona olajok hidrolízisével, szeparálásával és észterezésével állíthatók elő. Ezek a terméket NEOBEE[®] néven beszerezhetők (PVO International, Inc., Chemical Specialities Division, 416 Division Street, Boonton, NJ, stb.)

Állati eredetű olajok szintén alkalmazhatók a találmány szerinti vakcinákban. Az állati eredetű olajok és zsírok fiziológiás körülmények között általában szilárd halmazállapotúak, mivel trigliceridek formájában fordulnak elő, és a növényi vagy a hal eredetű olajokkal szemben magasabb telítettségi fokkal rendelkeznek. Ugyanakkor a zsírsavak az állati eredetű zsírokból részleges vagy teljes triglicerides elszappanosítással kaphatók, így szabad zsírsavat kapunk. Az emlős tej eredetű zsírok és olajok metabolizálhatók, és így a találmány eljárásában gyakorlatilag alkalmazhatók. Az állati forrásokból kapható tiszta olajok kinyerésére alkalmas szeparálás, tisztítás, elszappanosítás, és más eljárások a szakmában általánosan ismertek.

A legtöbb hal eredetű olaj könnyen visszanyerhető és metabolizálható. Így például a tőkehal máj olaj, a cápa máj olaj, a bálna olaj és a cetvelő olaj tartozhat a találmány során alkalmazható hal eredetű olajok közé. Számos elágazó szénláncú olajat szintetizáltak biokémiai úton, 5-C-izoprén alkalmazásával, amelyekre általánosan mint terpenoidokra hivatkozunk. A cápa máj eredetű olaj elágazó szénláncú terpenoidot tartalmaz, mely a szkvalén néven ismert 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetrakozahexaén, ami a találmány

szerint előnyben részesített vegyület. a szkvalán a szkvalén telített analógja, mely könnyen beszerezhető az általánosan ismert forrásokból, illetve megkapható a szakmában ismert eljárásokkal.

5 Az említett adjuváns és vakcina készítmények olaj komponense 0,5–20% közötti mennyiségben lehet jelen, de előnyös esetben nem több, mint 15%, különleges esetben 1–12% között változhat. A leginkább előnyös az 1–4% közötti mennyiség alkalmazása.

10 Az adjuváns készítmény vizes része puffertartó sódalt lehet, illetve előnyös esetben természetesen eredetű víz. Mivel az említett készítményeket parenterális kezelésre szánták, előnyös a vakcinaként alkalmazott végső oldatot pufferni, így az elegy ozmolalitása azonos a normál fiziológiás folyadékokéval, és ezáltal megakadályozható a készítmény és a fiziológiás folyadékok közötti eltérő ionkoncentráció következtében fellépő, a kezelés után tapasztalható felpuffadás, és a készítmény gyors adszorbeálódása. A normál fiziológiás körülményekkel megegyező pH érték fenntartása céljából tehát előnyös a sóoldat puffertartása. A készítmény egyes alkotói, például a glikopeptidek stabilitásának érdekében egyes esetekben szükséges lehet a pH értékek egyéni szinten történő fenntartása. Számos fiziológiailag elfogadható puffert alkalmazhatunk, melyek közül előnyben részesített a foszfát puffer alkalmazása. Más pufferek is alkalmazhatók, így például az acetát, a trisz, a bikarbonát, a karbonát, és a hasonlók alkalmazhatók a foszfát puffer helyettesítésére. A vizes alkotó pH értéke előnyös esetben 6,0–8,0 közötti érték lehet.

30 Amennyiben az adjuváns kiindulási anyagként állítjuk elő, az emulzió vizes komponenseként előnyösebb a természetes eredetű víz alkalmazása. A sókoncentráció növekedése egyre nehezebbé teszi a kívánt kicsiny cseppecske méret elérését. Amennyiben a végső vakcina készítményt adjuvánsból állítottuk elő, az antigén anyagot megfelelő ozmolalitással rendelkező puffertartó adhatjuk a rendszerhez, és így kapjuk meg a kívánt vakcina készítményt.

40 Az említett készítményben alkalmazott vizes alkotó mennyisége az a mennyiség, ami egységnyi mennyiségű készítmény eléréséhez szükséges. Ez a fent említett többi alkotóval együtt 100% elegy eléréséhez szükséges vizes alkotó mennyisége, ami a készítmény mennyiségének eléréséhez szükséges.

45 A gyógyszerészeti gyakorlat nagy számú emulgeáló és szuszpendáló anyagot alkalmaz. Ezek közé a természetes eredetű anyagok, például a fa eredetű gumik, a növényi fehérjék, a cukor alapú polimerek, mint az alginát, a cellulóz és hasonlók tartoznak. Egyes oxipolimerek vagy polimerek a szénláncon hidroxil-csoportot vagy más hidrophil szubsztituenst tartalmaznak, ilyenek például a povidon, a polivinil-alkohol, és a glikol-éter alapú mono- illetve bifunkcionális vegyületek. Az emulgeáló és szuszpendáló anyagok harmadik csoportjába a hosszú szénláncú zsírsav eredetű vegyületek tartoznak, melyek szintén alkalmazhatók a találmány megvalósítása során. A fenti anyagok közül számos alkalmazható, amennyiben nem toxikus.

60 Az alábbi példák a megfelelő emulgeáló szerekre

(amelyekre az alábbiakban mint felületaktív anyagokra, illetve detergensekre hivatkozunk) vonatkoznak, melyek a jelen találmány megvalósítása során alkalmazhatók:

1. Vízoldható szappanok, például nátrium-, kálium-, ammónium- és alkán-ammónium-sók, különösképpen a nátrium-, kálium-faggyú és a kókuszdió alapú szappanok.

2. A szintetikus, anionos, nem-szappan detergens, amelyek a szerves kénsav reakciótermékek vízoldható sói, melyek molekulaszervezetében a 8–22. szénatom között alkilgyökök találhatók, és egy gyök, melyet a szulfonsav, és a kénsav-észter-gyökök csoportjából választunk ki. Ezekre példák a faggyú, vagy kókuszdió olaj eredetű nátrium- és kálium-alkil-szulfátok; a nátrium- és kálium-alkil-benzén-szulfonátok; a nátrium-alkil-gliceril-éter-szulfonátok; a nátrium-kókuszdióolaj-zsír-sav-monoglicerid-szulfonátok és -szulfátok; a kénsav-észterek nátrium- és kálium-sói, melyeket egy mol magasabb rendű zsíralkohol és megközelítőleg 1–6 mol etilén-oxid reakciója termékeként kapunk; a nátrium- és kálium-alkil-fenol-etilén-oxid-éter-szulfonátok, amelyek molekulánként 1–10 egységnyi etilén-oxidot tartalmaznak, és amelyekben az alkil-gyök 8–12 szénatomot tartalmaz; az izetionsavval észterezett zsírsavak nátrium-hidroxiddal semlegesített reakciótermékei; a metil-taurid zsírsav-amidjának nátrium- és kálium-sói; és a SO_3 -szulfonált C_{10} – C_{24} alfa-olefinek nátrium- és kálium-sói.

3. Az alkilén-oxid-csoportok szerves, hidrofób vegyülettel történő kondenzációja során létrejövő szintetikus, nem-ionos detergens. A hidrofób csoportokra jellemzőek a propilén-oxidnak a propilén-glikollal, alkil-fenollokkal, a propilén-oxid és az etilén-diamin kondenzációs termékeivel, a 8–22 szénatomos alifás alkoholokkal és a zsírsavak amidjával alkotott kondenzációs termékei.

4. A nem-ionos detergens, mint például az amin-oxidok, a foszfin-oxidok és szulfoxidok szemi-poláris tulajdonságokkal rendelkeznek. A hosszú szénláncú tercier amin-oxidok közé tartozik a dimetil-dodecil-amin-oxid, és a bisz-(2-hidroxi-etil)-dodecil-amin. A foszfin-oxidokra a 3 304 263 számú amerikai egyesült államokbeli, 1967. február 14-én engedélyezett szabadalmi leírásban találunk példákat, például a dimetil-dodecil-foszfin-oxid, és a dimetil-(2-hidroxi-dodecil)-foszfin-oxid.

5. Az $\text{R}^1\text{--SO--R}^2$ általános képletű, hosszú szénláncú szulfoxidok, melyekben R^1 és R^2 helyettesített vagy nem-helyettesített alkil-gyök, az előbbi 10–28 szénatomot tartalmaz, míg az R^2 1–3 szénatomot tartalmaz. Ilyen például a dodecil-metilszulfoxid, és a 3-hidroxi-tridecil-metil-szulfoxid.

6. Az amfolitikus detergens, amelyek közé tartozik a 3-dodecil-amino-propionát és a nátrium-3-dodecil-amino-propán-szulfonát.

7. Az amfoterionos szintetikus detergens, amelyek közé tartozik a 3-(N,N-dimetil-N-hexadecil-amónio)-propán-1-szulfonát és a 3-(N,N-dimetil-N-hexadecil-amónio)-2-hidroxi-propán-1-szulfonát.

Továbbá a jelen találmány során az alábbi emulzifikáló szerek összes típusát alkalmazhatjuk: (a) a zsírsavak, a gyanta savak, és a tall olaj szappanjai (azaz alkáli sói); (b) alkil-arén-szulfonátok; (c) alkil-szulfátok, beleértve a felületaktív anyagokat, melyek elágazó, illetve egyenes szénláncú, hidrofób csoportokkal rendelkeznek, valamint a primer és a szekunder szulfát csoportok; (d) a hidrofób és a hidrofil csoport között belső kötést tartalmazó szulfátok és szulfonátok, például az acilezett metil-tauridok, és a szulfatozott zsírsav monogliceridek; (e) a polietilén-glikol hosszú szénláncú savas észterei, például a faggyú olaj észter; (f) a hosszú szénláncú alkoholok és merkaptánok polietilén-glikol-éterei; és (h) a zsír-acil-dietanol-aminok. Mivel a felületaktív anyagok osztályozása többféle szempontból történhet, a fent felsorolt felületaktív anyagok több osztálya átfedi a felületaktív anyagok előzőleg már ismertetett osztályait.

Számos, a biológiai rendszerekben történő alkalmazásra tervezett és felhasznált emulgeálószer van. Ilyenek például a Sigma Chemical Company, Catalog of Biochemical and Organic Compounds, 1987, 310–316. oldalán felsorolt biológiai detergens (felületaktív anyagok). Ezeket a felületaktív anyagokat négy alcsoportba sorolhatjuk be: anionos, kationos, amfoterionos és nem-ionos vegyületek. Az anionos felületaktív anyagok közé tartozik az algin-sav, a kaprilsav, a kólsav, az 1-dekán-szulfonsav, a deoxi-kólsav, az 1-dodekán-szulfonsav, az N-lauril-szarkozin és a taurokólsav. A kationos felületaktív anyagok közé tartozik dodecil-trimetil-ammónium-bromid, a benzalkónium-klorid, a benzil-dimetil-hexadecil-ammónium-klorid, a cetil-piridinium-klorid, a metil-benzetónium-klorid és a 4-picolin-dodecil-szulfát. Az amfoterionos felületaktív anyagok közé tartozik a 3-[(3-kólamidopropil)-dimetil-ammónio]-2-hidroxi-1-propán-szulfonát (általánosan ismert rövidítése a CHAPS), a 3-(kólamido-propil-dimetil-ammónio)-2-hidroxi-1-propán-szulfonát (általánosan ismert rövidítése a HAPSO), az N-dodecil-N,N-dimetil-3-ammónio-1-propán-szulfonát és a lizo-alfa-foszfátidil-kolin. A nem-ionos detergensre példák az alábbiak: dekanol-N-metil-glukamid, dietilén-glikol-monopentil-éter, n-dodecil-béta-D-glükopiranozid, a zsíralkoholok etilén-oxid kondenzátumai (kereskedelmi forgalomban Lubrol néven), a zsíralkoholok poli-oxi-etilén-éterei (különösképpen a C_{12} – C_{22} szénláncú zsíralkoholoké), a poli-oxi-etilén-szorbitán-zsíralkoholok éterei (kereskedelmi forgalomban Tween néven) és a szorbitán-zsíralkoholok éterei (kereskedelmi forgalomban Span néven).

A felületaktív anyagok közül előnyben részesített csoport a szorbitán-alapú, nem-ionos detergens csoportja. Ezeket a felületaktív anyagokat a szorbitol dehidratálásával kaphatjuk meg, így 1,4-szorbitán keletkezik, ami ezután egy, vagy több zsírsav ekvivalensszel reagál. A zsírsavval helyettesített rész tovább reagálhat etilén-oxiddal, így a felületaktív anyagok második csoportja jön létre.

A zsírsavval szubsztituált szorbitán felületaktív anyag előállításához az 1,4-szorbitán zsírsavval, mint például laurilsavval, palmitinsavval, sztearinsavval, olein-

savval, vagy hasonló hosszú szénláncú zsírsavval való reakciójával történik, és így 1,4-szorbitán-monoészter, 1,g-szorbitán-szeszkviészter vagy 1,4-szorbitán-triészter keletkezik. Ezeknek a felületaktív anyagoknak az általános neve például szorbitán-monolaurát, szorbitán-monopalmitát, szorbitán-monosztearát, szorbitán-monooleát, szorbitán-szeszkviolát és szorbitán-trioleát. Ezek a felületaktív anyagok SPAN^R, vagy ARLACEL^R néven a kereskedelemről általánosan beszerezhetők, a különböző mono-, di- és tri-észter-szubsztituált szorbitánok között betű vagy szám jelzéssel tesznek különbséget.

A SPAN^R és az ARLACEL^R felületaktív anyagok hidrofilek, olajban oldhatók és diszpergálhatók. Vízben oldhatatlanok, de diszpergálhatók. Az említett felületaktív anyagok hidrofil-lipofil) egyensúlyának (hydrophilic-lipophilic balance; HLB) értéke 1,8–8,6 között változik. A felületaktív anyagok előállítása általánosan ismert eljárásokkal történhet, vagy a kereskedelemről általánosan beszerezhetők, például az ICI America's Inc., Wilington, DE cégtől, ATLAS^R márkanéven.

A felületaktív anyagokhoz kapcsolódó csoport poli-oxi-etilén-szorbitán-monoészter és poli-oxi-etilén-szorbitán-triészter lehet. Ezeknek az anyagoknak az előállítása az etilén-oxidnak az 1,4-szorbitán-monoészterrel vagy az 1,4-szorbitán-triészterrel való reakciójával történhet. A polioxi-etilén a liofil szorbitán-mono vagy tri-észter felületaktív anyagot hidrofil felületaktív anyaggá alakítja, mely vízben általánosan oldható és diszpergálható, míg szerves folyadékokban változó mértékben oldható.

Ezek a kereskedelemről TWEEN^R néven beszerezhető anyagok alkalmasak az olaj-a-vízben típusú emulziók, és diszperziók létrehozására vagy az olajok szolubilizálására, és a vízmentes kenőcsöket vízzoldhatóvá és lemoshatóvá teszik. A TWEEN^R felületaktív anyagokat rokon szorbitán monoészterekkel, vagy triészterekkel elegyíthetjük, így elősegíthető az emulzió stabilitása. A TWEEN^R felületaktív anyagok HLB értéke általában 9,6–16,7 között van. A TWEEN^R felületaktív anyagok a kereskedelemről általánosan beszerezhetők, például az ICI America's Inc., Wilington, DE cégtől, ATLAS^R márkanéven.

A nem-ionos felületaktív anyagok harmadik csoportja, melyet önmagában vagy SPAN^R, ARLACEL^R és TWEEN^R felületaktív anyagokkal elegyítve alkalmazhatunk, a poli-oxi-etilén-zsírsavak, melyeket az etilén-oxid hosszú szénláncú zsírsavval történő reakciójával állíthatunk elő. Ebből a típusból a legáltalánosabban beszerezhető felületaktív anyagok szilárdak, MYRJ^R kereskedelmi néven futnak és a sztearinsav poli-oxi-etilén származékai. A MYRJ^R felületaktív anyag a TWEEN^R felületaktív anyaghoz hasonló hidrofil, vízzoldható és vízben diszpergálható. a MYRJ^R felületaktív anyag a TWEEN^R felületaktív anyaggal vagy a TWEEN^R/SPAN^R vagy ARLACEL^R felületaktív anyag elegyével vegyíthető és így emulziók képzésére alkalmazható. A MYRJ^R felületaktív anyag a kereskedelemről általánosan beszerezhető, például az ICI America's Inc., Wilington, DE cégtől, ATLAS^R márkanéven.

A poli-oxi-etilén alapú nem-ionos felületaktív anyagok negyedik csoportja a poli-oxi-etilén-zsírsav-észterek, melyek lauril-, acetyl-, sztearil- és oleil-alkohol eredetűek. Ezeket az anyagokat a fenti eljárás szerint állíthatjuk elő, etilén-oxid és zsíralkohol reakciójával. Ezeknek a felületaktív anyagoknak az általános neve BRIJ^R. A BRIJ^R felületaktív anyag hidrofilTM vagy liofil lehet, a felületaktív anyagban található poli-oxi-etilén rész méretétől függően. Ezeknek az anyagoknak az előállítása általánosan ismert eljárásokkal történhet, vagy a kereskedelemről általánosan beszerezhetők, például az ICI America's Inc. cégtől.

Más, a találmány gyakorlati megvalósítása esetén hatáson alkalmazható, nem-ionos felületaktív anyagok lehetnek az alábbiak: a poli-oxi-etilén, poliol-zsírsav-észterek, a poli-oxi-etilén-éter, a poli-oxi-propilén-zsírsav-észterek, a poli-oxi-etilén tartalmazó méh viasz származékai, a poli-oxi-etilén-lanolin származékai, a polioxi-etilén-zsírsav-gliceridek, a glicerol-zsírsav-észterek, vagy más, a 12–22 szénatomos hosszú szénláncú zsírsavak poli-oxi-etilén-sav alkohol- vagy -éter származékai.

A találmány szerinti adjuvánsokat és vakcina készítményeket többfázisú rendszerekre oszthatjuk, előnyös az emulzióképző, 7–16 közötti HLB értékkel rendelkező nemionos felületaktív anyagok kiválasztása. Ezt az értéket egy nem-ionos felületaktív anyag, például TWEEN^R alkalmazásával kaphatjuk meg, vagy a felületaktív anyagnak, mint olyannak, például szorbitán-mono-, di- vagy triészter alapú felületaktív anyaggal; szorbitán-észter-poli-oxi-etilén-zsírsavval; a szorbitán-észternek a poli-oxi-etilén-lanolin származékkal alkotott elegyével; a szorbitán-észter felületaktív anyag nagy HLB értékű poli-oxi-etilén-zsírsav-éter felületaktív anyaggal történő elegyítésével; vagy a polietilén-zsír-éter felületaktív anyaggal, vagy poli-oxi-etilén-szorbitán-zsírsavval történő elegyítésével érhetjük el.

A találmány gyakorlati szempontjából a nem-ionos felületaktív anyagok önmagában történő alkalmazása sokkal előnyösebb, különösen a TWEEN^R felületaktív anyag, mint a nem-ionos felületaktív anyagok alkalmazása. A TWEEN^R 80 felületaktív anyag, más néven mint poli-oxi-etilén 20 szorbitán poliszorbát 80. a leginkább előnyös a fenti felületaktív anyagként.

A kielégítő mértékű szemcseméret csökkenést a 0,02 tömeg%–2,5 tömeg% (w/w) mennyiségű felületaktív anyag jelenléte befolyásolhatja. előnyös a 0,05–1% közötti mennyiség, még előnyösebb a 0,01–0,5% közötti mennyiség alkalmazása.

A találmány gyakorlati szempontjából nem fontos a cseppecskék szemcsemérete elérésének módja. Egy eljárás erre, mellyel szubmikronális méretű olajcseppeket hozhatunk létre, az általánosan ismert emulzifikálók, mint például a 110Y szám modell alkalmazása, mely a Microfluids, Newton, MA cégtől szerezhető be. Más általánosan ismert emulzifikálók például a Gaulin Model 30CD (Gaulin, Inc., Everett, MA), és a Rainnie Minilab Type 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, WI). Az említett emulzifikálók működésének alapja a kis nyíláson keresztül, nyomás hatására létrehozott erőteljes nyíróerő. Amennyiben a 110Y mo-

dell 5000–30 000 psi mellett üzemel, a keletkező olaj-cseppek mérete 100–750 nm között lesz.

Az olajcseppek mérete függ a detergensnek az olaj-hoz viszonyított arányától (az arány növelése csökkenti a szemcseméretet), a működési nyomástól (a működési nyomás növelése csökkenti a szemcseméretet), a hőmérséklettől (a hőmérséklet növelése csökkenti a szemcseméretet), és az amfipatikus immunstimuláló szerek adagolásától (az említett szerek adagolásának hatására csökken a szemcseméret). A cseppecskék mérete az alkalmazott detergenssel, olajjal, immunstimuláló anyaggal (amennyiben alkalmaztunk), és a kiválasztott működési körülmények hatására változik. A cseppecskék méretét méret szerinti osztályozó berendezés alkalmazásával értékelhetjük, ilyen például az általánosan ismert Sub-Micron Particle Analyzer (Model N4MD), melyet a Coulter Corporation gyárt, és a paraméterek az előbbieken felsorolt útmutatások szerint változhatnak, amennyiben a részecskék szemcsemérete minden esetben 1 μ átmérő alatt van, előnyösen esetben 0,8 μ átmérő alatt, vagy a leginkább előnyös esetben 0,5 μ átmérő alatt. Ez alapvetően 80%-ot jelent (szám szerint), előnyös esetben legalább 90%-ot. A részecskék méret szerinti eloszlása a Gauss-görbének felel meg, így a részecskék átlagos átmérője kisebb, mint a megállapított határok.

A jelen találmány egy olyan olaj emulzió létrehozásánál alkalmazható, melyen nincs jelen az eddig kielégítő immunogenitást biztosítónak vélt, a szubmikron olaj emulziók esetében alkalmazott másik komponens, nevezetesen a poli-oxi-propilén-poli-oxi-etilén (POP-POE) tömbpolimer, melyet, mint az adjuvánsokhoz alkalmazható anyagot a 4 772 466, és a 4 770 874 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és a 0 315 153 A2 számú európai szabadalmi leírásban találunk meg.

Egy, a találmány szerinti adjuváns készítmény egy metabolizálható olajat tartalmaz a vízben és egy a POP-POE kopolimertől eltérő emulgeálószer. Az emulgeálószernek nem kell specifikus immunstimuláló aktivitással rendelkeznie, mivel – a szubmikron méret-tartományba eső olajcseppek esetén – maga az olaj összetevő is funkcionálhat adjuvánsként. Azonban fokozott immunstimuláló aktivitás érhető el, ha az összetétel valamely ismert immunstimuláló szert tartalmaz. Ezek az immunstimuláló szerek az emulgeálószerrel és az olajtól eltérő anyagok lehetnek, vagy az immunstimuláló szer és az emulgeálószer ugyanaz a molekula lehet. Az előbbi esetre példák az élőlt mikobaktériummal, mint például Mycobacterium tuberculosis és ezek szubcelluláris komponenseivel elegyített metabolizálható olajok. További immunstimuláló szerek lehetnek még a muramil-peptidek, amelyek az említett baktériumok sejtfalának alkotói. A kapcsolt emulzifikáló/immunstimuláló szerek muramil-peptidek lehetnek, melyeket a Sanchez-Pescador és társai ismertetnek, lásd fent. Ezek az anyagok bázikus N,N-acetil-muramil-peptidet (egy hidrofíli rész) tartalmaznak, mely mint immunstimuláló csoport szerepel, és tartalmaznak egy lipofíli részt, mely a keletkező vegyület felületi

aktivitásának tulajdonságát biztosítja. Az ilyen vegyületek, éppúgy mint más amfipátias immunstimuláló szerek, mind immunstimuláló szerként, mind emulgeálószerként szerepelnek a találmány gyakorlati megvalósítása során. Továbbá a jelen találmány gyakorlati megvalósítása szempontjából lehetséges egy amfipátias immunstimuláló szernek, és egy másik, nem amfipátias emulgeálószernek az elegyítése. Például egy lipofíli muramil peptid, és egy alapvetően szubsztituálatlan (azaz alapvetően hidrofíli) muramil dipeptid elegyítése.

A találmány szerinti előnyben részesített immunválasz stimuláló muramil peptidek (vagy, pontosabban glikopeptidek) az N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin eredetű, és ehhez kapcsolódó vegyületek csoportjának alkotói, melyeket Ellouz és társai (1974) Biochem. & Biophys. Res. Comm., 59 (4): 1317 határoztak meg, és ami a legkisebb hatásos immunológiai adjuváns aktivitással rendelkező egység, ami az M. tuberculosisban, a teljes Freund-féle adjuváns mikrobakteriális alkotójában előfordul. Számos dipeptiddel és polipeptiddel szubsztituált muramilsav származékot hoztak létre, melyek megfelelő immunstimuláló aktivitással rendelkeztek.

Bár az említett glikopeptidek a változékonny vegyületek közé tartoznak, általánosan jellemezhetők az (I) általános képlettel, ahol a pirán gyűrű oxigénjei hidrogén-, alkil-, acil-csoporttal, vagy más hasonló csoporttal vannak szubsztituálva, vagy N-alapú szubsztituensre vannak kicserélve, különösképpen a 6. pozícióban levő oxigén; a 2-amino-csoport egy acil-csoport, vagy hasonló; a laktól oldallánc módosítva van, például etil-vel, vagy más kétértékű alkil-résszel; és a peptid funkciót tovább derivatizálható peptid, vagy dipeptid tölti be. A piranozil vegyület furanozil analógja immunhatású aktivitással rendelkezik, és a találmány eljárása során alkalmazható.

A találmány szerinti glikopeptidek közé tartoznak azok a diszacharidok, és tetraszacharidok, melyek mezoalfa, epszilon-diamino-pimelinsavhoz kapcsolódnak, lásd a 4 235 771 és a 4 186 194 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A találmány gyakorlati megvalósítása esetén alkalmazható glikopeptideket ismertetik a 4 084 971, 4 101 536, 4 153 684, 4 235 771, 4 323 559, 4 327 085, 4 185 089, 4 082 736, 4 369 178, 4 314 998, 4 082 735 és 4 186 194 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. Az említett szabadalmakban ismertetett glikopeptideket itt referenciaként említettük meg, mivel az itt felsoroltak egy részét alkotják. A találmány gyakorlati megvalósítása esetén a JP 40 792 227, JP 4 079 228, és a JP 41 206 696 számú japán szabadalmi leírások vegyületei szintén alkalmazhatók.

Az említett vegyületek előállítására vonatkozó eljárásokat az irodalom közli, és a szakmai gyakorlattal rendelkezők számára általánosan ismertek. A preparatív eljárásokra találhatók példák a 4 082 736 és a 4 082 735 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban. Továbbá hasonló preparatív eljárásokra találhatunk még példákat az itt referenciaként

megemlített amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban.

R 1–22 szénatomos tartalmazó nem-szubsztituált, illetve szubsztituált alkil-gyök, vagy 6–10 szénatomot tartalmazó nem-szubsztituált illetve szubsztituált aril-gyök;

R¹ és R² azonos lehet, vagy különböző, mégpedig hidrogénatom vagy 1–22 szénatomot tartalmazó acil-gyök;

R³ hidrogénatom, 1–22 szénatomot tartalmazó alkil-gyök vagy 7–10 szénatomot tartalmazó aril-gyök;

R⁴ hidrogénatom vagy alkil-gyök;

n = 0, vagy 1;

X és Z egymástól függetlenül alanil-, valil-, leucil-, izoleucil-, alfa-amino-butiril-, treonil-, metionil-, ciszteinil-, glutamil-, glutaminil-, izoglutamil-, izoglutaminil-, aszpartil-, fenilalanil-, tirozil-, lizil-, ornitinil-, arginil-, hisztidil-, aszparginil-, prolil-, hidroxiprolil-, szeril- vagy glicil-csoport;

R⁵ a terminális aminosavon tetszés szerint észterezett vagy amidált karboxil-csoport;

Y –NHCHR⁶CH₂CH₂CO-csoport, ahol R⁶ egy tetszés szerint észterezett vagy amidált karboxil-csoport.

Az alkil-csoport, amennyiben másképpen nem jelöljük, 1–7 szénatomot tartalmazó egyenes vagy elágazó szénláncú gyök, például metil-, etil-, propil-, butil-, pentil-, hexil- vagy heptil-gyök illetve egy izomer. Az alacsonyabb szénláncú alkil-csoportok 1–4 szénatomot tartalmaznak.

Egy tetszés szerint észterezett vagy imidált karboxil-csoport lehet maga a karboxil-csoport, vagy a karboxil-csoport alacsonyabb szénatomszámú alkanollal, mint például metanollal, etanollal, propanollal vagy butanollal észterezve, illetve karbamoil-csoport, ami a nitrogén-atomon nincs szubsztituálva, vagy monoszubsztituált illetve biszubsztituált, például alkil-csoporttal, különösen alacsonyabb szénatomszámú alkil-csoporttal, aril-csoporttal különösen fenil-csoporttal, vagy aralkil-csoporttal főleg benzil-csoporttal. A karbamoil-csoport alkilidén-gyökkel lehet szubsztituálva, például butilidén- vagy pentilidén-gyökkel. Továbbá a karbamoil-csoportban R⁵ a nitrogén-atomon karbamoil-metil-csoporttal lehet szubsztituálva.

Különösen előnyösek a (II) általános képletű vegyület azon képviselői, ahol R és R¹ azonos vagy különböző, és hidrogénatom, vagy egy 1–22 szénatomot tartalmazó acil-gyök; R² metil-csoport; R³ hidrogénatom; X L-alanil-; Y D-izoglutaminil-csoport; és n = 0.

A glikopeptidok másik előnyben részesített csoportja a (II) általános képletű vegyületek azon képviselői, ahol R és R¹ hidrogénatom vagy egy 1–22 szénatomot tartalmazó acil-gyök; R² hidrogénatom; R⁴ metil- vagy butil-csoport; X L-valil-, L-szeril-, L-treonil-, L-alfa-amino-butiril-, vagy L-alanil-csoport; és Y D-izoglutaminil-csoport.

Speciális példák az alábbi vegyületek:

N-acetil-muramil-L-alfa-amino-butiril-D-izoglutamin;
6-O-sztearoil-N-acetil-muramil-L-alfa-amino-butiril-D-izoglutamin;

N-acetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamin;

N-acetil-muramil-L-valil-D-izoglutamin;

N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin-D-glutamin-butil-észter;

N-acetil-dezmetil-D-muramil-L-alanil-D-izoglutamin;

N-acetil-muramil-L-alanil-D-glutamin;

5 N-acetil-muramil-L-szeril-D-izoglutamin;

N-acetil-(butil-muramil)-L-alfa-aminobutil-D-izoglutamin; és

N-acetil-(butil-muramil)-L-alanil-D-izoglutamin.

Az immunstimuláló anyagok hatásos mennyisége az a mennyiség, ami az antitest mennyiségének növekedését befolyásolja, amennyiben egy antigénnel együtt alkalmazzuk, szemben azzal a titer szinttel, amit akkor kapunk, amikor a glikopeptidet önmagában alkalmazzuk (az összkészítmény 0,0001–10% közötti mennyisége). Minden egyes glikopeptid rendelkezik egy hatásos dózistartománnyal, ami a másik glikopeptidétől eltérhet. Így általános dózistartományt, amely minden egyes, a találmány tárgykörén belül eső glikopeptidre pontos értéket ad, nem adhatunk meg. Azonban, mint általános szabály, megállapíthatjuk, hogy a vakcinában a glikopeptid 0,001–5% közötti (w/v) mennyiségben lehet.

Előnyösebb esetben 0,01–3% közötti (w/v) mennyiségben.

A legtöbb fent említett glikopeptid hidrofил vegyület. Ezért alkalmazásuk egy külön emulzifikáló szerrel történik (ami, mint fent már említettük, immunstimuláló szer lehet). Egyes esetekben a fent említett vegyületek lipofiles tulajdonságokkal rendelkeznek, így például a cukor-részen zsírsav szubsztituenst, és/vagy aril-szubsztituenst tartalmaznak, különösképpen azok, amelyek a 14–22 szénatom között egy, vagy több acil-gyököt tartalmaznak, és különösképpen azok, amelyek egynél több acil szubsztituenst tartalmaznak. Ugyanakkor a peptid rész karboxilát-csoportján, vagy oldallán-cán keresztül kapcsolódó lipid rész létrehozásával is elérhetünk a muramil-peptideknél lipofiles tulajdonságokat. Amennyiben a lipid-csoportot a terminális karboxil-csoporton keresztül kapcsoljuk a peptid részhez, a vegyületek előnyben részesített csoportját kapjuk. Ezt a kapcsolódást egyszerűen kialakíthatjuk, így például a terminális karboxilát és az 14–22 szénatomot tartalmazó zsíralkohol közötti észter kötés létrehozásával, vagy egy kétfunkciójú csoport, például etanolamin alkalmazásával, ami a lipidhez észter vagy amid kötésen keresztül kapcsolja a karboxilátot. Különösképpen előnyös a találmány gyakorlati megvalósítási esetén a foszfolipidek alkalmazása, mivel a foszfát-csoport könnyen kapcsolódó funkcionális csoport. Egy könnyen kapcsolódó foszfolipid a diacil-foszfogliceridek csoportja. A foszfatidil-etanol-amin egy könnyen beszerezhető, a természetben előforduló vegyület, melyet egy amino-kötésen keresztül könnyen kapcsolhatunk a peptid rész terminális karboxilát-csoportjához. Más, a terminális karboxilát-csoporthoz kapcsolódó lipidek az alábbiak lehetnek: az acil-glicerolok, a foszfatidil-kolin, a foszfatidil-szerin, a foszfatidil-inozitol, a foszfatidil-glicerol, a kardiolipin, s szfingomielin.

Számos amfipátias immunstimuláló peptid rendelkezik a (III) általános képletnek megfelelő szerkezettel, ahol R, R¹–R⁴, X, Y, Z és n a fent ismertetett jelen-

tésnek felel meg. L a lipid-részt jelöli, melyet, mint lipid-részt, fent ismertettünk.

Összefoglalva, a molekula muramil-sav része és peptid része együtt egy hidrophil részt alkot. A molekulában egy lipofil tulajdonságokkal rendelkező részt is találunk. A lipofil tulajdonságot általában a hosszú szénláncú hidrokarbon-csoportok hozzák létre, melyek jellemző módon, zsírsavak formájában vannak jelen. A zsírsavak vagy más szénhidrogén-tartalmú gyökök a cukor hidroxil-csoportjához kapcsolódhatnak, vagy a molekula peptid részéhez közvetlenül, mint például zsírsavnak a peptid részben jelen levő amino-csoporttal történő reakciója által, illetve egy kapcsoló csoporton (linking group) keresztül, mint például egy hidroxil-alkil-amin alkalmazásával, mely amidkötésen keresztül hoz létre kötést a peptid karboxilsav csoportján, vagy egy lipid funkcionális csoportja, mint például egy foszfát csoport. A lipofil muramil-peptidek létrehozásánál különösen előnyösek a foszfolipid részek. Az előnyben részesített vegyületek csoportjába tartoznak a hidroxil-alkil-amin részen keresztül a foszfolipid részhez kapcsolt muramil-dipeptidek és tripeptidek. Ezek a vegyületek a (IV) általános képlettel jellemezhetők, ahol R, R¹–R⁴, X, Y, Z és n jelentése a fentiekben megadott és L jelentése OH– vagy –NR⁶R⁷ általános képletű csoport, ahol R⁶ és R⁷ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, kyszénatomszámú alkilcsoport vagy lipid rész. Egy példa és egy különösképpen előnyben részesített vegyület az N-acetil-muramil-L-alanin-izoglutaminil-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoil-sn-gliceril-3-(hidroxil-foszforiloxi)]-etil-amid (rövidítve MTP–PE).

A fent ismertett hatóanyagok elegyítésével kaphatjuk meg az adjuváns készítményeket, mielőtt a vakcina előállítás céljából az adjuváns az antigénnel elegyítenénk. Az antigén kifejezés valamely olyan anyagra vonatkozik – beleértve egy proteint, vagy protein-poliszacharidot, protein-lipopoliszacharidot, poliszacharidot, lipopoliszacharidot, vírus alegységet, egész vírust, vagy egész baktériumot – ami az állat véráramába jutva annak szöveteibe kerül, az állatban specifikus antitestek képződését okozza, és a homológ antitestekkel in vivo, vagy in vitro specifikusan reagál. Továbbá stimulálja az antigén elleni receptorokkal rendelkező T-limfociták proliferációját, és reagál a limfocitákkal, így elindítva a sejt-közvetített immunitásban adott válaszok sorozatát.

A definícióba egy haptén is beletartozik. A haptén az antigén molekula vagy antigén komplex része, mely annak immunológiai specifikitását határozza meg. A haptén általánosan egy, a természetben előforduló antigénekben található peptid vagy poliszacharid. A mesterséges eredetű antigének esetében ez egy kis molekula-tömegű anyag lehet, mint például egy arzalinsav-származék. A haptén in vivo vagy in vitro specifikusan reagál a homológ antitesttel vagy T-limfocitával. A lehetséges deszkriptorok antigéndeterminánsok, antigén szerkezetű csoportok és haptén csoportok.

A találmány szerinti vakcina készítmények az antigén hatásos mennyiségét tartalmazzák. Ez az adjuvánssal elegyítve az antigénnek olyan mennyiségét adja melynek hatására a kezelt alany specifikus, és kielégítő mértékű reak-

ciót ad, ami a később bekövetkező vírus, baktérium, gomba, mikoplazma vagy parazita fertőzése esetén azzal szemben nyújt védelmet, amelyek ellen immunizálva lett.

A szakmai gyakorlattal rendelkezők által jól ismert eljárásokkal termelt antigének általánosan ismert forrásokból szerezhetők be. Így például az itt referenciaként említett 4 434 157, 4 406 885, 4 264 587, 4 117 112, 4 034 081 és 3 996 907 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban a macska leukémia vírus ellen alkalmazható antigén előállításának eljárását ismertetik. Egyéb antigéneket hasonló eljárásokkal állíthatunk elő. A találmány hatáskörén belül eső antigének közé a teljes inaktivált vírus részecskék, az izolált vírus fehérjék és fehérje alegységek, a teljes sejtek és baktériumok, a sejt membránok, a sejtfehérjék és hasonlók tartoznak. A találmány szerinti vakcinát madarak és emlősök betegségek és fertőzések elleni immunizálására alkalmazhatjuk, az alábbi estekben, korlátozások nélkül: kolera, diftéria, tetanusz, szarvaskököcs, influenza, kanyaró, agyhártya-gyulladás, mumpsz, plakkok képződése, poliomyelitisz, veszettség, Rocky Mountain kiütéses láz, rubeola, himlő, tifusz, hastífusz, macska leukémia vírus és sárga láz.

Nem adhatunk általános meghatározást arra vonatkozólag, hogy a találmány szerinti eljárások közül az egyes antigének esetében melyik ad specifikus módszert. Az antigén hatásos mennyiségének működése határozza meg a hozzá tartozó aktivitást és tisztaságot. Meg kell tervezni, hogy a találmány szerinti adjuváns készítmények a teljes sejtekkel, vagy vírusokkal szemben ugyanúgy alkalmazhatók-e, mint a rekombináns DNS eljárásokkal, vagy szintézissel előállított tisztított antigén vagy vírus vakcinák esetén.

Mivel a találmány szerinti adjuváns készítmények stabilak, az antigén emulziót egyszerű rázással elegyíthetjük. Más eljárások, mint például az adjuváns és az oldat, vagy az antigén szuszpenzió kis részen történő gyors átnyomása (például hipodermikus tű) szintén alkalmazhatók a vakcina készítmények létrehozására.

A fentiekben a találmányt általánosan ismertettük, az alábbiakban következő részletes példák és hivatkozások, melyeket szemléltető példákkal együtt közlünk, anélkül, hogy – amennyiben külön nem jelöltük – azok a találmány oltalmi körét korlátoznák, a jobb megértést segítik.

1. példa

A példák során, amennyiben külön nem említjük, az alábbi általános eljárásokat alkalmaztuk.

Anyagok

A MTP–PE-t a CIBA–GEIGY-től szereztük be (Basel, Switzerland). A szkvalént és a TWEEN 80-at a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, MO). A CFA-t és az IFA-t a Gibco-tól (Grand Island, NY). Az alumínium-hidroxidot (Rehsorpart) a Reheis Chemical Co.-tól (Berkeley Heights, NJ) szereztük be.

Az emulziók készítése

1. eljárás – fecskendő és tű. Foszfát pufferes fiziológiai sóoldattal (PBS) készült 4% szkvalént, 0,008%

TWEEN 80-at, 250 µg/ml MTP-PE-t, és az antigént tartalmazó elegyet 23-as átmérőjű tűn nyomtunk át hatszor. Az így kapott emulzió 10 µ körüli szemcsemérettel rendelkező olaj cseppecskéket tartalmazott, és MTP-PE-LO-ként jelöltük.

2. eljárás – Kirkland emulgeátor. A fenti elegyet ötször Kirkland emulzifikálón nyomtunk át. Az így kapott emulzió 1–2 µ közötti szemcsemérettel rendelkező olaj cseppecskéket tartalmazott, és MTP-PE-LO-KE-ként jelöltük. A Kirkland Products, Walnut Creek, CA) az általánosan ismert késsel-élezett homogenizátor (mint például a Gaulin Model 30CD, és a Rannie Minilab Type 8.30H) kis méretű változata, mely a munkatérben általában 1000 psi mellett működik.

3. eljárás – mikrofluidizáló, 0,3–18% szkvalén és 0,2–1,0 mg/ml MTP-PE elegyét TWEEN 80-al vagy anélkül nyomtuk át a mikrofluidizálón (Microfluidizer, Model No. 100Y, Microfluidizers Newton, MA) 5000–30 000 psi mellett. Általában 50 ml emulziót 5 percig vagy 100 ml emulziót 10 percig elegyítettünk a mikrofluidizálóban. A kapott emulzió 100–750 nm közötti szemcsemérettel rendelkező olaj cseppecskéket tartalmazott, a szkvalén, az MTP-PE, a detergens koncentrációjától és a mikrofluidizálóban működő hőmérséklettől és nyomástól függően.

A fenti adjuváns készítmény létrehozása után az oldathoz antigént adtunk. Az antigén emulziót rázással elegyítettük. CFA és IFA alkalmazása esetén a PBS-ben levő antigént a CFA és az IFA azonos mennyiségével elegyítettük. Az elegyet hipodermikus tűn történő átnyomással emulgeáltuk, amíg sűrű emulziót nem kaptunk.

Antigének

A Herpes simplex vírus (HSV) rgD2 egy rekombináns fehérje, melyet kínai hörcsög petefészkek sejtekből (Chinese hamster ovary cells) állítottuk elő, genetic engineering eljárások alkalmazásával. A fehérje szabályos megcsonkított kapcsolódó régiót (normal anchor region) tartalmaz, melynek eredményeket egy glikozilált fehérje szabadult ki (szekretálódott) a szövettenyészet közegébe. A gD2-t CHO közegben 90%-osnál jobban megtisztítottuk. A humán immunhiányos vírus (human immunodeficiency vírus) (HIV) env-2–3 a HIV burok fehérjék egy rekombináns változata, melyet genetic engineering eljárás alkalmazásával *Saccharomyces cerevisiae*-ben hoztunk létre. A fehérje a HIV gp120 teljes fehérje szerkeze-

tével rendelkezik, de a tisztítás útján az élesztőből kinyerve nem glikozilált és nem denaturált. A HIV gp120 egy teljesen glikozilált fehérje, a gp 120 CHO fehérjékben szekretálódott változata, melyet a gD2-nél fent ismertetett eljáráshoz hasonlóan nyerhetünk.

Az immunizált állatok

Egereket intraperitonális, intramuszkuláris és szubkután úton számos adjuváns/antigén készítménnyel injekciózunk. A tengerimalacokat a talpukba vagy intramuszkuláris úton injekciózunk. A nyulakat, kecskéket és babuin majmokat intramuszkuláris úton injekciózunk.

Az immunválasz elemzése

Az immunizáló antigénnel szemben termelt antitest titereket ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) eljárás alkalmazásával vizsgáltuk.

2. példa

Az MTP-PE-LO készítmény vizsgálata nagy állatokban

(Összehasonlító példa)

Számos kísérletet végeztünk, először a HIV env 2–3 antigénnel, majd utána a HSV gD fehérjével, MTP-PE-LO (nem mikrofluidizált) készítmény alkalmazásával a nagyobb állatokban kialakuló immunstimuláló hatás vizsgálata céljából. Ezeket a kísérleteket az alábbiakban ismertetjük.

1. HIV env 2–3

a) Tengerimalacok. A tengerimalacokat a talpukon, vagy intramuszkuláris úton immunizáltuk, 50 µg/dózis env 2–3 alkalmazásával. A vakcinát MTP-PE-LO készítmény formájában alkalmaztuk (4% szkvalén, 0,008% TWEEN 80, 50 µg/dózis MTP-PE) vagy timóban abszorbeálva (0,7% alumínium-hidroxid). A szérumokat egy héttel az immunizálás után gyűjtöttük, és az anti-env 2–3 antitesteket ELISA eljárással analizáltuk. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az MTP-PE-LO készítmény a talpba vagy intramuszkulárisan magas anti-env 2–3 antitest titereket adott. Ezzel szemben a timó esetében mindkét úton jóval alacsonyabb antitest titereket kaptunk. Ezek a kísérletek az MTP-PE-LO készítményeknek a tengerimalacoknál mutatott hatásosságát tükrözik.

1. táblázat

A különböző adjuvánsok összehasonlítása a különböző injektálási módok az env 2–3 specifikus antitestek esetében^a

Adjuváns csoport	Állat	Beadás módja	env 2–3 ELISA titerek						
			Az immunizálás száma						
			0	2	3	4	5	6	7
MTP-PE 4% szkvalén 0,008% TWEEN 80	839	FP	<<110 ^c	135 500	382 100	343 100	401 800	338 000	382 700
	840	FP	<< 100	331 700	588 700	542 300	392 900	359 000	292 100
	841	FP	<<100	247 800	330 900	301 100	285 800	334 400	383 700
	842	FP	<<100	108 100	570 300	694 300	344 400	289 800	220 300
	843	FP	<<100	65 000	– ^b	–	–	–	–
	844	FP	<<100	25 000	–	–	–	–	–
	átlag	FP	<<100	152 000	468 000	470 000	356 000	330 000	295 000

Adjuváns csoport	Állat	Beadás módja	env 2–3 ELISA titerek						
			Az immunizálás száma						
			0	2	3	4	5	6	7
MTP–PE 4% szkvalén 0,008% TWEEN 80	845	IM	<<100	12 300	19 600	23 800	15 100	20 000	27 300
	846	IM	<<100	10 400	20 500	43 600	44 800	121 100	42 000
	847	IM	<<100	29 700	80 000	136 800	156 000	144 500	164 400
	848	IM	<<100	447 000	640 000	400 000	71 000	674 000	533 000
	849	IM	350	10 600	78 700	0000	533 000	nt	200 000
	850	IM	<<100	340 000	–	–	–	–	–
	átlag	IM	<<100	142 000	168 000	183 000	164 000	240 000	193 000
timsó	863	FP	<<100	<<100	nt ^d	nt	nt	nt	nt
	864	FP	<<100	2500	4100	86 000	47 700	21 000	6000
	865	FP	<<100	2400	26 400	80 400	83 500	39 200	4500
	866	FP	<<100	15 100	103 900	124 100	107 100	56 700	16 800
	867	FP	<<100	2200	8800	14 500	11 900	11 400	12 300
	868	FP	<<100	6500	44 500	34 000	18 800	12 800	–
	átlag	FP	<<100	5700	38 000	68 000	54 000	28 000	12 000
timsó	869	IM	<<100	<<100	300	2600	2000	1600	2300
	870	IM	<<100	<<100	130	220	330	270	300
	871	IM	<<100	<<100	1200	4300	4900	3 000	1600
	872	IM	<<100	<<100	300	900	920	770	1700
	873	IM	<<100	<<100	990	41 100	79 800	27 900	15 500
	874	IM	<<100	<<100	940	17 300	13 200	10 600	8600
	átlag	IM	<<100	<<100	640	11 000	17 000	7000	5000

^a A tengerimalacokat havonta 50 „m” g/dózis mennyiségű env 2–3 alkalmazásával immunizáltuk a két különböző adjuvánssal, a talpukon (footpad; FP), intramuszkuláris (IM) úton. A szérumokat az egyes immunizálások után egy héttel gyűjtöttük.

^b „–” az állatok elpusztulása miatt nem kaptunk adatokat.

^c <<100 1:100 szérumhígítás mellett nem kaptunk ELISA jeleket.

^d Nem vizsgáltuk.

b) Kecskék. Pár kecskét először 1 mg env 2–3-al, majd 500 µg mennyiségű, 0–500 µg között változó mennyiségű MTP–PE-t tartalmazó MTP–PE készítménnyel immunizáltunk. A pozitív kontroll állatok az első immunizálást CFA alkalmazásával kapták, majd a második immunizálást IFA alkalmazásával. Egy csoport 100 µg env 2–3-t kapott az első immunizálás során, majd 50 µg-ot a 100 mg MTP–PE-t tartalmazó MTP–PE készítménnyel történő második immunizá-

lás során. Amint a 2. táblázatban láthatjuk, minden Freund-féle adjuvánst kapott kecske magas antitest titert adott 2700–62 800 közötti értékkel. Ezzel szemben a legtöbb MTP–PE készítménnyel kezelt kecske negatív volt az anti-env 2–3 antitestekre nézve. A választ adó állatoknál is csak 100–600 közötti titereket kaptunk. Ezek az eredmények élesen szembenállnak a fent ismertetett, a tengerimalacok esetében kapott adatokkal.

2. táblázat

Az env 2–3-al és különböző MTP–PE dózisokkal immunizált kecskékben kapott antitest válasz

Adjuváns készítmény	Állatok száma	Env 2–3 ELISA titer		
		0	1	2
Freund-féle	2295	<<100 ^b	43 200	62 800
	2296	<<100	2 700	7500
*ST+0 µg MTP–PE	2297	<<100	<100 ^c	<100
	2298	<<100	100	300
ST+20 µg MTP–PE	2290	<<100	<100	<100
	2302	<<100	100	200
ST+50 µg MTP–PE	2301	<<100	<<100	<100
	2302	<<100	<<100	<100
ST+100 µg MTP–PE	2302	<<100	<<100	100
	2304	<<100	<<100	<100

Adjuváns készítmény	Állatok száma	Env 2–3 ELISA titer		
		0	1	2
ST+250 µg MTP-PE	2305	<<100	<100	600
	2306	<<100	<<100	<100
ST+500 µg MTP-PE	2307	<<100	<100	<100
	2308	<<100	<<100	<100
ST+1000 µg MTP-PE	2309	200	500	200
	2310	<<100	<<100	<<100

^a ST az alacsony szénatomszámú olajkészítmény; 4% szkvalén, 0,008% TWEEN 80.

^b A <<100 jelölés az olyan env 2–3 ELISA titereket jelöli, melyek 1/100 szérumhígítások mellett nem voltak magasabbak a háttérnél.

^c A <100 jelölés az olyan env 2–3 ELISA titereket jelöli, melyek 1/100 szérumhígítások mellett a háttérnél magasabbak, de a mérés során kapott legnagyobb jel felénél kisebb voltak.

c) Kutyák. Vadászkopókat (beagle dogs) három hetes intervallumokban 250 µg mennyiségű env 2–3 MTP-PE-LO-ban készült elegyével (100 µg MTP-PE), vagy csak MTP-PE-LO készítménnyel immunizáltunk. Az egyes immunizálások után 10 nappal az állatokat véreztettük, és ELISA eljárással meghatároztuk az anti-env 2–3 titereket. A 3. táblázat eredményei szerint az env 2–3-al,

és adjuvánssal kezelt kutyákban kialakult az env 2–3 titer, de ezek a titerek a tengerimalacoknál kapott szinthez képest (a két állat esetén kapott legnagyobb titerek 1700 és 6300) alacsonyak voltak, így nem megfelelőek. Továbbá ezeknek az állatoknak sem homológ (SF2), sem heterológ (BRU, vagy Zr6) HIV törzsek esetében nem sikerült a vírust semlegesítő antitestek termelése.

3. táblázat

MTP-PE-LO adjuvánsban alkalmazott env 2–3-al immunizált vadászkopók szérumában kapott semlegesítő antitest titerek és ELISA eredmények

Állatok száma	Immunizáló szer	Env 2–3 semlegesítő titerek				
		Immunizáló		ELISA HIV-SF2	HIV-BRU	HIV-Zr6
		#t	titer			
1375	env 2–3	elő vérezt.	<<100 ^b	<20 ^c	<20	<20
	MTP-PE-LO 100 µg	2	1300	<20	<20	<20
	MTP-PE	3	1700	<20	<20	<20
		4	900	<20	<20	<20
		5	400	<20	<20	<20
		6	300	<20	<20	<20
		7	300	<20	<20	<20
1376	env 2–3	elő vérezt.	<<100	<20	<20	<20
	MTP-PE-LO 100 µg	2	3500	<20	<20	<20
	MTP-PE	3	6300	<20	<20	<20
		4	5100	<20	<20	<20
		5	2100	<20	<20	<20
		6	2200	<20	<20	<20
		7	2000	<20	<20	<20
1377	MTP-PE-LO	elő vérezt.	<<100	<20	<20	<20
	O-MTP-PE kontroll	2	<<100	<20	<20	<20
		3	<<100	<20	<20	<20
		4	<<100	<20	<20	<20
		5	<<100	<20	<20	<20
		6	<<100	<20	<20	<20
		7	<<100	<20	<20	<20

Állatok száma	Immunizáló szer	Env 2–3 semlegesítő titerek				
		Immunizáló		ELISA HIV–SF2	HIV–BRU	HIV–Zr6
		#t	titer			
1378	MTP–PE–LO	elő vérezt.	<<100	<20	<20	<20
	O–MTP–PE kontroll	2	<<100	<20	<20	<20
		3	<<100	<20	<20	<20
		4	<<100	<20	<20	<20
		5	<<100	<20	<20	<20
		6	<<100	<20	<20	<20
		7	<<100	<20	<20	<20

^a A kutyák Biocin adjuvánsban (100 µg MTP–PE) 250 µg env 2–3-t kaptak, intramuszkulárisan, 21 naponként. a vérmintákat az egyes injekciózások után 10 nappal gyűjtöttük.

^b A <<100 jelölés az olyan ELISA titereket jelöli, melyek esetén 1/100 szérumhígítások mellett nem kaptunk eredményeket.

^c A <20 jelölés az olyan semlegesítő titereket jelöli, melyek esetén semlegesítő hatást nem tapasztaltunk a mérés során legtöbbszörre koncentrált (1–20) szérumhígítások.

d) Sertések. A sertéseket 1 mg mennyiségű env 2–3 MTP–PE–LO-ban készült elegyével (100 µg MTP–PE) 21 naponként immunizáltuk. A kontroll állatok csak adjuvánt kaptak. Az egyes immunizálások után 10 nappal az állatokat véreztettük, és ELISA eljárással meghatároztuk az anti-env 2–3 titereket. A 4. táblázat

eredményei szerint a kezelt állatok közül kettő csak alacsony anti-env 2–3 titert adott (140, illetve 100), továbbá ezeknek az állatoknak sem homológ (SF2), sem heterológ (BRU, vagy Zr6) törzsek esetében nem sikerült detektálható mértékű vírust semlegesítő titereket elérni.

4. táblázat

MTP–PE–LO adjuvánsban alkalmazott env 2–3-al immunizált sertésekben kapott semlegesítő antitest titerek, és ELISA eredmények^a

Állatok száma	Antigén	Immunizálás száma	Env 2–3 semlegesítő titerek			
			ELISA titer	HIV–SF2	HIV–BRU	HIV–Zr6
1371	env 2–3	elő vérezt.	<<50 ^b	<20 ^d	<20	<20
		2	<50 ^c	<20	<20	<20
		3	70	<20	<20	<20
		4	70	<20	<20	<20
		5	80	<20	<20	<20
		6	70	<20	<20	<20
		7	140	<20	<20	<20
1372	env 2–3	elő vérezt.	<<50	<20	<20	<20
		2	100	<20	<20	<20
		3	70	<20	<20	<20
		4	70	<20	<20	<20
		5	60	<20	<20	<20
		6	90	<20	<20	<20
		7	90	<20	<20	<20
1373	adjuváns kontr.	elő vérezt.	<<50	<20	<20	<20
		2	100	<20	<20	<20
		3	70	<20	<20	<20
		4	70	<20	<20	<20
		5	60	<20	<20	<20
		6	90	<20	<20	<20
		7	90	<20	<20	<20

Állatok száma	Antigén	Immunizálás száma	Env 2–3 semlegesítő titerek			
			ELISA titer	HIV-SF2	HIV-BRU	HIV-Zr6
1374	adjuváns kontr.	elő vérezt.	<<50	<20	<20	<20
		2	<<50	<20	<20	<20
		3	<<50	<20	<20	<20
		4	<<50	<20	<20	<20
		5	<<50	<20	<20	<20
		6	<<50	<20	<20	<20
		7	<<50	<20	<20	<20

^a A sertések Biocin adjuvánsban (100 µg MTP-PE) 1 mg env 2–3-t kaptak, intramuszkulárisan, 21 naponként. A vérmintákat az egyes injekciózások után 10 nappal gyűjtöttük.

^b A <<50 jelölés az olyan titereket jelöli, melyek esetén 1/50 szérumhígítások mellett nem kaptunk eredményeket.

^c Kis mértékű, de detektálható jeleket kaptunk 1–50 szérumhígítások mellett.

^d A mérés során a legtöményebbre koncentrált (1–20) szérumhígítások esetén sem tapasztaltunk semlegesítő hatást.

e) Majmok. Rhesus makákókat 30 napos intervallumokban 250 µg mennyiségű env 2–3 MTP-PE-LO-ban készült elegyével (100 µg MTP-PE) immunizáltunk. Az egyes immunizálások után 1 héttel az állatokat véreztettük, és ELISA eljárással meghatároztuk az

20 anti-env 2–3 titereket. Az 5. táblázat eredményei szerint a kutyákhoz hasonlóan minden egyes állat esetén kialakult a env 2–3 antitest titer, de ezek a titerek 300–3100 közötti értékeket mutattak, ami jóval alacsonyabb a tengerimalacoknál kapott értékeknél.

5. táblázat

MTP-PE-LO adjuvánsban alkalmazott env 2–3-al immunizált Rhesus makákó env 2–3 specifikus antitestek titere

Állatok Antigén	Szám	Előre véreztetett	Immunizálás					
			1	2	3	4	5	6
Env 2–3	1189	<<100	<<100	300	700	400	400	300
	1190	<<100	<<100	<<100	800	800	900	
	1191	<<100	<<100	500	2000	1300	1900	
	1192	<<100	<<100	1100	900	400	400	
	(átlag)	<<100	<<100	780	1100	700	900	
Adjuváns kontroll	1197	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100
	1198	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	
	1199	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	
	1978	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	
	(átlag)	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	

^a Az állatok Biocin adjuvánsban (100 µg MTP-PE) 250 mg antigént kaptak intramuszkulárisan, 30 naponként. A vérmintákat az egyes immunizálások után egy héttel gyűjtöttük.

2. HSV gD

a) Kecskék. Az adjuváns készítmények sorozatát gD2-vel kecskéken vizsgáltuk. Az állatokat 100 µg gD2-nek számos adjuvánssal alkotott elegyével immunizáltuk. A második, és a harmadik immunizálás után 10 nappal az állatokat véreztettük, és ELISA eljárással meghatároztuk az anti-env 2–3 titereket. Az adjuvánsokat alkalmaztuk. CFA (1°), majd IFA (2° & 3°), 100 µg MTP-PE-t tartalmazó IFA, 0,8 mg/ml alumínium-hidroxid (alum), MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE), MTP-PE-LO-KE (100 µg MTP-PE-LO-KE (12% szkvalén, 5,0 mg MTP-PE). Az ELISA eredményeket a 6. táblázatban foglaltuk össze. Egy CFA/IFA-val kezelt állat és MTP-PE-LO-KE-vel (5 mg MTP-PE) kezelt

állat esetén magas antitest titert tapasztaltunk (2187–13 172). Egy CFA-IFA-val kezelt állat, az összes timfölddel kezelt állat, és egy MTP-PE-LO-KE-vel (5 mg MTP-PE) kezelt állat adott közepes antitest titert (569–1489). Az MTP-PE-LO alkalmazásával kezelt állatok alacsony anti-gD2 titereket adtak (46–323). Így, amint ezt fent, az env 2–3 esetén megjegyeztük, az MTP-PE-LO készítmény kecskék esetén nem felel meg a magas antitest titerek kialakítása céljából. Az emulzió Kirkland-féle emulzióval történő módosítása (1–2 mm olajcseppecske méret) sem javított az adjuváns teljesítményén. Ugyanakkor óriási javulást tapasztaltunk az adjuváns teljesítményében MTP-PE jelenlétében (5,0 mg-ig).

6. táblázat
Az adjuváns hatékonysága gD2 esetén kecskéken

Csoport	Állat	Adjuváns	2.	3.
			immunizálás után kapott ELISA titer	
1	3606	CFA/IFA	2187	13 172
	3609		738	770
2	3610	tímsó	1489	781
	3611		921	522
3	3612	MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE)	77	194
	3613		145	323
4	3614	MTP-PE-LO-KE (100 µg MTP-PE)	123	227
	3614		56	46
5	3624	MTP-PE-LO-KE (12% szkvalén 5,0 mg MTP-PE)	142	569
			615	2291

b. Babuin majmok. Fiatal babuin majmokat immunizáltunk tímsóval, MTP-PE-LO-KE-vel, MTP/IFA-val és IFA-val elegyített gD2-vel. Ezenkívül egy dózis-függési vizsgálatot végeztünk tímsóval, és MTP-PE-LO-KE-vel elegyített gD2-vel. A 2–3 évnél fiatalabb (3,4–12 kg) babuin majmokat a combjukban intramuszkulárisan három alkalommal immunizáltunk, két-három hetes intervallumokban. A szérumot három héttel az első két immunizálás, és két héttel az utolsó vakcina adag után gyűjtöttük, a gD2-specifikus antitestek ELISA eljárással történő meghatározása céljából. Az adott időpontokban a teljes vérsajt analízis (total blood cell analyses; CBC) céljából az összes vért levettük. A 100 µg mennyiségű, alumhoz kötött gD2-vel immunizált babuin majmokban 3349±550 közötti anti-gD2 antitest titerek alakultak ki. Ezek a titer értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a

három vizsgált antigén dózis (10, 25, 10 µg fehérje) esetén. A 250 µg MTP-PE-LO-KE-vel emulgeált gD2 10, vagy 100 µg mennyiségével kezelt, vagy az 50, vagy 1000 µg MTP-PE-LO-KE-vel emulgeált gD2 25 µg mennyiségével kezelt állatok négy csoportjánál kapott antitest válaszok azokhoz a csoportokhoz voltak hasonlóak, melyeket a gD2/tímsó (1300–3900) vakcina 250 µg MTP-PE-LO-KE-vel emulgeált gD2 25 µg mennyiségével kezelt csoportnál kaptunk. A tímsóval immunizált állatok esetén kapott titerek értéke körülbelül 1%-a volt az MTP/IFA vakcinák alkalmazásával immunizált állatoknál kapott értékeknek, míg az MTP-PE-LO-KE-vel immunizált állatok esetén kapott titerek értéke 0,5–1,3 között volt az MTP/IFA vakcinák alkalmazásával immunizált állatokhoz képest. Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat
Babuin majmokon végzett HSV vakcina kísérletek: antitest titerek^a

Adjuváns össze- tétel (mg)	gD2 dózis (mg)	dózis (mg)	ELISA titerek ^b			
			1° vér	2° vér	3° vér	MTP-PE/IFA ^c
1 tímsó	400	10	287 (+123)	1002 (+366)	1566 (+350)	0.6
2 tímsó	400	25	1075 (+785)	880 (+343)	1993 (+1156)	0.8
3 tímsó	400	100	720 (+184)	1882 (+489)	3349 (+550)	1.3
4 MTP-PE/LO	50	25	140 (+63)	788 (+331)	1320 (+430)	0.5
5 MTP-PE/LO	250	10	217 (+103)	2490 (+995)	3244 (+1582)	1.3
6 MTP-PE/LO	250	100	57 (+34)	925 (+254)	2439 (+510)	1.0
7 MTP-PE/LO	1000	25	91 (+70)	1097 (+565)	3883 (+2401)	1.6
8 MTP-PE/IFA	250	25	24 101 (+5423)	62 775 (+28 643)	250 382 (+64 771)	100
9 IFA		25	2591 (+2280)	7631 (+6563)	66 132 (+75 095)	62.4

^a Minden állatot gD2-vel IM immunizáltunk, a combba; 4 állat/csoport

^b 50% végpont antitest titer, geometrikus eljárás, +SD.

^c A pozitív gD2-specifikus limfoproliferatív választ adó állatokat >3,0 stimulációs indexszel jelöltük.

A vakcinák hatására káros mellékhatásokat egy állatnál sem tapasztaltunk, és a CBC profilok is megfelelőek voltak.

3. példa

Az MTP-PE-LO-MF találmány szerinti készítmény hatása a nagy állatok immunitásának stimulálásában

Amint a 2. példában bemutattuk, nagy állatok esetén a fecskendővel és tűvel (megközelítőleg 10 µ körüli szemcseméret), illetve Kirkland emulzifikálóval (1–2 µ körüli szemcseméret) létrehozott MTP-PE-LO készítmény nem felelt meg a vakcina antigének jó immunstimulálása céljából. (Humán adatokat nem mutatunk be.) Kisebb szemcseméret és stabil emulziók kialakításához a 110Y mikrofluidizáló modellt (microfluidizer model 110Y) alkalmaztuk. A készülék nagy nyomású (5000–

30 000 psi), alámerített fecskendő típusú emulzifikáló. A szkvalén, a TWEEN 80 és az MTP-PE koncentrációk, és a fizikai paraméterek, mint például a hőmérséklet, és a működési nyomás alapján számos sorozatot hoztunk létre, a szemcseméretet és a stabilitást változtatva. A mikrofluidizálóval létrehozott különböző emulziókra a 8. táblázatban soroltuk fel példákat. A fizikai paramétereknek, és az emulzió összetételének változtatásával 1 µ-tól 0,2 µ-nál kisebb szemcseméret közötti olajszemcse méretet értünk el. Amint a 8. táblázatban látható, az emulzió szemcseméretét csökkentő paraméterek közé tartozik a detergens mennyiségének növelése, az MTP-PE, és a szkvalén arányának növelése, a működési nyomás növelése, és a működési hőmérséklet növelése. A továbbiakban ezeket a kis szemcseméretű emulziókat, mint a vakcina antigének adjuváns anyagait, kecskéken és babuin majmokon vizsgáltuk.

8. táblázat

*Az MTP-PE-szkvalén TWEEN 80 összetételének és fizikai paramétereinek hatása
Az emulziókat mikrofluidizálóval állítottuk elő*

	MTP-PE (mg/ml)	Szkvalén (%)	TWEEN 80 (%)	Mannitol (%)	Vizes fázis	Hőm. (°C)	Nyomás (KPSI)	Méret (m)
A	0,01	2	0,004	0	H ₂ O	40	5	0,23
B	0,20	2	0,004	0	H ₂ O	40	5	0,17
C	1,00	2	0,160	5	H ₂ O	0	10	0,19
D	0,50	2	0,000	5	H ₂ O	40	10	0,16
E	0,50	2	0,000	0	H ₂ O	40	10	0,17
F	1,00	4	0,000	0	H ₂ O	30	10	0,19
G	1,00	4	0,000	0	H ₂ O	20	10	0,20
H	1,00	4	0,000	0	H ₂ O	0	15	0,20
I	1,00	4	0,000	0	H ₂ O	0	10	0,29
J	1,00	4	0,000	0	H ₂ O	0	5	0,39
K	1,00	4	0,160	0	H ₂ O	0	10	0,22
L	1,00	4	0,016	0	H ₂ O	0	10	0,27
M	1,00	6	0,000	0	H ₂ O	0	10	0,29

1. A HSV gD2 vizsgálata kecskéken

A gD2-höz alkalmazott első mikrofluidizáló 4% szkvalén, és 100 µg/ml MTP-PE emulzió volt, TWEEN 80 nélkül (MTP-PE-LO-MF # 13; az MTP-PE-LO-MF készítmények számjelzése önkéntes, és azokat csak mint referencia számokat vezettük be). Az anyagokat mikrofluidizáló készülékben állítottuk elő, az olajszemcse méret 0,8 µ körül volt. A kecskéket 21 napon intervallumokban intramuszkulárisan a fenti gD2 készítmény 100 µg mennyiségével immunizáltuk. A kecskéket először 100 µg gD2 CFA-ban levő elegyével, majd másodszor IFA-ban levő elegyével immunizáltuk, míg a harmadik immunizálás a kontroll volt. A második, és a harmadik immunizálás után tíz nappal az állatokat véreztettük, és ELISA eljárással meghatároztuk az anti-gD2 antitest titereket. Az eredményeket a 10. táblázatban foglaltuk össze. Minden MTP-PE-LO-MF-el kezelt állat

szignifikáns anti-gD2 titereket adott. Ezeket a titereket, 1661–2966, közvetlenül összehasonlítottuk a két CFA/IFA kontroll kecske esetén kapott titerekkel (140–24 296). Az MTP-PE-LO-MF-el kezelt állatok esetén kapott titerek szignifikánsan magasabbak voltak mint a fecskendővel, és tűvel, illetve Kirkland-féle emulzifikálóban előállított MTP-PE-LO készítménnyel kezelt kecskék (lásd 6. táblázat). Egy második kísérletben a kecskéket 21 naponként 100 µg gD2-vel kezeltük, mely MTP-PE-LO-MF #16 készítményben volt. A készítmény 4% szkvalént, 500 µg/ml MTP-PE-t, és 0 TWEEN 80-at tartalmazott. Az olajcseppek mérete 0,5–0,6 µ között volt. Amint ezt a 10. táblázatban is láthatjuk, a készítmény még az előzőnél is magasabb antitest titereket adott. Így az olajcseppek méretének csökkentésével, és/vagy az MTP-PE mennyiség fokozásával az emulzió adjuváns teljesítménye javult.

9. táblázat
Az MTP-PE-LO-MF #13 adjuvánsként történő vizsgálata, gD2 esetén, kecskéken

Csoport	Állatok száma	Adjuváns	Antigén	2.	3.
				immunizálás utáni ELISA titer	
1	4519	CFA/IFA	gD2 (100 µg)	9868	24 269
	4520	CFA/IFA	gD2 (100 µg)	140	980
2	4598	MTP-PE-LO-MFa	gD2 (100 µg)	2996	2207
	4599	MTP-PE-LO-MF	gD2 (100 µg)	1661	N. T. ^b

^a 4% szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, H₂O, olajszemcsék mérete megközelítőleg 0,8 µ.

^b N. T. Nem vizsgáltuk. Az állatok nem az immunizálással kapcsolatosan pusztultak el.

10. táblázat
Az MTP-PE-LO-MF #16 adjuvánsként történő vizsgálata, gD2 esetén, kecskéken

Állatok immunizálási száma	Adjuváns	Antigén	2.	3.
			immunizálás utáni	ELISA titer
5013	MTP-PE-LO-MF #16	gD2 (100 µg)	1299	386
5014	MTP-PE-LO-MF #16	gD2 (100 µg)	6657	2806
5015	MTP-PE-LO-MF #16	gD2 (100 µg)	8206	1943
5016	MTP-PE-LO-MF #16	gD2 (100 µg)	7886	1514

^a MTP-PE-LO-MF #16 – 4% szkvalén, 500 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, H₂O. Az olajszemcsék mérete megközelítőleg 0,5–0,6 µ.

2. A HIV env 2–3 és a gp120 vizsgálat kecskéken

A mikrofluidizátorban kapott készítményeket a CFA/IFA és a MTP-PE-LO-MF adjuvánsok alkalmazásával összehasonlítottuk a HIV antigén env 2–3-al és a gp120-al. Az állatokat 21 napos intervallumokban 100 µg gp120 antigénnel immunizáltuk, melyet CFA(1°)/IFA(2° & 3°), MTP-PE-LO-MF #14 (4% szkvalén, 500 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat), MTP-PE-LO-KE (4% szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0,008% TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat, Kirkland-féle emulzifikátorban emulgeálva), és MTP-PE-LO-MF #15 (4% szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0,008% TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat, mikrofluidizátorban emulgeálva) jelenlétében alkalmaztunk. Az állatokat továbbá 100 µg HIV antigén env 2–3-al immunizáltuk melyet CFA/IFA, illetve MTP-PE-LO-MF #14 jelenlétében alkalmaztunk. Az eredményeket a 11. táblázatban foglaltuk össze. Az env 2–3 esetében az MTP-PE-LO-

MF #14 alkalmazásával immunizált állatok két immunizálás esetén a CFA/IFA állatokkal egyenértékű titereket mutattak, míg három immunizálás esetén a CFA/IFA állatoknál magasabb titereket mutattak. A gp120 esetében kapott eredmények nem voltak világosak. Az MTP-PE-LO-MF #14 állatok több változást mutattak, mint a CFA/IFA állatok. Így a mikrofluidizáló csoport fő titere alacsonyabb, mint a CFA csoporté, de az egyes MTP-PE-LO-MF #14 készítményekkel kezelt állatok éppen olyan magas titereket mutattak, mint a CFA/IFA csoport állatai. A két különböző eljárással (Kirkland emulzifikáló, illetve mikrofluidizáló) emulzifikált, azonos adjuváns komponenseknek (4% szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0,008% TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldatban) a gp120-al való összehasonlítása az emulzió szemcseméretének fontosságát illusztrálta. A Kirkland emulzifikáló által kapott anyag fő titere az említett immunizálás után 632 volt, míg a mikrofluidizáló által kapott anyag fő titere az említett immunizálás után 3277 volt.

11. táblázat
Az MTP-PE-LO-MF adjuvánsként történő vizsgálata, HIV antigén env 2- illetve gp120 esetén

Csop.	Állatok száma	Adjuváns	Antigén	ELISA titer			
				2. immun. után	Genometrikus módszer +SD	3. immun. után	Genometrikus módszer +SD
1	5018	CFA/IFA	gp120 (100 mg)	900	1861+539	7300	6630+996
	5019	CFA/IFA	gp120 (100 mg)	3700		5700	
	5020	CFA/IFA	gp120 (100 mg)	2000		7100	
	5021	CFA/IFA	gp120 (100 mg)	1800		3400	

Cso.	Állatok száma	Adjuváns	Antigén	ELISA titer			
				2. immun. után	Genometrikus módszer +SD	3. immun. után	Genometrikus módszer +SD
2	5022	CFA/IFA	env2 (100 mg)	2400		3000	
	5023	CFA/IFA	env2 (100 mg)	4600	2235+680	3400	5074+1378
	5024	CFA/IFA	env2 (100 mg)	2400		8900	
3	5026	MTP-PE-LO-MF #14 ^a	gp120 (100 mg)	0		800	
	5027		gp120 (100 mg)	300	101+1089	500	1324+994
	5026		gp120 (100 mg)	3407		5800	
4	5030	MTP-PE-LO-MF #14 ^a	env 2 (100 mg)	7900		19 500	
	5031		env2 (100 mg)	4600	2351+1688	6600	9896+2493
	5032		env2 (100 mg)	300		6900	
	5033		env2 (100 mg)	2800		10 800	
5	5034	MTP-PE-LO-KE ^b	gp120 (100 mg)	0		800	
	5035		gp120 (100 mg)	1400	721+416	600	632+32
	5037		gp120 (100 mg)	400		700	
6	5038	MTP-PE-LO-MF #15 ^c	gp120 (100 mg)	1000		5100	
	5040		gp120 (100 mg)	0	10+333	2300	3277+767
	5041		gp120 (100 mg)	0		3000	

^a MTP-PE/LO-MF #14 – 4% szkvalén, 500 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat, mikrofluidizátorban emulgeálva

^b MTP-PE-LO-KE – 4% szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0,008% Tween 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat, Kirkland-féle emulzifikátorban emulgeálva

^c MTP-PE-LO-MF #15 – 4 % szkvalén, 100 µg/ml MTP-PE, 0,008% TWEEN 80, foszfát pufferes fiziológiás sóoldat, mikrofluidizátorban emulgeálva

3. A HIV env 2–3, és a gp120 vizsgálata babuin majmokon

Babuin majmokon HIV env 2–3-at, és gp120-at vizsgáltunk MTP-PE-LO-MF #1 készítménnyel (2% szkvalén, 500 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, H₂O, olajszemcsék mérete megközelítőleg 0,17 µ), mint adjuvánssal. Kontrollként MTP-PE-t alkalmaztunk, IFA-ban és timsóban. Az állatokat egy hónapos intervallumokban immunizáltuk. A második immunizálás után két héttel az állatokat véreztettük, és meghatároztuk az anti-env 2–3 an-

titest vírus semlegesítő titereket. Az eredményeket a 12. táblázatban mutatjuk be. MTP-PE-LO-MF #1 esetén a gp120-al szemben mutatott antitest titerek magasabbak voltak, mint MTP-PE-IFA esetén. Az anti-env 2–3 titerek az MTP-PE-IFA alkalmazásával kezelt csoportok esetén az MTP-PE-LO-MF #1-hez hasonló értékek voltak. A timsó esetén elért anti-gp120 titerek az MTP-PE-LO-MF #1 titerekhez hasonlóak voltak, de a timsó esetén elért anti-env 2–3 titerek alacsonyabbak voltak, mint az MTP-PE adjuváns esetében.

12. táblázat

Az MTP-PE-LO-MF #1 adjuvánsként történő vizsgálata, HIV protein env 2, illetve gp120 esetén

Cso.	Állatok száma	Adjuváns	Antigén	Vírus ELISA titer 2. immunizálás után	Semlegesítő anti-test-titer
1	2947	MTP/IFA (350 mg MTP-PE)	gp120 (55 mg)	<100	<10
	2948		gp120 (55 mg)	<100	<10
	2949		gp120 (55 mg)	3000	<10
2	2550	MTP/IFA (250 mg MTP-PE)	env2 (25 mg)	400	<10
	2451		env2 (25 mg)	34 400	30
	2952 ^		env2 (25 mg)	142 300	200

Csop.	Állatok száma	Adjuváns	Antigén	Vírus ELISA titer 2. immunizálás után	Semlegesítő anti- test-titer
3	2953	MTP-PE-LO-MF #1 ^a	gp120 (55 mg)	51 000	200
	2957		gp120 (55 mg)	43 000	35
	2595		pg120 (55 mg)	800	50
4	2956	MTP-PE-LO-MF #1	env2 (25 mg)	600	<10
	2957		env2 (25 mg)	14 400	35
	2958		env2 (25 mg)	87 400	>250
5	2964	timsó ^b	gp120 (55 mg)	56 000	150
	2965	timsó	gp120 (55 mg)	100	<10
6	2966	timsó	env2 (25 mg)	4900	80
		timsó	env2 (25 mg)	700	<10

^a MTP-PE-LO-MF #1 – 2% szkvalén, 500 µg/ml MTP-PE, 0 TWEEN 80, H₂O. Az olajszemcsék mérete megközelítőleg 0,17 µ.

^b 0,8 mg/ml alumínium-hidroxidhoz kötött timsó antigén.

4. példa

További adjuváns/antigén készítmények

A fenti példákban ismertetettekén kívül számos más, a találmány szerinti antigént és adjuvánt tartalmazó vakcina készítményt állítottunk elő. Ezek influenza és malária antigéneket, valamint a HIV-hez és a HSV-hez kapcsolódó, a fenti példákban említettektől eltérő antigéneket tartalmaztak. A citomegalovírus (CMV), és hepatitis C vírus (HCV) antigéneket fent már ismertettük, ezeket a fent más ismertetett adjuváns készítményekhez hasonlóan alkalmazhatjuk.

Antigének

Az általánosan ismert forrásokból beszerezhető influenza antigének alkalmasak a találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára. Az alábbi példákban bemutatásra kerülő antigéneket az alábbi cégek gyártják: a Fluogen^R-t a Parke-Davis; a Duphar-t a Duphar B. V; és az A41 influenza vakcinát az Instituto Vaccinogeno Pozzi.

A találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára alkalmas malária antigéneket a 336 288 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés ismerteti, benyújtva 1989. április 11-én, amely megfelel az EP-A 467 965 sz. közrebecsátási iratok, és a 4 826 957 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti, bejegyezve 1989. május 2-án.

További, a találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára alkalmas HIV antigéneket ismertet a 490 858 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, benyújtva 1990. március 9-én (megfelel az EP-A 519 001 sz. közrebecsátási iratnak). További HIV antigének találhatók a 181 150 számú európai közrebecsátási iratban (1986. május 14.).

További, a találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára alkalmas HSV antigéneket ismertet a WO 85/04 587 számú PCT-beli közzétételi irat, és a WO 88/02 634 számú PCT-beli közzétételi irat. A gB, és gD antigének elegye, mely megcsontkított felszíni antigéneket (truncated surface antigen) tartalmaz, különösképpen előnyös.

További, a találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára alkalmas citomegalovírus antigéneket ismertet a 4 689 225 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, bejegyezve 1987. augusztus 25/én, és a WO 89/07 143 számú PCT-beli közzétételi irat.

További, a találmány szerinti vakcina készítményekben történő felhasználás céljára alkalmas hepatitis C antigéneket ismertet a WO 89/04 669 sz. PCT-beli közzétételi irat, mely megfelel a 318 216 számú európai közrebecsátási iratnak (közrebecsátva 1989. május 31-én), és a 1-500 565 számú japán közrebecsátási iratnak (bejegyezve 1988. november 18-án), valamint az 583 561 számú kanadai szabadalmi leírásnak. A HCV antigének különböző sorozatait a 388 232 számú európai közrebecsátási irat (közrebecsátva 1990. március 16-án) ismerteti. Továbbá lásd a 456 637 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentést, benyújtva 1989. december 21-én, amely megfelel az EP-A 398 748 sz. közrebecsátási iratnak és a T/59 964 sz. közrebecsátási iratnak.

Adjuváns készítmények, és előállítási eljárások

Az alábbi összefoglalás az adjuváns készítményeket, az adjuvánsok, illetve a különböző antigén anyagok előállítására vonatkozó eljárásokat ismerteti. Egyes esetekben csak a vakcinákról készített tanulmányok összefoglalását ismertetjük, a fenti példák részletezése nélkül, mivel a fent ismertetett tanulmányok már elég ismeretanyagot nyújtanak az adott vakcina készítmény alkalmazásáról.

Influenza

Egy kísérlet sorozatban hörcsögöket immunizáltunk általános influenza vakcinával (Instituto Vaccinogeno Pozzi). A vakcina két A törzsből (A/Leningrád/360/86, és A/Singapore/6/86), és egy B törzsből (B/Ann/Arbor/1/86) tisztított HA-t tartalmazott. A vakcinát önmagában, Kirkland-féle emulzifikálóban előállított MTP-PE/LO emulzió formájában (Fluoromed Pharmaceutical, Inc., La Mesa, CA), és mikrofluidizálóban előállított MTP-PE/MF emulzió formájában

(model 110Y, Microfluids, Newton, MA) vizsgáltuk. Az első két készítmény összehasonlító jellegű volt, míg az „MF” készítmény a találmány szerinti készítmény volt. Az MTP-PE/MF kifejezés „MTP-PE Microfluidizer” készítményt jelöl, és 4% szkvalént, illetve 1,0 mg/ml MTP-PE-t tartalmaz, melyet a mikrofluidizálóban hoztunk létre. Az MTP-PE Kirkland-emulzió 4% szkvalént, illetve 0,5 mg/ml MTP-PE-t és 0,008% TWEEN 80-at tartalmaz, melyet a Kirkland-féle emulzifikálóban hoztunk létre. Az állatokat háromszor immunizáltunk, minden esetben 8,3 µg antigénnel. Az MTP-PE-t minden készítmény esetén 50 µg dózisonkénti mennyiségben alkalmaztuk. Az egyes immunizálás után meghatároztuk az immunizáló antigénnel szemben adott ELISA titereket, és a második immunizálás után meghatároztuk a HAI titert. Az ELISA titerek minden vizsgált adjuváns készítmény esetében megfelelően magasak voltak.

Egy másik kísérlet sorozatban hörcsögöket immunizáltunk általánosan beszerezhető Parke-Davis Fluogen vakcinával (HA/A/Sanghai/11/87, A/Taiwan/1/86, és B/Yamagata/16/88), illetve általánosan beszerezhető Duphar influenza vakcinával (HA A/Sechuan/2/87, A/Singapore/6/86, és B/Beijing/1/87), önmagukban, vagy MF69-100 adjuváns készítménnyel (az MF 69-100 5% szkvalént, 0,2% TWEEN 80-at, 0,8% Span 85-öt, és 400 µg/ml MTP-PE-t tartalmazott, Microfluidizer-ben emulzifikálva). A vakcinák azonos mennyiségét elegyítettük az MF69-100 adjuvánssal. Az állatok három hetes intervallumokban három immunizálást kaptak, 11,25 µg mennyiségű Parke-Davis vakcinával, vagy 7,5 µg mennyiségű Duphar vakcinával. Az MF69-100 adjuvánssal kezelt állatok 50 µg dóziskénti mennyiségben kaptak MTP-PE-t. A Duphar vakcinával+MF69-100-al kezelt állatok egy, és két immunizálás után szignifikánsan magasabb anti-HA titereket adtak, mint a csak Duphar vakcinával kezelték (egy immunizálás után 80-szor nagyobb főtiterek, mint abban az esetben, amikor a vakcinát önmagában alkalmaztuk, míg két immunizálás után 170-szer nagyobb főtiterek). Az MF69-100 adjuváns Parke-Davis vakcina esetén jól stimulálta az antitest-választ, egy, két és három immunizálás után 2951, 14 927, és 12 878 főtitereket adva. A titerek értéke 82, 29, és 10-szer magasabb, mint az önmagában alkalmazott vakcina esetében kapott értékek, egy, két és három immunizálás után. Az MF69-el való immunizálás után minden vakcina készítmény esetén csúcs antitest titereket kaptunk.

A további kísérletek során kecskéket immunizáltunk általánosan beszerezhető Parker-Davis Fluogen vakcinával, illetve Duphar alegység vakcinával (subunit vaccine), adjuváns nélkül, és számos MTP-PE-t tartalmazó adjuváns készítménnyel. Az állatokat az egyes vakcinák 0,5 ml mennyiségével, melyet 0,5 ml PBS-el, vagy 0,5 ml MTP-PE adjuvánssal elegyítettünk, intramuszkulárisan immunizáltuk. Három adjuváns készítményt hasonlítottunk össze: 200 µg MTP-PE, PBS-ben oldva, és 200 µg MTP-PE, két különböző mikrofluidizált emulzióban, melyekre mint Gaulin 1/4, és MF40/4 emulziókra hivatkozunk. A Gaulin 1-4

1,6% szkvalént, és 400 µg/ml MTP-PE-t tartalmaz, melyet Gaulin homogenizátorban mikrofluidizáltunk (AVP Gaulin, Everett, MA). Az MTP-PE/MF40/4 1,6% szkvalént, 400 µg/ml MTP-PE-t, 0,154% TWEEN 85-öt, és 1,66% Span 85-öt tartalmaz, melyet Microfluidizer alkalmazásával (model 110Y, Microfluids, Newton, MA) emulzifikáltunk. Az állatokat 0,5 ml vakcinát kaptak, amelyet 0,5 ml PBS-el, vagy a jelzett adjuváns készítmény 0,5 ml mennyiségével elegyítettünk, így 1,0 ml injekciós térfogatot hoztunk létre. A hörcsögökhöz hasonlóan az adjuváns emulzióval elegyített influenza vakcinákkal kezelt kecskék is sokkal magasabb antitest titereket mutattak, mint azok a kecskék, amelyeket csak vakcinával kezeltünk. Ezt az immunizálási tervek kezdetén kell különösen hangsúlyoznunk. Egy immunizálás után a Gaulin 1/4 emulzió 30-szor magasabb anti-HA titereket adott, mint a Parke-Davis vakcina önmagában. Az MTP-PE/MF-40 emulzió által adott anti-Ha titerek 130-szor voltak magasabbak az önmagában alkalmazott Parke-Davis vakcina által adott titereknél, és 60-szor az önmagában alkalmazott Duphar vakcina által adott titereknél. Az MTP-PE PBS-ben egy immunizálás után nem mutatott antitest stimuláló titereket. A második immunizálás után az emulzió hatására hasonló, fokozott antitest titereket kaptunk. Az anti-HA titereket adjuváns emulzióval adott korai stimulálása kifejezetten jelentős, mivel az influenza vakcinát a felnőttek általában egy dózisban kapják, míg a kisgyerekek két dózisban. Így a hörcsögökhöz hasonlóan az MTP-PE emulziók az influenza vakcinák ellen az immunválasz fokozott növekedését mutatják.

Egy másik kísérlet során Duphar vakcinát hasonlítottunk össze önmagában, és MF69 adjuváns készítmény alkalmazásával. A Parke-Davis vakcinát önmagában, és MF101, MF69-0, MF-68+MTP-PE, és Gaulin homogenizátorban (mikrofluidizáló) előállított Ribí Adjuváns rendszerrel. Az MF101 1,6% szkvalént, és 400 µg/ml MTP-PE-t tartalmazott, melyet Microfluidizer alkalmazásával emulzifikáltunk. Az MF69-0 5% szkvalént, 0,8% Span 85-öt, és 0,2% TWEEN 85-öt, de muramil-peptidet nem tartalmazott, melyet Microfluidizer alkalmazásával emulzifikáltunk. Az MF-68+MTP-MF-68-at tartalmazott, melyhez az emulzifikálás után ml-enként 400 µg/ml MTP-PE-t adtunk. A Ribí-MF 2% szkvalént, 0,4% TWEEN 20-at, 250 µg/ml monofoszfóril-lipid A-t, 250 µg/ml trehalóz-dimikolátot, és 250 µg/ml sejt fal szkeletont (Ribí Immunochem, Hamilton, Montana) tartalmazott, melyeket Gaulin adjuváns a vakcinával (antigén) azonos térfogatban, dózisonként 0,5 ml mennyiségben alkalmaztunk. Az MF69-0 a Duphar vakcina esetében szignifikánsan jelentős ELISA titert adott. Továbbá, amint azt az ELISA titerek, és a hemagglutinációs titerek mutatták, minden vizsgált adjuváns szignifikánsan fokozta a Parke-Davis vakcina immunogénitását.

A további kísérletek során MF69, és MF59 adjuvánsokat hasonlítottunk össze (különbség csak a TWEEN 80:Span 85 arányban volt, az MF59-0 5%

szkvalént, 0,5% TWEEN 80-at és 0,5% Span 85-öt tartalmazott, Parke–Davis influenza vakcinával, kecskén. Az állatokat a humán estekben alkalmazott vakcina mennyiségének (mind a három HA komponens 7,5 µg) másfélszeresével, melyet adjuváns készítményekkel elegyítettünk, egyszer immunizáltuk. Az MTP–PE-t a készítményekben 100 µg-os dózisban alkalmaztuk. A várakozásnak megfelelően a két készítmény hasonló titereket adott, az MF69 926 fő titer értéket, míg az MF59 812 fő titer értéket.

Malária

A vakcina tanulmányozását MF 59 adjuvánssal kezdtük (lásd fent). Általánosan beszerezhető antigéntként a betegség sporozoitá, merozoitá és eritrocitá állapotát alkalmaztuk: Falc. 2.3 circumsporozoitá antigént, HP 195 merozoitá antigént és SERA 1 eritrocitá állapotú antigént. A vakcina készítményeket a fenti eljárások alkalmazásával állítottuk elő, nevezetesen a fent említett adjuváns készítmény és az antigén alkotó azonos térfogatát elegyítettük.

HIV

A különböző gp120 antigének ellen termelt semlegesítő antitestek termelésének összehasonlítása céljából immunizálási kísérletet végeztünk. Az antigén készítményt a 490 858 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés ismerteti, bejegyezve 1990. március 9-én, amely megfelel az EP–A 519 001 számú iratnak. A denaturált, és nem glikozilezett élesztőben előállított antigén a gp120-al (env 2–3) volt analóg. Egy másik glikozilezett gp120 megtartotta természetes konfigurációját. Minden gp120 azonos eredetű volt, mégpedig a HIV–1 SF–2 izolátumból származtak. Az antitest termelést babuin majmokon vizsgáltuk. A kezdetben alkalmazott olaj-tartalmú adjuvánsban a részecskék mérete 1 µ-nál nagyobb volt, az így kapott titerek legalább 10-szer voltak kisebbek, mint az általános timó esetén kapott titerek. Ugyanakkor a későbbi szubmikron részecskékkal végzett vizsgálatok során a kapott antitest titerek legalább 10-szer voltak nagyobbak, mint az általános timó esetén kapott titerek. A szubmikron készítmény kezdetben 2% szkvalént és 500 µg/ml MTP–PE-t tartalmazott vízben, és az olajcseppek átlagos mérete 0,17 µ átmérőjű volt. Megállapítottuk, hogy az MF59 alkalmazásával kapott vakcina készítmény (lásd fent), vagy MF58 alkalmazásával kapott vakcina készítmény (MF59, exogén úton adott MTP–PE-vel) a babuin majmokon jóval erőteljesebben stimulálta az antitest termelést, mint a kezdetben alkalmazott szubmikron készítmény.

Herpes simplex vírus

A fenti gD2 kísérleteken kívül MF59, valamint különböző mennyiségű MTP–PE, és antigén alkalmazásával további kísérleteket végeztünk. A 0,003–0,250 mg mennyiségű gD2 MF59 adjuvánssal, és 0,050 mg MTP–PE-vel, és a 0,010–0,100 mg mennyiségű gD2 MF59 adjuvánssal, és 0,100 mg MTP–PE-vel kielégítő antigén titereket adott.

Cytomegalovirus

A vakcina készítmény 0,001–0,250 mg CMV anti-gén 0,5 ml fiziológiás sóoldatban, 0,050 mg MTP–PE-t tartalmazó 0,5 ml MF59 adjuvánssal állítható elő. Az MF69, az MF101, és a hasonló szubmikron részecskéket tartalmazó adjuvánsokat hasonló módon vizsgálhatunk.

Hepatitis C vírus

A vakcina készítmény 0,001–0,250 mg HIV anti-gén 0,5 ml fiziológiás sóoldatban, 0,050 mg MTP–PE-t tartalmazó 0,5 ml MTP–PE adjuvánssal állítható elő. Az MF69, az MF101, és a hasonló szubmikron részecskéket tartalmazó adjuvánsokat hasonló módon vizsgálhatunk.

Bár a megfelelő érhetség kedvéért a fenti találmányt példákön keresztül is illusztráltuk, a megfelelő szakmai gyakorlattal rendelkezők a találmány szerinti eljárásokban némi módosítást, változtatást tehetnek, anélkül, hogy ezzel a találmánytól, vagy az igénypon-toktól eltávolodnának.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

25

1. Adjuváns készítmény, mely

- (1) egy metabolizálható olajat és
- (2) egy vagy több emulgeálószer tartalmaz, ahol az említett olaj és az említett emulgeálószer olajcsep-pecskéket tartalmazó olaj-a-vízben emulzió formá-jában van jelen,

30

azzal jellemezve, hogy az olajcseppek számának leg-alább 80%-a 0,5 µm-nél kisebb átmérőjű és a készí-tmény polioxi-propilén-polioxi-etilén tömbkopolimer-től vagy tokoltól mentes.

35

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy olajként állati eredetű olajat tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemez-ve, hogy olajként telítetlen szénhidrogént tartalmaz.

40

4. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy olajként terpenoidot tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy olajként növényi eredetű olajat tartalmaz.

45

6. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy a készítmény 0,5–20 térfogat% olajat tar-talmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy emulgeálószerként nemionos detergenst tartalmaz.

50

8. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy emulgeálószerként poli(oxi-etilén)-szorbi-tán-mono-, di- vagy triésztert, vagy szorbitán-mono-, di- vagy triésztert tartalmaz.

55

9. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy emulgeálószerként poli(oxi-etilén)-szorbi-tán-mono-, di- vagy triésztert és egy szorbitán-mono-, di- vagy triésztert tartalmaz.

10. A 8. igénypont szerinti készítmény, azzal jelle-mezve, hogy a készítmény az emulgeálószer 0,02–2,5 tömeg% közötti mennyiségben tartalmazza.

60

11. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy egy immunstimuláló anyagot is tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy immunstimuláló anyagként timsót, vagy bakteriális sejttal komponenst tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény az immunstimuláló anyagot 0,0001–1,0 tömeg% közötti mennyiségben tartalmazza.

14. A 11. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy immunstimuláló anyagként muramil-peptidet tartalmaz.

15. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan emulgeálószer tartalmaz, mely egyben immunstimuláló anyag.

16. A 15. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény az immunstimuláló anyagot 0,01–0,5 tömeg% közötti mennyiségben tartalmazza.

17. A 15. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény immunstimuláló anyagként egy lipofil muramil-peptidet tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy muramil-peptidként muramil-dipeptidet vagy muramil-tripeptidet tartalmaz.

19. A 18. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a peptid egy foszfolipidet is tartalmaz.

20. A 19. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy foszfolipidként foszfogliceridet tartalmaz.

21. A 14. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy peptidként (IV) általános képletű vegyületet tartalmaz, ahol

R hidrogénatom vagy $-\text{COCH}_3$ csoport,

R^1 , R^2 és R^3 egymástól függetlenül hidrogénatom vagy lipidrész,

R^4 hidrogénatom vagy alkilcsoport,

X és Z egymástól függetlenül amino-acil-gyök, mely alanil-, valil-, leucin-, izoleucil-, alfa-amino-butiril-, treonil-, metionil-, ciszteinil-, glutamil-, izoglutamil-, glutaminil-, aszpartil-, fenil-alanil-, tirozil-, triptofanil-, lizil-, ornitínil-, arginil-, hisztidil-, aszparginil-, prolil-, hidroxil-prolil-, szeril-, vagy glicil-csoport lehet,

n értéke 0 vagy 1,

Y $-\text{NHCHR}^5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ általános képletű csoport, ahol

R^5 adott esetben észterezett vagy amidált karboxil-csoport, és

L jelentése $\text{OH}-$ vagy $-\text{NR}^6\text{R}^7$ általános képletű csoport, ahol

R^6 és R^7 egymástól függetlenül hidrogénatom, kisszénatomszámú alkilcsoport vagy lipid-rész.

22. A 21. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben

R^4 metilcsoport,

X alanilcsoport, és

10 Y izoglutamilcsoport.

23. A 21. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben

n értéke 1,

15 Z alanil-csoport,

R acetilcsoport, és

R^1 , R^2 és R^3 mindegyike hidrogénatom.

24. A 23. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben L foszfolipid-rész.

25. A 24. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben az L foszfolipid-rész diacil-foszfoglicerid.

26. A 21. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy peptidként N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamil-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxil-foszforil-oxi)-etil-amidot tartalmaz.

27. A 21. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben

R^1 és R^2 közül legalább az egyik 1–22 szénatomot tartalmazó acilcsoport.

28. A 21. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy olyan (IV) általános képletű peptidet tartalmaz, melyben

R^1 , R^2 és R^3 közül legalább az egyik 14–22 szénatomot tartalmazó acilcsoport.

29. Eljárás vakcina készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(1) egy antigén anyagot immunstimuláló mennyiségben, és

(2) az 1. igénypont szerinti adjuváns immunstimuláló mennyiségét legalább egy, a vakcinakészítésben szokásos vívőanyaggal kombináljuk.

30. A 29. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy antigén anyagként malária, HIV, herpes simplex vírus, citomegalovírus vagy hepatitis C vírus antigén alkalmazunk.

