



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

220 136 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 04136
(22) A bejelentés napja: 1991. 06. 25.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/546,585 1990. 06. 29. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 91/04532
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/00081

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 39/39

A 61 K 9/107

A 61 K 9/127

(40) A közzététel napja: 1995. 01. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 11. 28.

(72) Feltalálók:

Barchfeld, Gail L., Alameda, Kalifornia (US)
van Nest, Gary A., El Sobrante, Kalifornia (US)
Ott, Gary, Tahoma, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Chiron Corp., Emeryville, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

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

(54) **Eljárás liposzómákat tartalmazó vakcinakészítmény előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás oltóanyag-kompozíció előállítására, melynek során

- (1) immunstimuláló mennyiségű antigénanyagot, amely anionos és/vagy semleges lipidekből származó liposzómákban vagy azok felszínén helyezkedik el; és
- (2) egy, kombinálás után a liposzómákat folyamatos fázisban körülvevő, metabolizálható olajat tartalmazó

„olaj a vízben” emulziót kombinálna, ahol az emulziót az antigénanyag és liposzómák potencirozó mennyiségében alkalmazzák,

ahol az antigénanyagot 1–500 mg/ml koncentrációban, és a liposzómákat és az emulziót 1:10 és 10:1 közötti térfogatarányban alkalmazzák.

A találmány tárgya eljárás liposzómákat tartalmazó vakcinakészítmény előállítására, különös tekintettel olyan technológiákra és kompozíciókra, amelyek az oltóanyagok hatékonyságát növelik és az antitestek semlegesítését idézik elő.

A liposzómák szferikus vezikulumok, amelyek foszfolipideket tartalmazó vizes közegből és egy azt körülvevő lipid-kettősrétegből állnak. Kémiai vagy biokémiai anyagokat juttatva a liposzómákat kialakító szuszpenzióba olyan liposzómák nyerhetők, amelyek belső közegükben különböző, biológiailag aktív anyagokat tartalmaznak. A liposzómák átmérője általában 25 nm és 1 mikrométer között mozog attól függően, hogy hogyan állították elő őket, valamint, hogy lipidrétegük milyen méretű, így alkalmasak arra, hogy átvivőközegei legyenek különböző, vízben oldható anyagoknak. Mivel a töltéssel rendelkező molekulák általában nem, a nagy méretű molekulák pedig csak lassan hatolnak keresztül a lipid-kettősrétegen, a liposzómafalak megóvják a hozzájuk kapcsolt organizmusokat azon túl erős hatásoktól, amelyeket a bennük lévő anyagok okoznának.

A liposzómákat korábban arra használták, hogy a hozzájuk kapcsolt antitestekkel módosítsák állatokban az immunválaszt. Az immunválasz módosítható egyrészt abból a célból, hogy a gazdaszervezetben immunitást hozzunk létre a patogénnel szemben, másrészt, hogy antitesteket termeljünk a gazdaszervezeten kívül. Így például nagy érdeklődés mutatkozik arra, hogy fejlesszék és sokrétűvé tegyék azt a lehetőséget, amely szerint az antitestek előkészíthetők a determináns helyek széles skálájához való kapcsolódásra, így az immunvizsgálatokban és immunvezérelt terápiákban felhasználhatók. Az antitestek azon különleges képessége, amely szerint képesek speciális determináns helyekhez vagy kémiai szerkezetekhez kapcsolódni, igen alkalmasá teszi őket arra, hogy a gyógyszereket, radioizotópokat vagy jelzőanyagokat a gazdaszervezet egy-egy meghatározott helyére juttassák. Az antitesteknek megvan ezenfelül az a képességük is, hogy meg tudják különböztetni egymástól a hasonló speciális szerkezeteket, ezen tulajdonságok pedig széles körben alkalmazhatóvá tették őket a diagnosztikában.

Tekintet nélkül arra, hogy valaki monoklonális vagy poliklonális antitesteket kíván előállítani a gazdaszervezeten kívüli használatra, vagy immunválasz kiváltására egy patogénnel szemben, az első lépés a gazdaszervezet immunizálása. Mint az később nyilvánvalóvá fog válni, az immunizációkor használt kompozíciót „vakcinának” fogjuk hívni, tekintet nélkül arra, hogy azt a gazdaszervezet védelme érdekében vagy monoklonális antitestek előállítása érdekében alkalmaztuk. Általában ismételt immunogéninjekciókkal hiperimmunizáljuk a gazdaszervezetet előzetesen megállapított menetrend szerint. Ezenfelül adjuvánsokat is adunk, hogy erősítsük az immunválaszt. A különböző adjuvánsok alumínium- és kalciumsók, emulgeáló adjuvánsok, valamint baktériumok, például mikobaktériumok és korinebaktériumok lehetnek.

Ha monoklonális antitesteket akarunk előállítani, kívánatos, hogy az immunválaszt speciális ektopikus he-

lyeken fokozzuk. Mivel a monoklonális antitestek előállítása az alacsony populációjú események észlelését igényli, minden technológia, amely növeli a B-limfociták számát, fontos lehet a monoklonális antitestek előállításánál. Itt utalunk a 4,565,696-os* számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásra, amely leírja immunogének előállítását antigének liposzómákhoz való kapcsolásával.

Ahogy azt később leírjuk, jelen találmány a liposzómákat tartalmazó oltóanyagokkal kapcsolatos. A liposzómák és sok egyéb összetevő – amint azt majd részleteiben is tárgyaljuk – adjuvánsként fejtik ki hatásukat az olyan antigének immunogenicitásának növelése érdekében, amelyek a patogén ágensekből származnak, vagy azokkal kapcsolatban állnak.

Jelenleg az Egyesült Államokban az adjuvánsok közül kizárólag az alumíniumsókat engedélyezik humán célokra. Ezen adjuvánsok hatásosak voltak olyan oltóanyagokban, mint a hepatitis B, diftéria, gyermekbénulás, veszettség és influenza oltóanyagaiban, de más esetekben nem használhatók, különösen akkor nem, ha a sejtközvetítéssel immunizációra lenne szükség a védelemhez. Többen beszámoltak arról, hogy az alumíniumsók nem növelték a hatékonyságát a szamárköhögés-, illetve a tifusz-oltóanyagoknak, és csak kevésbé tették hatásosabbá az adenovírus vakcinákat. Az alumíniumsóknál jelentkező problémák egyrészt a granulómák injekciós helyen való bejutásával kapcsolatosak, másrészt az ilyen készítmények nagyszámú változatával.

A Freund-féle komplett adjuváns (CFA) hatásos immunstimuláló anyag, amelyet sikeresen alkalmaztak a kísérletek során sokféle antigénnel együtt. A CFA ásványi olajból – amely olyan emulgeálóanyag, mint az Arlacel A – és elölt mikobaktériumokból (például a *Mycobacterium tuberculosis*) áll. A vizes antigénoldatokat ezen komponensekkel elegyítve „olaj a vízben” emulziót kapunk. A CFA ugyanakkor súlyos mellékhatásokkal jár, úgy mint fájdalom, tályogképződés és láz, amelyek megakadályozzák humán, illetve állatorvosi célra való felhasználásukat. A mellékhatások elsősorban a mikobaktérium-komponens hatására alakulnak ki.

A Freund-féle inkomplett adjuváns (IFA) hasonló a CFA-hoz, de baktériumkomponens nélkül. Bár az USA-ban használata nem engedélyezett, más országokban sokféle oltóanyagban alkalmazzák. Az IFA hatékonynak bizonyult influenza és gyermekbénulás esetén a humán betegségek közül, és sok állati oltóanyagnál, mint a veszettség, a szopornyica, valamint a száj- és körömfájás. A kísérletek kimutatták, hogy mind az olaj, mind az emulgeálóanyag daganatot okozhat egerekben, amely arra mutatott, hogy humán célokra más segédanyag használata lenne kívánatos.

A muramil-dipeptid (MDP) tartalmazza a legkevesebbet a mikobaktérium sejtfalösszetevőiből, amely a CFA-hoz képest növelte a segédanyag hatékonyságát [lásd Ellouz et al. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59: 1317]. Az MDP sok szintetikus változatát is kialakították, amelyek az adjuvánsok hatásainak és mellékhatásainak széles skáláját mutatták [lásd Chedid et al. (1978) *Prog. Allergy*, 25: 63]. A három segédanyag, amely kü-

lönösen hasznos oltóanyag-összetevő, az MDP treonin származéka [lásd Byars et al. (1987) *Vaccine*, 5:223], az MDP n-butil származéka [lásd Chedid et al. (1982) *Infect. and Immun.*, 35:417], és a muramil-tripeptid lipofil származéka [lásd Gisler et al. (1981) *Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds*, Y. Yamamura and S. Kotani, eds., Excerpta Medica, Amsterdam, p. 167]. Ezek az összetevők hatékonyan stimulálják a humorális és sejtközeges immunitást, és toxicitásuk alacsony szintű.

Az MDP egy ígéretes lipofil származéka az N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifoszforil-oxi)] etilamid (MTP-PE). Ez a muramil-peptid foszfolipides farkat tartalmaz, amely lehetővé teszi a molekula hidrofób részének lipides közeggel való társítását, míg a muramil-peptid-rész vizes közeggel társul. Így az MTP-PE magában emulgeáló ágensként működik, így kialakítja a stabil „olaj a vízben” emulziót.

Egérén végzett kísérleteink szerint az MTP-PE hatékonyan bizonyult mint segédanyag az anti-HSV gD antitest-összetevők stimulálásában a Herpes simplex vírus gD antigén ellen, és ez a hatékonyság nagyban növekedett, amikor az MTP-PE és a gD olajos (IFA), és nem vizes oldatban került felhasználásra. Mivel az IFA nem használható humán célokra, más olajos rendszereket vizsgáltak az MTP-PE és az antigének részére. 4% szkvalén, 0,0008 Tween-80 és HSV gD emulziója rendkívül jó eredményeket mutatott tengerimalacoknál. Ezt az oldatot MTP-PE-LO („low oil”, vagyis alacsony olajtartalom) –, amelyet hipodermikus tűn keresztül emulgeáltak, igen instabilnak mutatkozott. Ugyanakkor az MTP-PE-LO magas antitestarányt mutatott tengerimalacban, valamint jó védelmet nyújtott HSV ellen az immunizált tengerimalacban [lásd Sanchez-Pescador et al. (1988) *Lasky et al., eds., Alan R. Liss, Inc., p. 445–469*]. Az MTP-PE-LO oldat hatásos volt az immunválasz kiváltásában is az élesztőben előállított HIV fehérjeburokra tengerimalacban. Az MTP-PE oldat magas szinten stimulálta mind az ELISA antitest-összetevőket, mind a vírussemlegesítő antitest-összetevőket. Akkor viszont, amikor ezt az oldatot nagy testű állatokban (kecske, pávián) tesztelték, a kompozíció nem volt ilyen hatásos. Emiatt egyértelmű igény mutatkozott az újabb adjuvánskompozíciók molekuláris antigénnel együtt való tesztelésére emberekben és nagy testű állatokban.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az olyan adjuvánskompozíció, amely metabolizálható olajat és emulgeáló ágenszt tartalmaz, és ezen összetevők „olaj a vízben” emulzió formájában vannak jelen, valamint az olajcseppek kevesebb mint 1 mikron átmérőjűek, hatékonyak az oltóanyag hatásának növelésében. A vizsgálatok kimutatták ezen adjuvánskompozíciók jobb tulajdonságait azokkal a kompozíciókkal szemben, amelyek szintén olajat és emulgeálóanyagot tartalmaztak, de az olajcseppek mérete nagyobb volt. Ezen adjuvánskompozíciók sok különböző szabadalmi bejelentés tárgyai (U.S. 357,035, bejelentve 1989. 05. 25-én).

Ennek ellenére az adjuvánskompozíciók további fejlesztése továbbra is szükséges. Például szükség van

olyan immunogén kompozíciókra, amelyek növelik mind a sejtimmunválaszt, mind a humorális immunválaszt.

Fentiek értelmében a találmány célja az oltóanyagok, különösen az alegység-oltóanyagok immunogenicitásának növelése, illetve olyan vakcinák előállítás, amelyekben mind a sejt-, mind a humorális immunválaszok aktiválódnak.

Fentieket teljessé teszi egy-két összetevőt – egy antigén/liposzóma részt és egy „olaj a vízben” emulziót – tartalmazó oltóanyag-komponens bemutatása. Az egyes kiviteli módokban használt liposzómák fuzogén liposzómákként ismertek, ami arra utal, hogy ezek megfelelő körülmények között fuzionálnak a biológiai membránokkal, amint azt majd utóbb tárgyaljuk. Fuzogén liposzómákra ugyanakkor ilyen esetben nincs szükség. Különösen hasznosak azok a kompozíciók, amelyeket egyrészt muramil-peptid és a metabolizálható olaj felhasználásával, „olaj a vízben” emulzió formájában – ahol az olajcseppek szubmikron méretűek –, másrészt ettől elkülönítetten előállított liposzóma/antigén komponens felhasználásával készültek. A két komponens együtt alkotja a végleges oltóanyag-kompozíciót.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a bejelentés ábráit.

Az 1. ábra grafikon, amely az átlagos antitesttitert mutatja az immunizáció után, különböző időpontokban, gD2 antigén felhasználásával, kecskében, különböző adjuvánsok mellett.

A 2. ábra grafikon, amely az átlagos antitesttitert mutatja az immunizáció után, különböző időpontokban, gB2 antigén felhasználásával, kecskében, különböző env2-3 adjuvánsok mellett.

A 3. ábra grafikon, amely az átlagos antitesttitert mutatja az immunizáció után, különböző időpontokban, env203/sf2 antigén felhasználásával, rhesus majmokban, különböző adjuvánsok mellett.

A 4. ábra grafikon, amely az átlagos antitesttitert mutatja az immunizáció után, különböző időpontokban, gD2 antigén felhasználásával, nyúlban, különböző adjuvánsok mellett.

Az 5. ábra grafikon, amely a kumulatív parazitemiát mutatja majmok különböző csoportjainál, amelyeket malária eredetű antigénnel és különböző adjuvánsokkal immunizáltak, majd heterológ maláriával fertőztek.

A 6. ábra két grafikonból áll, amelyek az ELISA (felső vonal) és a túlélési (alsó vonal) titert mutatják egereknél, amelyeket influenza-oltóanyaggal és különböző adjuvánsokkal immunizáltak, majd influenzával fertőztek.

A találmány szerinti oltóanyag-kompozícióknak egyedi komponensei ismertek, de ilyen összetételben még nem alkalmazták őket. Különösen váratlan és meglepő volt az, hogy az ilyen oltóanyag kompozícióiban az immunogének hatékonysága nagyobb volt annál, mint amit akkor értünk el, amikor korábban a komponenseket külön-külön alkalmaztuk.

Mivel az oltóanyag-kompozíciók egyedi komponensei itt általánosságban is és az előnyben részesített kivi-

teli módokra részletesen is le vannak írva, és a komponensek, valamint a velük kapcsolatban használt szakkifejezések – liposzóma, muramil-peptid, metabolizálható olaj és emulgeáló ágens – jól ismertek a tudományos életben járatosak számára, a komponensek leírása és meghatározása szintén nem jelenthet gondot.

A találmány szerint használt liposzómák sokféle lipidanyagból nyerhetők, például foszfatidil-észterekből és -éterekből, úgymint foszfatidil-etanol-amin, foszfatidil-szerin és foszfatidil-kolin; gliceridekből, úgymint dioleoil-gliceroszukcinát; cerebrozsidákból; gangliozidákból; szfingomielinből; szteroidokból, úgymint koleszterin; és más lipidekből. A liposzómák kinyerésének további módzataival kapcsolatban lásd a 4,235,871; 4,762,720; 4,737,323; 4,789,633; 4,861,597; és 4,873,089 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat.

A liposzómák kinyerése nem tárgya a jelen találmánynak, mivel a liposzómák már jól ismertek a szakirodalomban, amint azt a fent ismertetett irodalmi források is mutatják. A liposzómákat számos különböző technológiával készítik, úgymint etanolinjekcióval, [Batzri et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 298 1015 (1973)]; éterinfúzióval, [Deamer et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 542:137 (1978)], detergenseltávolítással [Razin, *Biochem. Biophys. Acta*, 265:241 (1972)], oldószerbepárlással, [Matsumoto et al., *J. Colloid Interface Sci*, 62 149 (1977)], oldószer bepárlásával „klorofom a vízben” emulziókból (REV), [Szoka Jr. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194 (1978)]; MLV-k (multilamelláris vezikulumok) vagy LUV-ok (nagy unilamelláris vezikulumok) nukleopórusos polikarbonát-membránon keresztüli extrudálásával [Olson et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 557 9 (1979)]; valamint foszfolipid-vegyületek fagyasztásával és felolvasztásával, (Pick, *Archives of Biochem. and Biophysics*, 212:186 (1981)).

A hagyományoknak megfelelően a liposzómákat méret szerint kategorizáljuk és megkülönböztetésükre 3 betűs neveket használunk. A multilamelláris vezikulumokat általában „MLV”-nek nevezzük. A kis unilamelláris vezikulumokat „SUV”-nak nevezzük, a nagy unilamelláris vezikulumok jelölése „LUV”. E megnevezéseket néha követi a liposzóma kémiai leírása. A nomenklatura és az ismert liposzómák leírása megtalálható az alábbi irodalmi helyeken: Papahadjopoulos Ann. *N. Z. Acad. Sci.*, 308:1 (1978) és Ann. Repts. Med. Chem., 14:250 (1979).

A liposzómák egy osztálya, amelyet hasznosnak ítétek meg a biológiailag aktív anyagok sejtbe juttatására (olyan anyagokat is ide értve, mint az immunogének), tartalmazza azokat az anyagokat, amelyeket fuzogén liposzómáknak nevezünk. Ezek pH-szenzitív liposzómák, amelyek aggregálódnak, destabilizálódnak, majd biológiai membránokkal fuzionálnak, és ezek hatására fiziológiai jellemzőikben végbemennek a megfelelő változások. Az ilyen liposzómák legfontosabb jellemzője, hogy pH, mégpedig elsősorban savérzékenyek, így sok különböző fiziológiai állapotra reagálni tudnak. Például az endocitózistról kimutatták, hogy elsődleges mód-

ja a negatív töltésű liposzómák emlősejtbe juttatásának. Az endocitózis eredménye, hogy a liposzómák egy endoszóma vagy lizoszóma savas közegébe kerülnek. Mivel ezen organizmusok környezete viszonylag savas pH-jú a véráramban lévő fiziológiás körülményekhez képest, a pH változása felhasználható arra, hogy a liposzómák tartalma a sejt közegbe ürüljön. Az antigén közvetlen citoplazmába juttatása az antigén I. osztályú prezentációját idézheti elő, ezáltal stimulálja a sejt kivetített immunválaszt. A fuzogén liposzómákkal kapcsolatban lásd a 4,789,633 és 4,873,089 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat.

A fuzogén liposzómák általában olyan lipidmolekulák felhasználásával készülnek, amelyek elektromosan semlegesek a gazdaszervezet vérének pH-ja mellett, töltést kapnak viszont az endoszómákban és a lizoszómákban uralkodó pH (6,5 alatt) mellett. Az alkalmas lipidek között van a foszfatidil-etanol-amin (PE) és a palmitoil-homociszten. Ezek a fuzogén liposzómák lipidmolekulák egy részében képződnek, amelyben a fejcsoport effektív keresztmetszeti területe kisebb, mint a hidrofób rész keresztmetszeti területe, a kettős rétegre (vagyis PE-re) merőlegesen mérve. A fuzogén liposzómák tartalmaznak olyan lipidmolekulákat is, amelyek képesek hidrogénkötést létesíteni a fent leírt lipidmolekulák (például olajsav, dioleoil-glicerinszukcinát) fejcsoportjával. Amikor a hidrogénkötés létrejön, a kettős réteg effektív területe összesűrűsödik, ennek eredménye pedig egy fúzióra alkalmas metastabilis kettős réteg. Ez a konfiguráció könnyen átrendeződik a hexagonális II fázisba, és amikor ebben az állapotban egy másik fúzióra képes kettős réteg közelébe kerül, a két membrán egyesül. A fúzió megkezdődése szabályozható a pH-val, amely meghatározza a fejcsoportok közti hidrogénkötések mennyiségét (például pH-érzékeny liposzómák). A fúzió a hőmérséklettel is szabályozható; a fúzióra alkalmas kettős rétegeknek lamelláris alfa-fázisban, vagy folyékony kristályos fázisban kell lenniük. T_m hőmérséklet alatt gélállapotba, vagy lamelláris alfa-fázisba kerülnek és alkalmatlanná válnak a fúzióra. A hőmérséklet T_m fölé emelésével létrejön a fúzió.

Hangsúlyoznunk kell ugyanakkor, hogy bár a fuzogén liposzómák jelen találmányban egyféle formában szerepelnek, korábban sok más formában is ismertek voltak. A fuzogén liposzómákkal foglalkozó publikációk közül ajánlható művek: Connor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1980) 77:442–446; 649:633–641; Schenkman et al., *Biochem. Biophys. Acta*, (1981) 28:165–180; Blumenthal et al., *J. Biol. Chem.* (1983) 258:349–3415; Yatvin et al., *Science* (1980) 210:1253–1255; Duzgunes et al., *Biochemistry* (1985) 24:3091–3098; Straubinger, *Receptor-Mediated Targeting of Drugs* (Gregoriadis, Eds.) pp. 297–315, Plenum Press New York; Straubinger et al., *FEBS Lett.* (1985) 179:148–154. A liposzómákkal, tulajdonságaikkal, preparálásukkal általánosságban foglalkozó irodalom a *Liposome Technology* (Gregoriadis, ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida (1983). Egy új keletű általános összefoglaló a liposzómák immunológiai adjuváns-

ként való felhasználásáról a Gregoriadis, Immunology Today (1990) 11: 89–97 című irodalmi hely, amely tartalmazza azon publikációk listáját is, amelyek a liposzómakompozíciókkal, liposzóma-előállításával, valamint a liposzómák antigénekként és immunogén ágensekként együtt való használatával foglalkoznak.

Jelen találmány nagyszámú liposzómakompozíció összeállításával született meg, fuzogén és nem fuzogén liposzómák felhasználásával egyaránt. A most következő és a későbbi példákban a következő rövidítéseket alkalmazzuk: PE, foszfátidil-etanol-amin; GS, dioleoil-glicerín-szukcinát; CHOL, koleszterin; OA, olajsav; PC, foszfátidil-kolin; és PS, foszfátidil-szerin. Az egyik kedvelt fuzogén liposzómakompozíció, amely foszfátidil-etanol-aminból és dioleoil-glicerinnél áll, 8:2 molekuláris arányban PE/GS (8:2) rövidítéssel szintén szerepel az anyagban. A PE/GS/CHOL (8:2:1) is kedvelt liposzómakompozíció. A nem fuzogén liposzómák PC/PS (7:3) és PC/PS/CHOL (7:3:1) kompozícióban vannak jelen.

A találmány oltóanyag-formulációja, mint már korábban említettük, két alapvető alkotóelemet tartalmaz: az antigén/liposzóma komponenst és az olajemulziót. Ennek megfelelően az itt leírt liposzómák egy elsődleges kompozícióban készülnek, amely tartalmazza az antigént, amelyet az immunválasz kiváltására használnak. Ezt elegyítik a második (emulzió) komponenssel, így alakul ki a találmány szerinti kompozíció.

Az antigén szó, ahogy itt használjuk, vonatkozik minden olyan anyagra (ide értve a fehérjét vagy fehérje-poliszacharidot, a fehérje-lipopoliszacharidot, poliszacharidot, lipopoliszacharidot, vírusalegységet vagy egész vírust is), amely amikor idegen testként egy állat véráramába, így pedig a szövetekbe kerül, ott specifikus antitestek képződését stimulálja és in vivo vagy in vitro körülmények között reagál az ilyen antitesttel. Ezenfelül az antigén stimulálja az antigénreceptorokkal rendelkező T-limfociták burjánzását, és reagál ezekkel a limfocitákkal, hogy ezáltal idézzon elő a sejtközvetített immunitás létrehozására irányuló sokféle reakciót.

A most következő definíció középpontjában a haptén áll. A haptén az antigénmolekula vagy antigén-komplexum azon része, amely meghatározza annak immunológiai sajátosságait. A haptén általában peptid vagy poliszacharid a természetben előforduló antigéneknél. Mesterséges antigéneknél lehet alacsony molekulatömegű anyag, mint például arzánil-savszármazék. Egy haptén in vivo vagy in vitro körülmények között speciálisan antitesttel vagy T-limfocitával reagál, amelyet a haptén antigén formája indukált (például immunogén anyaghoz kapcsolt antigén). Alternatív reagensek lehetnek antigéndeterminánsok, strukturális antigéncsoportok és haptencsoportok.

A találmány szerinti oltóanyag készítéséhez az antigénből hatékony mennyiségre van szükség. Ez annyit jelent, hogy tartalmaznia kell bizonyos mennyiségű antigént, amely az adjuváns segítségével az alanyt speciális és kellő nagyságú immunválaszra készíti, így nyújtva védelmet az alanyra a vírusokkal és más patogénekként szemben.

Az antigének előállíthatók a szakterületen már ismert módon, vagy pedig megvásárolhatók a kereskedelmi forrásokon keresztül. Az e találmány körébe eső antigének teljes inaktivált vírusrészeket, izolált vírusfehérjéket és fehérjealegységeket (például a génszészeti úton előállítottakat) tartalmaznak. A találmány által tárgyalt oltóanyagok az állatok számos patogénnel szembeni immunizálására, valamint a diagnosztikában antitesttermelés indukálására használhatók.

A találmányban tárgyalt liposzómatartalmú kompozíciókban lévő antigén lehet olyan rekombináns fehérje, amelyet a génszészeti úton manipulált kínaihörsőg-petefészék (CHO) választott ki, és a herpes simplex vírustól származik. Ilyen rekombináns fehérje a HSV gD2. E fehérje normál rögzítő területe csonkított és egy glikozilált fehérjét választ ki a szövetkultúrába. A HSV gD2-t, mivel liposzómákban használtuk fel, a CHO-ból 90%-nál nagyobb tisztasággal nyertük ki. A HSV gB2 egy teljes mértékben glikozilált kiválasztott fehérje, amelyet a CHO termel a HSV gD2-höz hasonló módon, a fentieknek megfelelően. A HIV gp120 egy teljes mértékben glikozilált humán immunhiány vírusfehérje, amely a HSV gD2-höz hasonlóan termelődik, a fentieknek megfelelően. A HIV RT6 a HIV reverz transzkriptáz rekombinánsa a génszészeti úton manipulált *Saccharomyces cerevisiae*-ben termelődik. E fehérjében nincs meg a természetes reverz transzkriptáz C terminálisa. Mindkét HIV fehérje, csakúgy, mint sok más különböző, közönséges influenza-oltóanyag, ezen találmány kidolgozása során a liposzómákba beépítve került felhasználásra.

Az 1. szérum, a *Plasmodium falciparum* merozoit fehérjéjének rekombináns alakja, genetikailag manipulált *Saccharomyces cerevisiae*-ben termelődik. Ez a fehérje csak a természetes merozoit-antigének N-terminális 262 aminosavját tartalmazza. A HA Taiwan, az A/Taiwan/1/86 (H1N1) influenzatörzs hemagglutininje tyúktörzsben termelődik Parke-Davis szerint közönséges influenza-oltóanyag előállításához. Egy szintetikus 11 aminosavas peptid, a H-Ile-Tyr-Ser-Thr-Val-Ala-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-OH, amely a természetes HSV gB2-ben kimutatott T-sejt epitóphoz hasonlít (Hanke, T. et al. (1991): J. of Virology 65: 1177–1186), szintén felhasználásra került.

Számos egyéb antigént különösen indokolt a jelen kompozícióban felhasználni. Ezek közé tartozik az A HIV-env 2–3, amely génmanipulált HIV fehérje; különböző maláriavírusok, mint például a falc. 2.3.; a mero; az N szérum; és a vivax 1, 2 és 3. A citomegalovírus (CMV) fehérjéket, például a gB és gH nevéket, szintén használják különböző hepatitis C vírus (HCV) fehérjékkel együtt. Ezen antigének részletesebb leírása csakúgy, mint számos, ezen és más antigénnel foglalkozó publikáció felsorolása megtalálható a 357,035 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben (1989. május 25.). Lásd még ezzel kapcsolatban a PCT/US90/02954 számú bejelentést (1990. május 24.), amelynek címe „Adjuvant Formulation Comprising a Submicron Oil Droplet Emulsion”.

Jelen találmányban általában minden természetes, rekombináns fehérje vagy alegységfehérje felhasználha-

tó, amely alkalmas oltóanyag-termelésre, valamint azon peptidek is alkalmazhatók, amelyek B-sejt és T-sejt epitópokat is tartalmaznak. Nem fehérjeantigének (például szénhidrátok, glikolipidek) szintén használhatók.

Egy adagolási előírás sem határozható meg, amely minden egyes, a találmányban alkalmazott antigénre megadná a helyes, egyedi adagolási szintet. Az antigén hatékony mennyisége függ annak aktivitásától és tisztaságától, amint ez a szakterületen természetes. Példaként később értékeket is adunk abban a részben, amely a kompozíció különböző összetevőinek relatív mennyiségeit írja le.

A találmány emulzió-összetevője egy muramil-peptidből és egy metabolizálható olajból áll, „olaj a vízben” emulzióban. Az olajcseppek bármilyen megfelelő méretűek lehetnek, nem kell feltétlenül szubmikronosnak lenniük az oltóanyag hatékonyságának növelése érdekében, bár a szubmikronméretű olajcseppek alkalmazása előnyösebb, amint azt később leírjuk. A muramil-peptid immunstimulánsként működik az adjuvánskompozícióban, valamint emulgeálóként is szerepel, így külön emulgeálószer nem szükséges. Ugyanakkor előnyös, ha jelen találmány emulziókomponense tartalmaz egy vagy több emulgeáló ágenszt is.

Minden immunválasztstimuláló muramil-peptid (glikopeptidként is ismert) használható a jelen kompozícióban. Számos, különösen alkalmas muramil-peptidet a későbbiek során bemutatunk.

Az összekapcsolt emulgeáló ágens/immunostimuláló ágensek a lipofil muramil-peptidek, amelyeket a már idézett két Sanchez-Pescador et al. publikáció ír le. Ezek az anyagok tartalmazzák a bázis N-acetil-muramil-peptidet (hidrofil gyök), amely úgy működik, mint immunostimuláló csoport, de tartalmaznak egy lipofil gyököt is, amely a kialakuló vegyület felületi aktivitását okozza. Az ilyen vegyületek, csakúgy, mint az amfipatikus immunostimuláló anyagok más típusai is, mind immunostimuláló ágensként, mind emulgeáló ágensként működnek, és jelen találmányban leginkább ezeket alkalmaztuk. Ezenfelül jelen találmány alkalmazható amfipatikus immunstimuláló anyag és egy másik, nem amfipatikus immunstimuláló anyag kombinációjának használatával is. Erre példa a lipofil muramil-peptid és egy alapvetően nem szubsztituált (tehát hidrofil) muramil-dipeptid kombinációja.

A találmány előnyösen alkalmazott immunválasztstimuláló muramil-peptidjei a vegyületek egy olyan csoportjába tartoznak, amelyek az N-acetil-muramil-L-alanin-D-izoglutaminnal állnak rokonságban és ebből származnak. E vegyület leírása a következő műben található: Ellouz et al (1974) Biochem. and Biophys. Res. Com., 59: 1317. Ez a legkisebb hatékony egység, amelynek még van immunológiai adjuváns aktivitása a M. tuberculosisban, amely a Freund-féle komplett adjuváns mikobaktériumos alkotórésze. Számos dipeptiddel és polipeptiddel szubsztituált muraminsavszármazékot fejlesztettek ki, amelyeknek immunstimuláló hatása van.

Bár ezek a muramil-peptidek a vegyületek egy változatos csoportját alkotják, általános képletük az I. képlet szerint leírható, ahol a pirángyűrű hidroxil-oxigén-

jeit hidrogénatom, alkilgyök, acilgyök vagy ezekhez hasonló helyettesíti, vagy esetleg – különösen a 6. helyzetű oxigén – felcserélhetők nitrogénalapú szubsztituenekkel is; a 2. aminocsoport acilcsoport vagy valamely más amid; a laktill oldallánc módosult, például etil vagy egy másik kétvegyértékű alkilgyök lesz belőle; a peptid lehet dipeptid vagy polipeptid, amelyek tovább származtathatók. A piranozil-összetevők furanozilanalógjainak szintén van immunpotenciáló szerepe és e találmányban igen hasznosak.

Az e találmányban használt muramil-peptidek között vannak azok a diszacharidok és tetraszacharidok, amelyek mezo-diamino-pimelinsavhoz vannak kapcsolva, ahogyan azt a 4,235,771 és 4,186,194 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások leírják.

Más immunválasztstimuláló muramil-peptidek, amelyek használhatók e találmányban, a 4,094,971; 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 leírásokban találhatók. A muramil-peptidek ezen szabadalmi leírásban található ismertetését referenciaként építjük be a jelen szabadalomba, amelybe ezek teljes mértékben beépülnek. A J5 4079–2227, J5 4079–228 és a J5 41206–696 számú japán szabadalmi leírásokban leírt vegyületek szintén jól használhatók e találmány alkalmazása közben.

E vegyületek elkészítési módszereit már feltárták, és jól ismertek a szakterületen. Az elkészítés folyamatát szemléltetik a 4,082,736 és 4,082,735 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. Ezenkívül hasonló eljárások találhatók az előző fejezetben hivatkozott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban is.

A II. képlet az alkalmazandó muramil-peptidek felépítését mutatja, ahol

R jelentése helyettesített vagy nem helyettesített alkilgyök, amely 1–22 szénatomot tartalmaz, vagy helyettesített vagy nem helyettesített arilgyök, amely 6–10 szénatomot tartalmaz;

R¹ és R² azonos vagy különböző és jelentésük hidrogénatom vagy acilgyök, amely 1–22 szénatomot tartalmaz;

R³ jelentése hidrogénatom, vagy alkilcsoport, amely 1–22 szénatomot tartalmaz, vagy arilcsoport 7–10 szénatommal;

R⁴ jelentése hidrogénatom, vagy alkilcsoport 1–7 szénatommal;

n jelentése 0 vagy 1;

X és Z jelentése egymástól függetlenül alanin, valin, leucin, izoleucin, α-amino-butiril, treonin, metionin, cisztein, glutamin, glutaminsav, izoglutaminsav, aszparagin, fenil-alanin, tirozin, lizin, ornitin, arginin, hisztidin, aszparaginsav, prolin, hidroxil-prolin, szerin vagy glicingyök;

R⁵ a terminális aminosav egy kívánt esetben észterezett vagy amidált karboxilcsoportja; és

Y jelentése –NHCHR₆CH₂CH₂CO-csoport, amelyben R⁶ egy kívánt esetben észterezett vagy amidált karboxilcsoport.

Kívánt esetben észterezett vagy amidált karboxil-csoport a karboxilcsoport maga, vagy a karboxilcsoport egy 1–4 szénatomszámú alkanollal, úgymint metanollal, etanollal, propanollal, butanollal észterezve: vagy karbamoilcsoport, amely a nitrogénatom helyén nem szubsztituált vagy monoszubsztituált vagy diszubsztituált egy 1–4 szénatomszámú alkilcsoporttal, leginkább 1–4 szénatomszámú alkilcsoporttal, arilcsoporttal, különösen fenilcsoporttal, vagy aril-alkil-csoporttal, különösképpen benzilcsoporttal. A karbamoilcsoport helyettesíthető egy alkilidénygyökkel is, éppúgy mint például butilidén- vagy pentilidénygyökkel. Ezenfelül az R₅ karbamoilcsoport szintén helyettesíthető egy karbamoil-metil-csoporttal a nitrogénatomon.

A II. általános képlet szerinti vegyületek közül különösen előnyösek azok, amelyekben

R és R¹ azonosak vagy különbözők, és hidrogénatomot vagy acilgyököt képviselnek, amely 1–22 szénatomot tartalmaz;

R² jelentése metilcsoport; R³ jelentése hidrogénatom; X jelentése L-alaninyök, Y jelentése D-izoglutaminsavgyök,

n jelentése 0.

Egy másik előnyben részesített csoportja a muramil-peptideknek az olyan II. általános képletű vegyületek, amelyekben

R és R¹ jelentése hidrogénatom vagy acilgyök,

R² jelentése metilcsoport,

R³ jelentése hidrogénatom,

R⁴ jelentése metil- vagy butilcsoport, valamint

X jelentése L-valin, L-szerin, L-alanin, L-treonin vagy L- α -aminobutiril-gyök.

Jellegzetes példák e vegyületekre a következők:

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-glutamin n-butil-észter;

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

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

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

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

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

Az immunstimuláló muramil-peptid hatékony mennyisége az a mennyiség, amely hatékonyabban növeli az antitesttiter szintjét, amikor azt antigénnel egyéssítik, mint amikor a muramil-peptidet csak magában vizsgálják. Tudni kell, hogy minden muramil-peptidnek van hatékony dózisa, amely különbözik a többi muramil-peptidekétől. Így e találmány keretein belül olyan egyedi dózissorozat nem írható elő, amely pontos értékét ad minden lehetséges muramil-peptidre, amely e találmány szabadalmi körén belül van. Ugyanakkor általános szabályként kimondható, hogy a muramil-peptid mennyisége az oltóanyagban legjobb, ha 0,001 és 5% (tömeg/térfogat) között van. Még ennél is jobb azonban, ha 0,01 és 3% (tömeg/térfogat) között van.

A legtöbb fent tárgyalt immunstimuláló muramil-peptid alapvetően hidrophil vegyület. Ennek megfelelően önálló emulgeáló ágensekkel együtt kell használni őket (amelyek – mint azt fent említettük – önmaguk is lehetnek immunstimuláló ágensek). Néhány esetben a fent leírt vegyületeknek lipofil karakterük van, így például a zsírsavszubsztituenst tartalmazóknak és/vagy azoknak, amelyek arilszubsztituenst tartalmaznak a cukorgyökön, ezek közül azoknak, amelyek egy vagy több acilgyököt tartalmaznak, amelyben a szénatomok száma 14–22, ezek közül különösképpen azoknak, amelyek több mint 1 ilyen acilszubsztituenst tartalmaznak. Azonban a muramil-peptid lipofil karakterét úgy is ki lehet alakítani, hogy lipidgyököt kapcsolunk a karboxilátcsoporthoz, vagy a peptidgyök oldalláncaihoz. Azok a különösen alkalmas vegyületek, amelyeknek egy vagy több lipidcsoportja kapcsolódik a peptidgyökhöz a terminális karboxilátcsoporton keresztül. E kapcsolat könnyen kialakítható közvetlenül is, észterkapcsolatot alakítva a terminális karboxilát és 14–22 szénatomot tartalmazó zsíralkohol között, vagy pedig egy kettős funkciójú kapcsolócsoporthoz alkalmazásával, amilyen az etanol-amin is, ezzel a karboxilátot észter- vagy amidkapcsolón keresztül egy lipidhez kötve. Különösen jók a találmány e kiviteli módjában a foszfolipidek, mivel a foszfátcsoportok könnyen kapcsolható funkcionális csoportot képeznek. A diacilfoszfogliceridek például ilyen könnyen kapcsolódó foszfolipidek. A foszfatidil-etanol-amin, egy könnyen kapcsolódó, természetben is jelen lévő vegyület könnyen kapcsolható a peptidgyök terminális karboxilátjához egy amidkötéssel keresztül. Más lipidek lehetnek az acilglicerinek, a foszfatidil-kolin, a foszfatidil-szerin, a foszfatidil-inozitol, a foszfatidil-glicerol, a kardiopilin és a szfingomielin.

Számos előnyös amfipatikus immunstimuláló peptid a III. képlet szerint épül fel, amelyben R, R¹–R⁴, X, Y, Z és n jelentése megegyezik az előző képletbelivel. L jelentése lipidgyök, mint például az itt leírt lipidgyökök.

Összefoglalásképpen a molekula muramilsavgyöke és peptidgyöke együtt hidrophil gyököt alkotnak. Egy lipofil gyök jelen van a molekulában, a lipofilítást általában egy hosszú láncú szénhidrogéncsoport biztosítja, amely jellegzetesen jelen van a zsírsavakban. A zsírsav vagy más szénhidrogén-tartalmú gyök kapcsolódhat a cukor hidroxilcsoportjához vagy a molekula peptidrésséhez közvetlenül, mint például peptidgyökön keresztül, egy zsírsavat egy, a peptidgyökben jelen lévő szabad aminocsoporttal reagáltatva, vagy egy kapcsolócsoporthoz, mint például a hidroxil-alkil-aminon keresztül, amely kapcsolatot alakít ki a peptid karboxilcsoportja és a lipid valamely funkciós csoportja – például a foszfátcsoport – között, amidkötéssel keresztül. A foszfolipidgyökök igen alkalmasak lipofil muramil-peptidek alkotására. Az alkalmazott vegyületek egy csoportja tartalmazza a muramil-dipeptideket és -tripeptideket egy hidroxil-alkil-amin-gyökön keresztül egy foszfolipidgyökhöz kapcsolva. Példa erre, és igen jól alkalmazható vegyület az N-acetil-muramil-L-alanin-D-izoglutaminsav-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoil-sn-glicero-

3-(hidroxifoszforil-oxi)jetilamid (rövidítése MTP-PE), amelyet a Ciba-Geigy, Ltd., Basel, Svájc állít elő.

A találmányban használt másik komponens egy metabolizálható, nem toxikus olaj, lehetőleg, de nem feltétlenül 6–30 szénatomot tartalmazó alkán, alkén, alkin és az ezeknek megfelelő savak és alkoholok, továbbá ezek étere és észterei, valamint mindezek keverékei. Az olaj lehet mindenféle növényi olaj, halolaj, állati olaj vagy szintetikus olaj, amely metabolizálható azon alany szervezete által, amelybe az adjuvánst juttatjuk, és nem mérgező az alanyra nézve. Az alany állat, általában emlős, de előnyösen ember. Az ásványi olaj és az ehhez hasonló mérgező petróleumdesztillált olajok egyértelműen alkalmazhatatlanok e találmányban.

A találmány olajkomponense lehet bármely hosszú láncú alkán, alkén, alkin, vagy ezekből származtatott sav vagy alkohol akár szabad savként, akár ezek sójaként vagy észtereként. Ezek lehetnek mono-, di- vagy triészterek, mint például az 1,2-propándiol vagy az ehhez hasonló poli-hidroxialkoholok trigliceridje vagy észterei. Az alkoholok acilezhetők mono- vagy polifunkcionális savval, például ecetsavval, propánsavval, citromsavval vagy hasonlóval. A hosszú láncú alkoholokból származó éterek, amelyek olajok, ha az egyéb említett feltételeknek megfelelnek, szintén használhatók.

Az egyes alkán-, alkén-, vagy alkingyökök és ezek sav- vagy alkoholszármazékai általában 6–30 szénatomot tartalmaznak. A gyök láncstruktúrája lehet egyenes vagy elágazó. Lehet teljesen telített, vagy van egy vagy több kettős, vagy hármas kötése. Ahol mono- vagy poliészter vagy éterbázisú olajok szerepelnek, a 6–30 szénatomos határ a különálló zsírsav- vagy zsíralkoholgyök-re vonatkozik, nem a teljes szénatomszáma.

Minden metabolizálható olaj használható a találmányban, ideértve a mesterséges olajokat is, de az állatokból, halakból vagy bármely növényi forrásból származó olajok alkalmasabbak. Alapvető, hogy az olajat az a gazdaszervezet metabolizálja, amelybe a vegyületet juttattuk; máskülönben az olajkomponens keléseket, granulómákat vagy akár karcinómákat okozhat, vagy ha állatorvosi gyakorlatban alkalmazzuk, a beoltott madarak vagy állatok nem alkalmasak emberi fogyasztásra a káros hatások következtében, amelyeket a nem metabolizált olaj okozhat a fogyasztóban.

A növényi olajok származhatnak termésekből, magvakból és gabonából. A termésekből származó olajokra példa a földimogyoró-olaj, szójaolaj, kókuszolaj és olívaolaj, amelyek a legkönnyebben beszerezhetőek. A magvakból származó olajok lehetnek sáfrányolaj, gyapotmagolaj, napraforgómag-olaj, szezámolaj és ehhez hasonlóak. A gabonaolajok közül a kukoricaolaj a legkönnyebben beszerezhető, de más gabonák – búza, zab, rozs, rizs, és tritiká – olaja is használható.

A növényi olajok előállításának módja jól kidolgozott és jól ismert. Ezek és más hasonló olajok összetételei megtalálhatók például a Merck Indexben és ételek, tápanyagok és élelmiszeripari termékek alapanyagait jelentik.

A glicerín és az 1,2-propándiol 6–10 szénatomos zsírsavészterei, bár a magolajokban nem fordulnak elő a természetben, előállíthatók a termés- és magolajok-

ban található anyagok hidrolízisével, szeparálásával és észterezésével. Ezen termékek kereskedelmi csatornákon keresztül is beszerezhetők NEOBEE néven, amelyet a PVO International, Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boonton, NJ, és mások állítanak elő.

Sokféle állati olaj is használható a találmány szerinti oltóanyagokban és adjuvánssokban. Az állati zsírok és olajok általában folyékonyak testhőmérsékleten, mivel trigliceridek és jobban telítettek, mint a növényi és halolajok. Zsírsavak nyerhetők ugyanakkor állati zsírokból is, részleges vagy teljes elszappanosítással, amely szabad zsírsavakat eredményez. Az emlőstejből származó zsírok és olajok metabolizálhatók, és így használhatók e találmány alkalmazásakor. A szeparálás, tisztítás, elszappanosítás és más módszerek a tiszta olaj állati forrásokból való kinyerésére jól ismertek a szakterületen.

A legtöbb hal metabolizálható olajat tartalmaz, amelyek könnyen kinyerhetők. Például a tőkehalmájolaj, cápaolaj és a bálnaolaj, mint például a spermaceti jól példázza azt a sokféle halolajat, amelyet használhatunk. Sok elágazó láncú olajat biokémiai úton szintetizálnak 5 szénatomos izoprén egységekben, ezeket általában terpenoidoknak hívják. A cápaolaj egy elágazó, telítetlen terpenoidot tartalmaz, amelynek neve szkvalén, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetrakozahexán, amely különösen alkalmas az itteni használatra. A szkvalén, a szkvalén telített változata szintén jól alkalmazható. A halolajok, mint például a szkvalén és a szkvalén, könnyen beszerezhető kereskedelmi forrásokon keresztül, vagy pedig előállíthatók a szakterületen ismert módon.

Ezen adjuvánssok és oltóanyag-kiszárazások olajkomponense 0,5-től 15 tömegszázalékig lehet jelen, de kedvezőbb, ha aránya 1%-tól 12%-ig terjed. Az olaj legkedvezőbb aránya 1–4%.

Az adjuvánskompozíciók vizes része általában puffertolt fiziológiás konyhasóoldat, vagy néhány előnyös kivételi módban tiszta víz. Mivel ezek a kompozíciók általában parenterális alkalmazásra készülnek, helyes, ha véglegesen puffertolt oldatokat használunk az oltóanyagokban, így a tónus, tehát az ozmolalitás ugyanaz, mint a normál fiziológiás oldatoké, így megelőzhető a kompozíció és a fiziológiás oldatok közötti ionkoncentráció különbözősége miatt fellépő alkalmazás utáni duzzadás vagy a kompozíció gyors felszívódása. Az is előnyös, ha a fiziológiás konyhasóoldatot puffertoljuk abból a célból, hogy a pH-t a normál fiziológiás körülményekkel összhangban tartsuk fenn. Némely esetben szükséges lehet a pH-t egy megadott szinten tartani, bizonyos kompozíció-összetevők, mint például a glikopeptidek stabilitásának megőrzése érdekében.

Minden fiziológiailag elfogadható puffer használható, de előnyösek a foszfátpufferek. Más alkalmazható pufferek a citrát, acetát, trisz, bikarbonát, karbonát, vagy ezekhez hasonlóak mint a foszfátpuffer helyettesítői. A vizes komponens pH-ja előnyös, ha 6,0 és 8,0 között van.

Ha az adjuvánsszubszmikronos „olaj a vízben” emulzió, az emulzió készítése során vizes komponensként

tiszta víz használata ajánlott. A sókoncentráció növelésével a kívánt kis cseppméret nehezebben valósítható meg. Amikor az adjuvánsból a végső oltóanyag-formulációt készítjük, az antigénanyagot pufferoldatban adhatjuk hozzá a kellő ozmolalitással, a kívánt oltóanyag-kompozíció előállítás érdekében.

A vizes komponens aránya a kompozícióban az a mennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy a kompozíció értéke egységnyi legyen. Ez a vizes komponens olyan mennyiségét jelenti, amely 100%-ban elegendő ahhoz, hogy a fent említett komponensekkel keverve a kompozíció kellő térfogatú legyen.

A gyógyszerkutatásban az emulgeáló és szuszpendáló ágensek rengeteg különböző fajtáját használják. Ezek között van természetes eredetű anyag, mint a mézga, növényi fehérje, cukorbázisú polimerek, mint az alginátok és a cellulóz, továbbá ezekhez hasonló. Bizonyos oxipolimerek vagy polimerek, amelyekben hidroxid vagy más hidrofíli szubsztituens van a szénláncon, felületaktív tulajdonsággal rendelkeznek, ilyen például a povidon, a poli(vinil-alkohol) és glikol-éter-bázisú mono- és poli-funkcionális vegyületek. A hosszú láncú zsírsavból származó vegyületek egy harmadik fontos csoportját alkotják az e találmányban használható emulgeáló és szuszpendáló ágenseknek. Minden fent felsorolt felületaktív anyag csak akkor használható, ha nem mérgező.

A találmányban alkalmazható emulgeáló ágensek (amelyeket felületaktív anyagoknak vagy detergenseknek is nevezünk) például az alábbiak:

1. Vízben oldható szappanok, így a magasabb szénatomszámú (C10–C22) zsírsavak nátrium-, kálium-, ammónium- és alkanolammónium sói, különösen a nátrium- és káliumfaggyú, valamint kókuszszappanok.

2. Anionos szintetikus nem szappan detergens, amelyeket jól példáznak a kénsav szerves reakciótermékeiből származó vízben oldható sók, amelyeknek molekuláris szerkezetében alkilgyök van, amely 8–22 szénatomot tartalmaz, valamint egy gyök, amely a szulfonsav és kénsav észtergyökeinek csoportjából származik. Ezekre példák a nátrium- vagy kálium-alkil-szulfátok, amelyek faggyúból vagy kókuszolajból származnak; a nátrium- vagy kálium-alkil-benzolszulfonátok; a nátrium-alkil-gliceril-éter-szulfonátok; a nátrium kókuszolaj zsírsav monoglicerid szulfonátok és szulfátok; egy mol nagyobb értékű zsíralkohol és mintegy 1–6 mol etilén-oxid reakciójából származó reakciótermék kénsav-észterének kálium- vagy nátriumsói; a nátrium vagy kálium-alkil-fenol-etilén-oxid éterszulfonátok, amelyek 1–10 egység etilén-oxidot tartalmaznak molekulánként, és amelyekben az alkilgyökökben 8–12 szénatom van; zsírsavak izetioniksavval való észterezéséből, majd nátrium-hidroxiddal való semlegesítéséből származó reakciótermék; metil-aurid zsírsavamidjának nátrium- és káliumsói; valamint az SO_3 -szulfonált C10–C24 alfa-olefinek nátrium- és káliumsói.

3. Nemionos szintetikus detergens, amelyek az alkilén-oxid-csoportok valamely szerves hidrofób vegyülettel való kondenzációjából származnak. Jellegzetes hidrofób csoportok a propilén-oxid propilén-glikollal és alkilfenollokkal való kondenzációjából származó ter-

mékek, valamint a propilén-oxid és etilén-diamin, 8–22 szénatomszámú alifás alkoholok és zsírsavak amidjainak kondenzációs termékei.

4. Nemionos detergens, úgymint az amin-oxidok, foszfin-oxidok és szulfoxidok, amelyeknek szemipoláris tulajdonságaik vannak. Példák erre a hosszú láncú tercier amin-oxidok, ezek közé értve a dimetil-dodecil-amin-oxidot és bisz(2-hidroxi-etil)-dodecil-amint. A foszfin-oxidok jellegzetes példái találhatók a 3,304,263 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amelyet 1967. február 15-én adtak meg, ezek között van a dimetil-dodecil-foszfin és a dimetil-(2-hidroxi-dodecil)-foszfin-oxid.

5. Hosszú láncú szulfoxidok, amelyek között vannak az $\text{R}_1\text{--SO--R}_2$ általános képletűek, ahol R^1 és R^2 jelentése szubsztituált vagy nem szubsztituált alkilgyök, amelyek közül az első mintegy 10–28 szénatomot tartalmaz, míg R^2 1–3 szénatomot. Jellegzetes példája ezen szulfoxidoknak a dodecil-metil-szulfoxid és a 3-hidroxi-tridecil-metil-szulfoxid.

6. Amfolitikus szintetikus detergens, úgymint a nátrium 3-dodecil-amin-propionát és a kálium-3-dodecil-amin-propán-szulfonát.

7. Ikerionos szintetikus detergens, úgymint a 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilammonio)-propán-1-szulfonát és 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilammonio)-2-hidroxi-propán-1-szulfonát.

Ezenfelül az emulgeáló ágensek minden itt következő típusa használható a találmányban: (a) zsírsavak, gyantasavak és tallolaj szappanjai (vagyis alkálisók); (b) alkil-arén-szulfonátok; (c) alkilszulfátok, köztük azok a felületaktív anyagok, amelyek tartalmazhatnak mind elágazó, mind egyenes láncú hidrofób csoportokat, valamint primer és szekunder szulfátcsoportokat; (d) szulfátok és szulfonátok, amelyek hidrofób és a hidrofíli csoportok között közbenső kötőrészt tartalmaznak, mint például zsírsavval acilezett metil-auridok és a szulfatált zsír-monogliceridek; (e) polietilén-glikol hosszú láncú savészterei, különösen a tallolaj-észterek; (f) alkil-fenolok polietilén-glikol-éterei; (g) hosszú szénláncú alkoholok és merkaptánok polietilén-glikol-éterei; (h) zsírsav dietanol-amidok; és (i) az etilén-oxid és propilén-oxid blokk-kopolimerjei. Mivel a felületaktív anyagok többféleképpen osztályozhatók, az e bevezetésben szereplő felületaktívanyag-osztályok részben átfedik a korábban leírt felületaktívanyag-osztályokat.

Nagyszámú emulgeáló ágens létezik, amelyeket speciálisan a biológia területén való használatra alkottak és itt is terjedtek el. Így például sok biológiai detergenst (felületaktív anyagot) sorol fel a Sigma Chemical Company Catalog of Biochemical and Organic Compounds (1987) című kiadványa 310–316. oldalán. Ezek a felületaktív anyagok négy alaptípusba vannak sorolva: anionos, kationos, cvitterionos és nemionos felületaktív anyagok. Az anionos detergensre példa az alginát, a kaprilsav, a kolsav, az 1-dekán szulfonsav, a dezoxikolsav, az 1-dodekánszulfonsav, az N-lauroil-szarkozin és a taurokolsav. A kationos detergensre példa lehet a dodecil-trimetil-ammónium-bromid, a benzalkónium-klorid, a benzil-dimetil-hexadecil-ammónium-klorid, a

cetil-piridinium-klorid, a metil-benzetonium-klorid és a 4-pikolin-dodecil-szulfát. A cvitterionos detergensekre példa lehet a 3-[(3-kolamido-propil)-dimetil-ammonio]-1-propánszulfonát (rövidítése CHAPS), a 3-[(kolamido-propil)-dimetil-ammonio]-2-hidroxi-1-propánszulfonát (rövidítése CHAPSO), az N-dodecil-N,N-dimetil-3-ammonio-1-propánszulfonát és a lizo-alfa-foszfadilkolin. A nemionos detergensre példa lehet a dekanol-N-metilglukamid, a dietilenglikol-monopentil-éter, az n-dodecil-béta-D-glukopiranozid, a zsírsavak etilén-oxid-kondenzátumai (például a Lubrol néven forgalomba hozott termék), a zsírsavak (különösen a C12–C20 zsírsavak) polioxi-etilén-éterei, a polioxi-etilén szorbitán zsírsavéterek (például a Tween néven forgalomba hozott termékek) és a szorbitán zsírsavéterek (például a Span néven forgalomba hozott termékek).

Különösen hasznos csoportja a felületaktív anyagoknak a szorbitán bázisú nemionos felületaktív anyagok. Ezek a felületaktív anyagok a szorbit dehidrációjával jönnek létre, amely művelet 1,4-szorbitánt eredményez, amelyet aztán reagáltatnak egy vagy több ekvivalens zsírsavval. A zsírsavval helyettesített gyök tovább reagáltatható etilén-oxiddal, így a felületaktív anyagok egy második csoportja keletkezik.

A zsírsavval helyettesített szorbitán felületaktív anyagok 1,4-szorbitán valamely zsírsavval – laurinsavval, palmitinsavval, sztearinsavval, olajsavval, vagy ezekhez hasonló hosszú láncú zsírsavval – való reakciójából keletkeznek, amely 1,4-szorbitán monoésztert, 1,4-szorbitán szeszkviesztet vagy 1,4-szorbitán triésztert eredményez. Ezen felületaktív anyagok szokásos neve például szorbitán monolaurát, szorbitán monopalmitát, szorbitán monooleát, szorbitán szeszkvioleát és szorbitán trioleát. Ezek a felületaktív anyagok a kereskedelemben Span, vagy Arlacel néven vásárolhatók meg, általában egy betűjelzéssel, amely a különböző mono-, di- és triészter-szubsztituált szorbitánok megkülönböztetését teszi lehetővé.

A Span és az Arlacel felületaktív anyagok hidrofílek és általában oldhatók vagy diszpergálhatók olajban. Szintén oldhatók a legtöbb organikus oldószerben. Vízben általában oldhatatlanok, viszont diszpergálhatók. A felületaktív anyagokban a hidrofíli-lipofíli egyensúly (HLB) legtöbbször 1,8 és 8,6 között van. Az ilyen felületaktív anyagok könnyen előállíthatók a szakterületen ismert módszerekkel, vagy megvásárolhatók, mint például az ICI America's Inc., Wilmington, DE készítménye, amely Atlas néven van forgalomban.

A felületaktív anyagok rokon csoportjai a polioxi-etilén-szorbitán monoészterek és a polioxi-etilén-szorbitán triészterek. Ezek az anyagok az 1,4-szorbitán monoészterekhez vagy -triészterekhez való etilén-oxid-hozzáadással állíthatók elő. A polioxi-etilén hozzáadása átváltoztatja a lipofíli szorbitán mono- és triésztereket hidrofíli felületaktív anyagokká, amelyek általában oldhatók vagy diszpergálhatók vízben, valamint különböző mértékben oldhatók a szerves folyadékokban is.

Ezek az anyagok, amelyek a kereskedelemben Tween néven kaphatók, hasznosak az „olaj a vízben” emulziók és diszperziók készítésekor, illetve az olajok

szolubilizációjakor és vízmentes kenőcsök vízben oldhatóvá és moshatóvá tételekor. A Tween felületaktív anyagok az emulzióstabilitás előmozdítása érdekében kombinálhatók a rokon szorbitán monoészter vagy -triészter felületaktív anyagokkal. A Tween felületaktív anyagok nagyszámú gyártótól beszerezhetők, így például az ICI America's Inc.-től (Wilmington, DE), Atlas néven.

A nemionos felületaktív anyagok harmadik csoportja, amely használható önmagában vagy Span, Arlacel és Tween felületaktív anyagokkal együtt is, a poli-oxi-etilén zsírsavak, amelyek etilén-oxid és egy hosszú láncú zsírsav reakciójából keletkeznek. A legáltalánosabban használt ilyen típusú felületaktív anyag Myrj néven szerezhető be, a sztearinsav polioxietilén származéka. A Myrj felületaktív anyagok hidrofílek és oldhatók, vagy diszpergálhatók vízben, csakúgy, mint a Tween felületaktív anyagok. A Myrj felületaktív anyagok elegyíthetők Tween felületaktív anyagokkal, vagy Tween/Span vagy Arlacel felületaktívanyag-keverékekkel, emulzió kialakítása végett. A Myrj felületaktív anyagok elkészíthetők a szakterületen ismert módon, vagy megvásárolhatók az ICI America's Inc.-től.

A polioxi-etilén-alapú nemionos felületaktív anyagok negyedik csoportja a polioxi-etilén zsírsavéterek, amelyek lauril-, acetil-, sztearil-, és oleil-alkoholokból származnak. Ezek az anyagok a fenti módon állíthatók elő, etilén-oxidot adva valamely zsírsavhoz. Ezen felületaktív anyagok kereskedelmi neve Brij. A Brij felületaktív anyagok hidrofílek vagy lipofílek lehetnek a felületaktív anyagon belüli polioxi-etilén-gyök méretétől függően. Ezen vegyületek készítési módja ismert a szakterületen, de könnyen beszerezhetők olyan forrásokból is, mint az ICI America's Inc.

Más nemionos felületaktív anyagok, amelyek e találmányban felhasználhatók, a polioxi-etilén, a poliol zsírsavészterek, a polioxi-etilén-éter, a polioxi-propilén zsírsavéterek, a méhviasz polioxi-etilén-származékai, a polioxi-etilén lanolinszármazékai, a polioxi-etilén zsírsav-gliceridek és a glicerín-zsírsavészterek vagy 12–22 szénatomszámú hosszú láncú zsírsavak más polioxi-etilén-sav alkohol-, vagy éterszármazékai.

Mivel a találmány adjuváns- és oltóanyag-formulációi többfázisú rendszerként léteznek, jó, ha olyan emulzióformáló nemionos felületaktív anyagot használunk, amelynek HLB-értéke mintegy 7 és 16 között van. Ez az érték beállítható egyetlen nemionos felületaktív anyag használatával, mint például a Tween, vagy felületaktívanyag-keverékek használatával, amelyek keverékek alapanyagai lehetnek szorbitán mono-, di- vagy triészteralapú felületaktív anyagok; szorbitán észter-polioxi-etilén zsírsavak; szorbitán észter és egy polioxi-etilén lanolin eredetű felületaktív anyagkombinációja; szorbitán észter felületaktív anyag és egy magas HLB-értékű polioxi-etilén zsírsavéter felületaktív anyag kombinációja; vagy egy polietilén zsírsavéter felületaktív anyag, vagy polioxi-etilén szorbitán zsírsav.

Egyetlen nemionos felületaktív anyag használata kedvezőbb a jelen találmány gyakorlati kivitelében, leginkább a Tween felületaktív anyag mint nemionos emulzióstabilizáló felületaktív anyagé. A Tween-80 nevű fe-

lületaktív anyag, amely poliszorbát 80 vagy polioxi-etilén 20 sorbitán monooleát néven is ismert, a leginkább kedvelt a fent felsorolt felületaktív anyagok közül.

Az alkalmas „olaj a vízben” emulziók általában létrehozhatók 0,02 és 2,5 tömeg% közötti felületaktív anyag alkalmazásával. A 0,05 és 1% közötti arány azonban jobb eredményt ad, míg legjobb a 0,01 és 0,05 közötti tömeg%.

Az „olaj a vízben” emulzió előállításának módja nem lényeges a találmány szempontjából. Az ilyen emulzió előállítása megoldható a kereskedelmi emulgeálószerre, mint például a 110Y modellszámú szer alkalmazásával, amelyet a Microfluidics, Newton, MA állít elő. További példák a kereskedelmi emulgeálószerrekre a Gaulin Model 30CD (Gaulin, Inc., Everett, MA) és a Rainnie Minlab Type 8.30H (Micro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, WI). Ezek az emulgeálószerre nagy nyíróerők elvén működnek, a folyadék kis nyílásokon keresztül való kijuttatásával, magas nyomás alatt. Bár e találmány alkalmazása nem zárja ki ezen emulgeálószerre használatát, ez nem szükséges és nem is ajánlott. Ha szubmikronos olajcseppeket akarunk kapni, gyengébb nyíróerőket kialakító berendezések is használhatók (például a készítmény egyetlen átengedése injekciós tűn keresztül).

Az olajcseppek mérete módosítható az olajhoz adott detergens mennyiségének változtatásával (több detergens csökkenti a cseppméretet), a nyomás változtatásával (a nyomás növelésével nő a cseppméret), a hőmérséklettel (magasabb hőmérséklet hatására csökken a cseppméret) és amfipatikus immunstimuláló ágens hozzáadásával (az ágens hozzáadásával csökken a cseppméret). A tényleges cseppméret változik a különböző alkalmazott detergensekkel, olajokkal, immunstimuláló ágensekkel (ha vannak ilyenek) és a kiválasztott eljárásokkal együtt. A cseppméret vizsgálható erre alkalmas berendezésekkel, amilyen például a kereskedelembe beszerezhető szubmikron részecskeanalizátor (N4MD modell), amelyet a Coulter Corporation gyárt.

Az emulziókomponenseket a fent leírt alapanyagokból az oltóanyagban használt liposzóma/antigén komponens hozzáadása előtt kell elkészíteni. A liposzómákat nem lehet az emulziókomponensek jelenlétében elkészíteni, mivel a liposzóma foszfolipidjei és más komponensei beépülnek az emulzióba és emulgeálóként működnek.

Mivel a találmány emulziókomponense stabil, a liposzóma/antigén és az emulzió elegyíthető egyszerű összekeveréssel, kevertetéssel vagy rázással. Más technológiákkal, mint például a két komponens elegyének gyors keresztüláramoltatásával egy kis nyíláson (például hipodermikus tűn), könnyen előállítható az oltóanyagkompozíció.

A találmány kompozíciója különböző komponenseinek aránya nagy mértékben változtatható. A liposzóma/antigén és az emulziókomponenseket általában 1:10-től 10:1 térfogatarány között alkalmazzuk. Az 1:3–3:1 keverési arány az előnyös, és az 1:1 arány különösen előnyös, mivel könnyű elkészíteni és könnyen felismerhető. Speciális célokra ugyanakkor más keveré-

si arányok alkalmasabbak, mint például amikor egy meghatározott antigén egyrészt nehezen juttatható be a liposzómába, másrészt immunogenitása alacsony, amely esetben az antigén nagyobb relatív mennyiségére van szükség.

A liposzómákat általában mintegy 1–100 mg lipid/ml lipidszuszpenzió felhasználásával készítik, amely mintegy 0,5–50 mg lipid/ml végső koncentrációt ad. Előnyösebb, ha liposzómákat mintegy 3–30 mg lipid/ml, de legjobb, ha 10 mg lipid/ml koncentráció mellett készítjük.

A hozzáadott antigén tömegét a kívánt dózis és a bejuttatandó végső oltóanyag-kompozíció mennyisége határozza meg. Így például, ha ismeretes, hogy a kívánt immunválasz indukálásához 10 mikrogramm antigénre van szükség, és 1 milliliter az immunizálandó állatba általában injektált mennyiség, az oltóanyag-kompozíciót az itt leírtaknak megfelelően kell elkészíteni, tehát 1 milliliter oltóanyagnak 10 mikrogramm antigént kell tartalmaznia. Az antigéneket jellemzően mintegy 1–500, de inkább 10–50 mikrogramm/ml koncentrációban vezetik be. Ezek ugyanakkor csak általános irányvonalak és az antigének konkrét mennyiségét – ahogy fent leírtuk – a kívánt immunválasznak megfelelően kell kialakítanunk.

Ehhez hasonlóan a muramil-tripeptid (ha szükséges) mennyisége is a standard dózis és a végső oltóanyag-kompozíció függvényében alakítandó. Az ilyen standard dózisok általában mintegy 1–2500, de előnyösen mintegy 10–2500 mikrogramm/ml között változnak.

Az emulzióval való jó keveredés biztosítására a liposzóma méreteit úgy kell megválasztani, hogy azok illeszkedjenek az emulzió részecskéinek méretéhez. Például a 200–450 nm átmérőjű liposzómákat kell használnunk szubmikronos emulziókban. Az unilamelláris liposzóma alkalmazása különösen előnyös.

Bár legalább néhány antigén egyesül a liposzómával úgy, hogy beléjük jut, vagy úgy, hogy a felszínükön megtapad, lehetséges, hogy a találmány szerinti kompozíciók között lesz olyan, amelyben olyan antigén van jelen, amely nem egyesült a liposzómával. Az ilyen antigén jelen lehet az emulzióban annak elkészítése után rögtön, vagy az antigén elválik a liposzómakompozíciótól, amely ekkor jellegzetesen tartalmaz egy kevés folyadékfázist, amely a liposzómához kapcsolódik, de azokon kívül van.

A találmányt ezzel általánosságban leírtuk, de jobban megérthető a folyamat a következő részletezett példák segítségével, amelyek illusztrációként szolgálnak, és nem arra, hogy a találmány oltalmi körét korlátozzuk, kivéve, ha ezt külön jelezzük.

Kiviteli példák

1. példa

A gD2 antigén liposzómával való fizikai egyesülése

Kísérleteket folytattunk abból a célból, hogy bemutassuk az antigén liposzómával való egyesülését, amely előfeltétele annak, hogy liposzóma az antigéneket a sejtekhez szállíthassák.

Nem fuzogén liposzómák: A PC/PS (7:3) összetételű liposzómákat mind oktil-glukozid-dialízissel, mind reverz fázisú bepárlással (REV) előállítottuk. A 100 mikrogramm/ml koncentrációban lévő gD2-t megjelöltük stabil, jódozott gD2-vel mint markerral. A nem kötődött gD2-eket a liposzómaiktól folyadékkromatográfiás eljárással elkülönítve kimutattuk, hogy a gD2 17%-a egyesült a dialízisliposzómákkal és 33%-a a REV-liposzómákkal. Egyik gD2-vel egyesült liposzóma sem volt érzékeny a tripszines emésztésre, ami azt mutatta, hogy a gD2 nem volt jelen a vezikulumok külső felületén. A liposzómák (2 mM lipid) egy éjszakán keresztüli inkubálása 0,4–2 mM Triton X-100-zal a Triton nagyobb mennyiségei mellett a gD2 progresszív disszociációját eredményezte, ez egybevág a liposzómák progresszív permeabilizációjával. A REV liposzómák valamivel jobban ellenálltak a detergenspermeabilizációnak az oktil-glukozid-maradékok hiánya miatt.

Fuzogén liposzómák: A PE/GS (8:2) összetételű liposzómákat oktil-glukozid-dialízissel állítottuk elő.

Mivel ez a lipidkompozíció inkompatibilis a REV-technológiával, az előállítás e módjához PE/OA (8:2)-t használtunk. Az olajsav glicerín-szukcináttal való helyettesítése a REV-technológia során stabil LUV-ot eredményez. A dialízisliposzómák 39%-a egyesült a gD2-vel, a REV-liposzómák 72%-a (1. táblázat). A kötődött gD2-k körülbelül 50%-át távolította el a tripszines emésztés a dialízisliposzómákról, ami annyit jelent, hogy ezek a liposzómák külső felületén kötődtek. A fuzogén dialízisliposzómák könnyebben permeabilizálhatók voltak Tritonnal, mint a nem fuzogének. Az olajsavat tartalmazó REV liposzómák elvesztették a legtöbb megjelölt gD2-t mind tripszinnel, mind Tritonnal kezelve. Ebből nem vonhatók le tapasztalatok a gD2 ezen vezikulumokkal való egyesüléséről, inkább a 20 molszázaléknál több zsírsavat tartalmazó vezikulumpreparátumok bomlékonyságát mutatja.

A gD2-nek előre elkészített PE/GS/CHOL (8:2:2) dialízisliposzómákkal való inkubációja nem eredményezett gD2-liposzóma-egyesülést.

I. táblázat
A gD2 egyesülése liposzómákkal

Lipidkompozíció	Az előállítás módja	gD2 egyesülés %	Tripszines emésztés	Triton X-100 permeabilizáció
PC/PS (7:3)	oktil-glukozid dialízis reverz fázisú bepárlás	17	–	++
		33	–	+
PE/GS (8:2)	oktil-glukozid dialízis	39	++	+++
PE/OA (8:2)	reverz fázisú bepárlás	72	++++	++++

– =nincs gD2-vesztés a liposzómákból
+ =gD2-kibocsátás 0,1% Triton hatására
++ =gD2-kibocsátás a 0,05 Triton hatására
+++ =gD2-kibocsátás 0,025 Triton hatására
++++ =teljes gD2-mennyiség-kibocsátás 0,025 Triton hatására

2. példa

Az RT6 molekula liposzómákkal való fizikai egyesülése

Az 1. példához hasonló módszerrel az RT6 genetikailag manipulált HIV reverz transzkriptáz molekula liposzómákkal való egyesülését mértük. Az RT6 29%-a egyesül PC/PS (7:3) dialízisliposzómákkal és 73%-a PE/GS (8:2) dialízisliposzómákkal. Az RT6 kismértékű jelölődése jóddal a tripszines emésztés és a Triton-permeabilizáció megfigyelésének bizonytalanságát eredményezte.

3. példa

A gp120 liposzómákkal való fizikai egyesülése

Az előzőekhez hasonló módszerrel mérve a HIV gp120 PC/PS (7:3) dialízisliposzómákkal való egyesülése 8%, a PE/GS (8:2) dialízisliposzómákkal 11%, sokkal kevesebb, mint a gD2-re és RT6-ra mért ér-

tekek. A géliszűrési HPLC kromatogramok egy gp120-ban gazdag csúcs jelenlétét tárják fel, amely a liposzómafrakció és a monomer gp120 között helyezkedik el. A csúcs valószínűleg gp120 és oktil-glukozid kevert micellákat képvisel. A tripszines emésztés és a Triton-permeabilizáció azt jelzi, hogy a gp120 mindkét liposzómapreparátumban bekerül a liposzómák belsejébe, és egyikben sem hozzáférhető azok felületén.

A gp120 egyesülése fuzogén liposzómákkal fokozódott a liposzómák előállításával fagyasztásos-felengedetési módszerrel. Az antigén egyesülését a pelletált liposzómák fehérjeanalízisével határoztuk meg.

A gp120 inkubálásra előre elkészített, fagyasztott-felengedetett-szűrt (FTF) liposzómákkal, amelyek PC/PS (7:3), vagy PE/GS/CHOL (8:2:2) összetételűek, nem eredményeztek egyesülést.

II. táblázat
A gp120 egyesülése liposzómákkal

Lipidkompozíció	Az előállítás módja	gp120 egyesülés %	Tripszines emésztés	Triton X-100 permeabilizáció
PC/PS (7:3)	oktil-glukozid dialízis	8	–	++
PE/GS (8:2)	oktil-glukozid dialízis	11	–	++
PE/GS/CHOL (8:2:T)	fagyasztás-felengedtetés-szűrés	56	ND	ND

– = a liposzómából nincs gp120-vesztés
++ = a gp120 eltávolítása 0,1% Triton hatására
ND = nem mért

4. példa

Az 1. maláriaszérum egyesülése liposzómákkal

Az 1. számú maláriaszérum-fehérje PC/PS (7:3) liposzómákkal való egyesülése 67%-os volt dialízisliposzómák és 95% FTF liposzómák esetében. Az 1. szérumot az előkezelt liposzómákhoz adva, annak 75%-a egyesült FTF vezikulumokkal. Az 1. szérum PE/GS/CHOL (8:2:2) liposzómákkal való egyesülése 65% volt dialízisliposzómák és 87% FTF liposzómák esetében. Az 1. szérum 91%-ban egyesült előre elkészített dialízisliposzómákkal. A nem kötődött fehérjét centrifugálással választottuk el a liposzómáktól. Az antigénkötődést a liposzómapelletek fehérjevizsgálatával határoztuk meg.

5. példa

HA Taiwan influenzavírus fizikai egyesülése liposzómákkal

A HA Taiwan 69%-ban egyesült DPPC/DMPG (8:2) dialízisliposzómákkal. A HA Taiwan 78%-ban egyesült a PE/GS/CHOL (8:2:2) dialízisliposzómákkal és 80%-ban az előre elkészített vezikulumokkal. Az egyesülés mértékének meghatározása ugyanúgy történt, mint az 1. szérum esetében.

6. példa

A HSV gB2 peptid fizikai egyesülése liposzómákkal

A HSV gB2 peptid 40%-ban egyesült a PC/PS (7:3) FTF liposzómákkal, a mérés ugyanúgy történt, mint az 1. szérumnál.

7. példa

A gB2 fizikai egyesülése liposzómákkal

A HSB gB2 24%-ban egyesült PE/GS/CHOL (8:2:2) dialízisliposzómákkal. A gB2 egyesülése az FTF-fel előállított liposzómákkal 84%-os volt. A fehérjeegyesülés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a nem kötődött gB2-t centrifugálással eltávolítottuk, és a liposzómapelletekkel egyesült gB2-t mértük Elisa-befogással.

8. példa

Az antigénfelvétel és sejten belüli lokalizáció in vitro tanulmányozása

Kutatásokat végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk az antigén sejten belüli sorsát a találmány szerinti kompozíciók alkalmazása esetén.

A kezdeti kísérletek, amelyek a FITC-dextránra terhelt liposzómák rácsáló- és humán makrofágok általi felvételét kívánták bemutatni, következetesen sikeresek voltak. A reverz fázisú bepárlással és nagynyomású extrudálással elkészített liposzómák felvétele egyaránt kielégítő volt. Az alkalmazott nem fuzogén lipidkompozíciók 7:3 molarányú PC/PS-ek, valamint 9:1 molarányú PC/foszfátidil-glicerinek. A fuzogén lipidkompozíciók vagy PE/CHOL/OA 4:4:2 arányú elegyei, vagy PE/OA 8:2 arányú elegyei voltak. A fuzogén liposzómák létrehozásakor a vizes fázis pH-ja kezdetben 10 kell, hogy legyen. A külső közeg 7,4 pH melletti gélfiltrációval való kicserélésének eredményeként a liposzómák legalább 2 napig stabilak maradnak, ezt fáziskontraszt és epifluoreszcens mikroszkóp segítségével ellenőriztük.

A nem fuzogén liposzómák 18 órán keresztüli makrofágokkal együtt való pulzálása eredményeként fényes-pontos fluoreszcenciát kapunk a sejten belül. A pulzálást kimutató kísérletek azt mutatják, hogy a liposzómák először a citoszol külső részén vannak jelen, majd a perinukleáris területre kerülnek. Ez a folyamat összevág az endoszomális felvétellel, amelyet a sejten belüli transzport követ a liposzómákhoz. Az MTP-PE beépülésének a kettős rétegbe 250:1 lipid:MTP-PE molarány mellett nem volt hatása a felvételi kinetikára.

Fuzogén liposzómákkal végzett hasonló kísérletek a fényes-pontos fluoreszcencia és a halvány diffúz fluoreszcencia kombinációját eredményezték. A pulzálást kimutató kísérletek nem szüntették meg teljesen a pontfluoreszcenciát, ami azt mutatja, hogy az endoszomális fúzió kevesebb mint 100%-os hatékonyságú. Ezenfelül a liposzómatitrlási kísérletek azt mutatják, hogy a fúzió megszüntethető: 100 mikrogramm foszfolipid/104 sejt/cm²-nél nagyobb sűrűség erősen leterhelt pontfluoreszcenciát eredményezett, kismértékű diffúz fluoreszcenciával, míg 10 mikrogramm foszfolipid/104 sejt/cm²-nél kisebb sűrűség a diffúz fluoreszcencia abszolút túlsúlyát eredményezte. Az MTP-PE beépülése 1000:1, 500:1 és 250:1 foszfolipid:MTP-PE molarány mellett rendkívül gyenge diffúz és pontfluoreszcenciát eredményezett, amely hatás 1000:1 arány alatt volt a legkifejezettebb. A szabad FITC-dextrán ilyen körülmények között nem endocitálódott, ami egyértelműen azt mutatja, hogy az endocitózis befejeződése nem felszíni hatás, hanem az MTP-PE citoszolba kerülésének eredménye. A FITC-gD2-vel ter-

helt liposzó mákkal végzett előzetes kísérletek azt mutatják, hogy a gD2 e módszerrel könnyen bevihető a makrofágokba.

9. példa

A makrofágfelvétel

Összehasonlítottuk az U937 sejt – amely egy humán monocitászertő sejtvonal az Amerikai Típus Sejttenyésztés Gyűjteményből (ATCC) – FITC-dextránnal telített liposzómafelvételét primer makrofágtenyészetekkel végzett korábbi felvételi kísérleteink eredményeivel. A nem differenciált U937 sejtek nem fagocitáltak sem a liposzó mákat, sem a szabad FITC-dextránt. Ha a sejteket forbol-mirisztill-acetáttal differenciáltuk, majd 18 órán keresztül inkubáltuk nem fuzogén PC/PG (8:2) liposzó mákkal együtt, pontfluoreszcenciát mutattak, ami a dextrán endoszó mák, illetve liposzó mák általi felvételét jelzi. Fuzogén PE/GS (8:2) liposzó mákkal való inkubáció egységes diffúz fluoreszcenciát eredményezett, ami a dextrán sejtcitoplazmába való bejutását mutatja. Az MTP-PE beépülése liposzó mákba nem volt hatással a fagocitózisa. Ezek az eredmények hasonlóak azokhoz, amelyeket valódi makrofágokkal értünk el, de a két sejttípus között lényeges különbség van a felvétel arányában: a differenciált U937 sejtek tízszer több lipidet, mint makrofágot igényeltek a látható fluoreszcenciához. A makrofágok számára a fagocitózis önmagában aktivációs jel. Az U937 sejtek nem aktiválhatók fagocitózissal.

25 ng/ml PMA-val 5 napig érlelt U937 sejteket egy éjszakán keresztül oldható gD2-vel, nem fuzogén PC liposzó mákat gD2-vel, fuzogén liposzó mákat gD2-vel inkubáltunk. A sejtben belüli gD2 jelenlétét FITC-kecske-alfa egér Ab-hoz kötött egér-alfa gD Mab immunofluoreszcenciájával mutattuk ki.

Azt találtuk, hogy az oldható gD2 alacsonyabb szintű fluoreszcenciát eredményezett, mint bármely liposzó makészítmény, valamint, hogy a PE liposzó mák magasabb fluoreszcenciaszintet mutattak, mint a PC liposzó mák. A felvétel általánosságban ugyanakkora volt, akár a 10% szérummal együtt, akár a nélkül történt az inkubáció, míg a fluoreszcencia némileg nagyobb mértékű volt a szérum jelenlétében. Az oldható gD2-vel inkubált sejtek alacsony szintű diffúz fluoreszcenciát mutattak. Bármely liposzó makészítménnyel inkubált sejtek zömmel diffúz fluoreszcenciát mutattak, esetlegesen pontfluoreszcenciával együtt. Ezek az eredmények ellentétben álltak korábbi, FITC-dextránnal terhelt liposzó mákkal elért eredményeinkkel, amelyekben a diffúz

fluoreszcencia a fuzogén liposzó mákhoz társult, míg a pontfluoreszcencia a nem fuzogén liposzó máknál volt megfigyelhető. Mivel a gD2 pH-ra nem érzékeny fuzogén fehérje, indukálhatja mindkét típusú liposzó ma sejtekkel való fúzióját, amely diffúz fluoreszcenciát eredményez.

A fenti kísérletek azt sugallták, hogy a gD2 módosíthatja a liposzó matartalom sejtben belüli elhelyezkedését. Ennek ellenőrzésére az U937 sejteket gD2-vel és FITC-dextránnal, vagy gD2-vel és RT6-tal készített liposzó mákkal inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az epifluoreszcenciás mikroszkópos vizsgálat megmutatta, hogy a PC/PS liposzó mák pontfluoreszcenciát gerjesztettek, mind a FITC-dextrán, mind az RT6 esetében. PE/GS liposzó mák esetében diffúz fluoreszcenciát észleltünk a FITC-dextránnál és az RT6-nál egyaránt. Ilyen körülmények között a gD2 nem képes módosítani a liposzó matartalom elhelyezkedését.

10. példa

A liposzó ma/emulzió kombinációk immunogenitása gD2-vel kecskében

Ezen adatok azt mutatják, hogy adott emulzió nál magasabb antitesttiteret kapunk, ha az emulzió val való összekeverés előtt kombináljuk az antigént a liposzó mákkal. Akár a fuzogén, akár a nem fuzogén liposzó mákkal kapott antitesttiter körülbelül azonos volt az emulzió val való összekeverés után.

Ebben a kísérletben egy „olaj a vízben” emulzió ból álló kompozíció MF79/1501-nek nevezett MTP-PE-t (10% szkvalén (térfogat/térfogat); 1% Tween-80 (térfogat/térfogat); 5% Tetronic 1501 (polioxi-etilén-polioxi-propilén blokkpolimer) (térfogat/térfogat); 400 mikrogramm/ml MTP-PE) tartalmaz gD2-vel kombinálva, immunogenitását vizsgáltuk. E kompozíciót azután az MF79/1501 fuzogén liposzó makombinációval hasonlítottuk össze. Ezt a liposzó ma-gD2 keveréket állatok immunizálására alkalmaztuk 3 alkalommal, 3 hetes időközönként. Mint a 3. táblázat mutatja, ez a kombinált emulzió-liposzó ma kombinációval végzett immunizálás magas antitestválaszt váltott ki. Két immunizálás után a liposzó maemulzió csoport 7258 átlagos titeret mutatott, ez mintegy háromszor akkora, mint az M79/1501-re magában kapott érték. Ez a válaszerék nagyon állandó volt a csoporton belül; mindössze 10% standard hibával. A harmadik immunizálás után a csoportban lévő összes állat, egy kivételével, a titer kisebb mértékű emelkedését mutatta. Így a liposzó ma kombinálása emulzió val az immunválasz jelentős emelkedését okozta.

III. táblázat

A gD2 adjuváns vizsgálata kecskében

Állat száma	Adjuváns	Elővérvétel	1/2b	2/2	3/2
5026	2 × MF59 (belső kontroll)*	(<5)	37	448	800
5035		(<5)	385	802	741
6156		(<5)	40	191	450
6511		(<5)	<5	887	617
6629		(<5)	144	941	576
		(<5)	53+39	64+170	624+63

III. táblázat (folytatás)

Állat száma	Adjuváns	Elővérvétel	1/2b	2/2	3/2
5031	MF79/1501	(<5)	3,277	4,456	8,766
6153		(<5)	125	870	5,189
6165		(<5)	96	1,173	1,204
6517		(<5)	784	3,830	10,706
6626		(<5)	40	4,009	4,113
		(<5)	262+209	2,338+810	4,747+1,823
5033	MF79/1501 + liposzómák	(<5)	598	7,381	10,633
6155		(<5)	869	5,878	8,683
6510		(<5)	846	10,517	14,995
6519		(<5)	279	6,354	13,079
6628		(<5)	235	6,945	1,845
		(<5)	492+136	7,258+729	8,039+3,041

a: mértani átlag+standard hiba

b: A vérvétel azonosítása: az immunizálások száma/hetek száma immunizálás után

*: 2×MF59=10% szkvalén (térfogat/térfogat); 0,4% Tween-80 (térfogat/térfogat); 1,6% Span 85 (térfogat/térfogat); 400 mg/ml MTP-PE

12. példa

A gD2 liposzómával való egyesülésének hatása a liposzóma/emulzió kombináció immunogenitására kecskékben

Ebben a kísérletben a kecskéket 3 alkalommal immunizáltuk 25 mikrogramm gD2-vel és 100 mikrogramm MTP-PE-vel, négyhetes időközönként, az alábbi adjuvánsok egyikével:

1. MF79/121 (10% szkvalén, 1% Tween-80, 5% Pluronic L121, 400 mikrogramm/ml MTP-PE); 2. MF79/121 LPC-vel (PC/PS (7:3) dialízisliposzómák)

kombinálva úgy, hogy a gD2 50%-a egyesült a liposzómákkal, 50%-a pedig szabadon maradt a keverék vi-
zes fázisában; 3. MF79/L121 LPC-vel kombinálva úgy, hogy a gD2 100%-a egyesült a liposzómákkal. Mint az 1. ábra mutatja, az antitesttiter növekedése korrelációban van az antigén liposzómákhoz való nagyobb mértékű kapcsolódásával. Az antitesttiter mértani átlaga 5 állatot tartalmazó csoportoknál az 5. táblázatban található. A megnövelt Ab-titer legalább 6 hétig fennmaradtak a negyedik immunizáció után.

IV. táblázat

A gD2 adjuváns vizsgálata kecskékben

Adjuváns	Elővérvétel	ELISA-titer a vérvételekre		
		1/2	2/2	3/2
2×MF59	<5	<5	144+85	837+169
2×MF59+lipozómák (PE/GS)	<5	<5	344+187	1440+842
MF79/1501+lipozómák (PE/GS)	<5	<5	1000+328	4653+616
Timsó	<5	<5	39+24	<5
MF79/1501+lipozómák (PC/PS)	<5	58+61	1980+416	6946+1503
Lipozómák (PE/GS)+exogén MTP	<5	<5	6+1	6+1

11. példa

gD2-t tartalmazó emulzió/lipozóma kombináció hatása az antitesttiterre kecskében

Ebben a kísérletben kecskéket immunizáltunk gD2-vel (25 mikrogramm), amelyet különféle emulziókkal, liposzóma/emulzió kombinációval és liposzómákkal önmagukban alkalmazott liposzómák csoportjában az MTP-PE-t exogén módon adtuk a liposzómákhoz. Az állatokat három alkalommal immunizáltuk háromhetes időközönként, az anti-gD2 antitesttiteret pedig minden immunizálás után 14 nappal határoztuk meg (az eredmények a 4. táblázatban találhatók).

tódtek meg a liposzómákban, és 50%-uk szabadon maradt az oldatban. Minden MTP-PE emulzió fázisban volt a liposzóma/emulzió kombinációkban. Az önmagukban alkalmazott liposzómák csoportjában az MTP-PE-t exogén módon adtuk a liposzómákhoz. Az állatokat három alkalommal immunizáltuk háromhetes időközönként, az anti-gD2 antitesttiteret pedig minden immunizálás után 14 nappal határoztuk meg (az eredmények a 4. táblázatban találhatók).

Az MF79/5% 1501 és PE/GS liposzómák (fuzogén LUV-ok) kombinációi sokkal magasabb anti-gD2 titeret adtak, mint az MF59 önmagában. A jelenlegi eredmények azt mutatják, hogy a PE/GS liposzómák kombi-

nációi 2×MF59-el nem adnak olyan jó eredményeket, mint a PE/GS liposzómák kombinációi MF79/5% 1501-gyel. A PE/GS liposzómák javítják a 2×MF59 teljesíthetőségét. A PE/GS liposzómák önmagukban rendkívül gyenge anti-gD2 antitestválaszt adnak. PC/PS

liposzómák MF79/5% 1501-gyel való kombinációja ugyanolyan jó eredményeket adott, mint a PE/GS liposzómák MF79/5% 1501-gyel alkotott kombinációja (az átlagos titer három immunizáció után 6946 volt 4653-mal szemben).

V. táblázat
gD2 adjuváns vizsgálata kecskéken

Állat száma	Adjuváns	Elő-vér-vétel	Vér-vétel 2/13 ^a	Vér-vétel 3/14 ^a	Vér-vétel 3/90	Vér-vétel 4/7	Vér-vétel 4/21	Vér-vétel 4/42
5	MF79/L121	<5	888±179	2,582±948	60±28	3,782±917	2,267±692	492±196
5	MF79/L121+	<5	1,418±391	6,884±1,274	115±51	6,229±1,544	7,987±1,250	1,241±345
5	MF79/L121+B liposzómák (100*)	<5	784±628	13,449±1,908	–	–	–	–
5	MF79/L121+B liposzómák (50/50*+MTP)	<5	945±609	4,563±2,563	–	–	–	–
5	C liposzómák (50/50*+MTP)	6±1	<5	9±2	19±5	<5	6±1	12±5
5	MF79/1501+A liposzómák (50/50*)	<5	2,068±268	7,864±1,253	–	–	–	–

a: mértani átlag+standard hiba

b: immunizálások száma/az immunizálás után eltelt napok száma; MTP-PE 100 mg/dózis mellett

c: gD2 antigén 25 mg/dózis mellett

*: gD2 és/vagy MTP beépülési aránya a liposzómákban

13. példa

A gB2 liposzómával való társulásának hatása a liposzóma/emulzió kombinációk immunogenitására kecskében

Ebben a kísérletben kecskéket immunizáltunk három alkalommal négyhetes időközönként 5, 25 vagy 100 mikrogramm gB2-vel és 100 mikrogramm MTP-PE-vel, valamint a következő adjuvánsok egyikével: 1. MF79/121, ahogy a 12. példában leírtuk; 2. MF79/121 LPE-vel (PE/GS/CHOL (8:2:2) FTF liposzómák) kom-

binálva úgy, hogy a gB2 50%-a egyesült a liposzómákkal és 50%-a szabadon maradt az oldatban; 3. MF79/L121 LPE-vel kombinálva úgy, hogy a gB2 100%-ban a liposzómákhoz kapcsolódott.

Az antigén liposzómákhoz való kötődésének hatását a 25 µg gB2 dóziscsoportra a 2. ábra mutatja. Az immunogenitás nő úgy, ahogyan az antigén társulása növekszik a liposzómákhoz. Az antitesttiter mértani átlaga+a standard hiba az egyes állatcsoportokra a VI. táblázatban látható.

VI. táblázat

Állat száma	Ag-egyesülé s száma ^b	Csoport-egyesülés száma	Adjuváns ^a	Elővér-vétel átlag	Vér-vétel átlag	Vér-vétel átlag	Vér-vétel átlag
1	–	5	MF79/L121-MTP (5 mg gB2)	<5	1,678±473	29,656±3,218	33,325±3,100
2	0	5	MF79/L121-MTP (25 mg gB2)	<5	434±129	18,609±3,962	44,846±5,203
3	–	5	MF79/L121-MTP (100 mg gB2)	<5	412±131	35,161±4,959	42,228±7,585
4	-	5	MF79/L121-MTP +(A) liposzómák (5 mg gB2)	<5	1,666±413	17,565±3,610	36,700±6,230
5	100	5	MF79/L121-MTP +(A) liposzómák (25 mg gB2)	<5	5,096–1,716	47,285±10,173	73,109±13,199

VI. táblázat (folytatás)

Állat száma	Ag-egyesülés száma ^b	Csoport-egyesülés száma	Adjuváns ^a	Elővérvétel átlag	Vérvétel átlag	Vérvétel átlag	Vérvétel átlag
6	–	5	MF79/L121-MTP +(A) liposzómák (100 mg gB2)	<5	1,289±422	38,544±6,263	59,493±13,706
7	50/50	5	MF79/L121-MTP +(B) liposzómák (25 mg gB2)	<5	1,733±844	32,835±12,628	39,746±14,871
8	–	5	+(C) liposzómák MTP* MF79/L121-MTP (25 mg gB2)	<5	152±85	12,022±3,825	25,163±3,044

* =az első emlékeztető oltás liposzómákkal a második és harmadik MF79/L121-gyel

a =minden MTP-PE dózis 100 mg/dózisnak értendő

b =az Ag egyesülést csak azokra a kompozíciókra mutatjuk ki, amelyek szerepelnek a 2. ábrán

0 =szabad gB2 a vizes fázisban

100 =az összes gB2 a liposzómákkal egyesült

50/50 =a gB2 50%-a egyesült liposzómákkal, 50%-a szabadon van a vizes fázisban

14. példa

A liposzóma/emulzió kombináció immunogenitása gp120 használata mellett rhesus majmokban

Ebben a kísérletben 3 rhesus majomból álló csoportokat immunizáltunk 3 alkalommal 4 hetes időközökben, valamint egy alkalommal 14 héttel a harmadik immunizálás után. Az állatoktól minden két hétben vért vettünk a kísérlet ideje alatt. Egy csoport kapott MF79/1501-t (10% szkvalén, 1% Tween–80, 1% Span 85, 400 mikrogramm/ml MTP-PE) gp120/SF2-t tartal-

mazó LPE FTF liposzómákkal kombinálva. A másik két csoport vagy 2×MF59-et (10% szkvalén, 1% Tween–80, 1% Span 85, 400 mikrogramm/ml MTP-PE) vagy SAF emulziót (10% szkvalén, 5% Pluronic L121, 0,4% Tween–80, 500 mikrogramm/ml MDP) kapott. A 3. ábra megmutatja, hogy az MF79/1501 a liposzómákkal együtt következetesen nagyobb titereket mutatott, mint a másik két emulziókiszerelés. A 7. táblázat felsorolja mind az egyes állatokra kapott titereket, mind az egyes csoportok átlagos titereit a kísérlet során.

VII. táblázat

Az egyedi antitesttiterek, a csoportonkénti átlagos titerek + a standard hiba

Immunizálás	Idő (hét)		Vérvétel	8428	8429	8430	grl X	qr1.0 +SE	8431
1	1	0	.0	1	1	1	1	0	1
2		2	.01	50	50	1	14	17	1
3	2	4	.02	70	50	50	56	6	50
4		6	.03	4300	5100	5600	4971	384	4900
5	3	8	.04	1500	1400	1800	1558	117	1600
6		10	.05	5218	4841	2925	4196	762	6746
7		12	.06	1442	1	649	714	365	1915
8	4	22	.07	117	75	109	100	14	142
9		24	.08	5574	6808	4093	5375	796	5397
10		26	.09	3335	3405	3368	3369	20	1768
	8 432	8 433	qr2 X	qp2.0 +SE	8 434	8 435	8 436	qp3 X	qp3.0 +SE
1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
2	89	1	60	11	50	50	82	59	9
3	70	50	56	6	50	50	105	64	15
4	10 200	3 900	5 798	1681	6200	3700	6 900	5409	1041

VII. táblázat (folytatás)

Immunizálás	8 432	8 433	qr2 X	qp2.0 + SE	8 434	8 435	8 436	qp3 X	qp3.0 + SE
5	4 300	1 200	2 021	781	2700	1100	2 300	1897	525
6	14 162	14 713	11 874	2843	5471	8869	14 790	4712	1956
7	3 880	4 263	3 164	800	1569	2156	3 014	2168	408
8	338	411	270	88	165	119	221	263	29
9	8 808	6 646	6 811	967	4372	3386	6 459	4573	859
10	4 683	2 503	2 747	783	2471	1475	4 886	2611	906

15. példa

Az MTP-PE liposzómmal vagy emulzióval való egyesítésének hatása a gD2 kombinációs kiserelések immunogenitására nyulakban

Nyulakat immunizáltunk három alkalommal négyhetes időközönként 10 µg gD2-vel és 100 mikrogramm MTP-PE-vel. A kísérlet eredményei a második immunizálás utáni második hétig a 4. ábrában, illetve a 8. táblázatban találhatók. A 2. és 3. csoport összehasonlítása, amint ez a 8. táblázatban is látható, azt mutatja, hogy az immunogenitás nőtt azáltal, hogy MF59 (5% szkvalén, 0,5% Tween-80, 0,5% Span 85, 400 mikrogramm/ml MTP-PE) emulziót LPE-vel előállított gD2-vel kombináltuk. Az MTP-PE (3. csoport), vagy liposzómák (4. csoport) emulzióba keverése nem okozott lényeges változásokat az immunogenitásban. A 6. csoportot egyszer immunizáltuk LPE-vel, majd két MF59 emlékeztető oltást adtunk. A 7. csoportban a sorrendet felcseréltük, az állatok először kaptak egy MF59 injekciót, majd két LPE immunizálást. Mint várható volt, az emulzióval való előkészítés, majd az ezt követő emlékeztető oltás liposzómmal immunogénebb hatást fejt ki, mint a fordított sorrend. A korábban leírt kecske-gB2-kísérlet (13. példa, 6. táblázat, 8. csoport) a bizonyíték rá, hogy gyenge eredményt kapunk, ha az állatokat először oltjuk liposzómmal, majd ezt követően adunk emlékeztető oltást emulzióval.

VIII. táblázat

Nyúl/gD2 – MTP-PE egyesülés

Csoport	Vérvéletel 1/2	Vérvéletel 2/2
1 – LPE MTP-PE-vel	468+191	12254+3517
2 – MF59	14 418+2698	20 0764+32 488
3 – MF59/LPE	20 859+4508	30 7828+75 470
4 – MF58/LPE MTP-PE-vel	15 241+1203	20 2640+5 8941

Csoport	Vérvéletel 1/2	Vérvéletel 2/2
5 – MF58/LPE	6 330+903	68 069+8 127
6 – 1×LPE MTP-PE-vel 2×MF59	1 140+160	72 001+3 741
7 – 1×MF59 2×LPE MTP-PE-vel	11 272+3 117	211 980+25 964

- 25 – a gD2-t 10 mikrogramm/dózisban alkalmaztuk
 – az MTP-PE-t 100 mikrogramm/dózisban alkalmaztuk, az 5. csoport nem kapott MTP-PE-t
 – egy csoportban 5 állat volt

30 16. példa

Az emulzió/liposzóma kombináció hatása az 1. malária-szérumra Aotus-majmokban

Aotus-majmokat immunizáltunk három alkalommal, négyhetes időközönként 100 mikrogramm 1. szérummal. 84 nappal az első immunizálás után vért vettünk az állatoktól és megfertőztük őket a Plasmodium falciparum Honduras törzsével. A majmokat ezután mind a betegség, mind a parazitémia szempontjából figyeltük.

A 84. napi antitesttiterek és a későbbi betegség elleni védelem a IX. táblázatban szerepelnek. Az 1. csoport csak Freund-féle adjuvánst kapott antigén nélkül. A 2. csoport Freund-féle adjuvánst és 1. szérumot kapott. A 3. és 4. csoport 1. szérumot és MF59-et (3. csoport), illetve MF59-et+LPE-t (4. csoport) kapott. A kombinált kiserelés az Ab-titerek ötszörös emelkedését mutatta az önmagában alkalmazott emulzióhoz képest. A három állat egyikét mindkét csoportban megvédtük a betegség ellen. Az 5. ábra mutatja a vonatkozó kumulatív parazitémiaértékeket. A parazitémiaértékek a kombinációs 4. csoport esetében csaknem tízszer alacsonyabbak voltak, mint a 3. csoport esetében, amely csak MF59-t kapott.

IX. táblázat

1. Panamaszérum vizsgálata Aotus-majmokban
Az 1. Aotus-szérum antiszérum ELISA titerei

	Elővérvétel	Vérvétel	Végső titer	Átlagos védelem
1. csoport		<10	92	
Kontroll CFA/IFA	<10 <10	88 81	87	0/3
2. csoport	<10	465,021		
Kontroll CFA/IFA	<10	909,318	719,333	2/3
1. szérum	19	783,661		
3. csoport	191	20,258		
1. szérum MF59.2	336	13,718	31,200	1/3
4. csoport	13	141,295		
1. szérum	24	254,074	169,266	1/3
Liposzóma/MF59.2	<10	112,430		

- Csoport száma: (1) Kontroll FCA/FIA
(2) 1. szérum FCA/FIA
(3) 1. szérum MF59.2
(4) 1. szérum fuzogén liposzómák/MF59.2

17. példa

Az emulzió/liposzóma kombinációk immunogenitása
egér influenzafertőzés modellben

Ezt a kísérletet azon célból végeztük, hogy adjuváns kiserelések hatékonyságát vizsgáljuk heterológ vírusos fertőzés esetében. Az egereket két alkalommal immunizáltuk négyhetes időközzel 9 µg HA antigénnel és 40 mikrogramm MTP-PE-vel. Az állatok csoportjai a 10. táblázatban láthatók. Az 1. csoport HA-t kapott adjuváns nélkül. A 2. csoport MF59-et kapott. A 3. csoportot egyszer immunizáltuk MF77-tel (10% szkvalén, 5% Pluronic L121, 1% Tween-80, 400 mikrogramm/ml MTP-PE), majd másodszor MF59-cel. A 4. csoportot először egy kombinációs kisereléssel immunizáltuk, amely MF77-et tartalmazott, MTP-PE-t és LPE+MTP-PE-t viszont nem. Ezt követte a második immunizálás MF58-cal és LPE+MTP-PE-el. Az 5. csoport LPE+MTP-PE-t kapott. A 6. csoportot nem immunizáltuk. A 10. táblázat szerinti antitesttiterek az 55. napra vonatkoznak, amely a vírusfertőzés előtti nap volt. A legmagasabb titereket a 4. csoportban kaptuk a kombinációs kisereléssel. A 6. ábra mutatja be a relatív Ab-titerek az összes csoportra. Az 56. napon az egereket intranazálisan influenza A/Hong Kong/13/68 (H1N1)-gyel fertőztük. Az állatokat naponta vizsgáltuk a betegségre, a napi túlélések számát a 11. táblázat mutatja. A túlélés százalékát a fertőzés után 14 nappal a 6. ábra alsó része

mutatja. A kombinációs kisereléssel beoltott egyedeknél 100%-os volt a túlélés, az ezt követő legjobb csoport az MF77-el beoltott volt, 90%-os túléléssel. A HA vakcinát adjuváns nélkül kapott csoportnál 40%-os, míg a nem immunizált csoportnál 30%-os volt a túlélés.

X. táblázat
Egér/influenza

Csoport	HA A/Shanghai
1 – csak HA	259+60
2 – MF59	7 822+514
3 – 1×MF77 1×MF59	28 749+3 778
4 – 1×MF77 MTP-PE nélkül +LPE+MTP-PE 1× MF58+LPE+MTP-PE	44 257+5 234
5 – LPE+MTP-PE	1 579+184
6 – immunizálás nélkül	<5

n=10

MTP-PE dózis=40 µg

HA=9 µf Parke/Davis influenzavakcina, amely 30 µg-ot tartalmaz az összes alábbi összetevőből: A/Taiwan/1/86, A/Shanghai/11/87, és B/Yamagata/16/88

XI. táblázat
Taiwan-immunizálás
Hong Kong-fertőzés

	Csoport	Nap	Az életben maradt állatok száma csoportonként naponta												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	HA önmagában	10	10	10	10	10	9	7	5	5	4	4	4	4	4
2.	MF59.1	10	10	10	10	10	10	9	7	6	4	4	4	4	4
3.	MF77.1/MF59	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9
4.	MF77.1+lipo- szómák MF59+lipo- szómák	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5.	liposzmák	10	10	10	10	10	10	10	8	7	7	7	6	6	6
	0	10	10	10	10	10	10	8	3	3	3	3	3	3	3

18. példa

A liposzóma/emulzió kombinációk stabilitása

Annak érdekében, hogy felbecsüljük egy emulzió-részecskékből és liposzmákból álló elegy fizikai stabilitását, FITC-dextránt tartalmazó PE/GS (8:2)/MTP-PE (PL/MTP-PE, 20:1) dialízisliposzmákat készítettünk. A külső FITC-dextránt gélfiltrációval eltávolítottuk, a liposzmákat pedig MF79/1501-el (10% szkvalén/1% Tween-80/5% Tetronic 1501/400 mikrogramm/ml MTP-PE) összekevertük. Fénymikroszkópos megfigyelések azt mutatták, hogy nem történt aggregáció vagy egyesülés az emulziórészecskék vagy a liposzmák között. A liposzmák szerkezeti sértetlenségét bizonyították azok a fluoreszcens gömbök, amelyeket sötét háttér előtt figyeltünk meg. Háromhónapos, 4 °C-on való tárolás nem okozott változást a liposzmák megjelenésében.

19. példa

A liposzmák és emulziók tárolása

Azért, hogy az antigéneket (amelyek felületi adszorpció útján, vagy a kettős rétegbe való integrálódás alapján ágyazódtak be, épültek be) tartalmazó liposzmákat és a velük kombinált emulziókat használható gyógyszerészeti készítményekké tegyük, stabil tárolási feltételeket és tárolási formákat alakítottunk ki. Három különböző kiserelési formát terveztünk az adjuvánsok és az antigének stabilitásának növelése érdekében: 1. Folyékony liposzóma szuszpenzió-emulzió kombináció két ampullában vagy egy ampullában, amely 2–8 °C-on tárolható. 2. Fagyasztott liposzmák – emulzió-kombinációk két különböző ampullában, illetve egy ampullában, amely 5–10 °C-on tárolható. 3. Liofilizált liposzmák-emulzió két külön ampullában vagy egy ampullában, amely 2–8 °C-on, vagy szobahőmérsékleten tárolható.

Enyhén savas pH-t ($>5,0 = <7,0$, előnyösen 6,5) választottunk a fenti kiserelésekben való alkalmazásra, hogy ezáltal javítsuk a lipidkomponensek és a fehérje-antigének stabilitását. A krioprotektánsokat (lioofilizá-

lás és fagyasztás céljaira) a következő cukrok vagy polihidroxivegyületek és aminosavak közül lehet kiválasztani: glükóz, mannit, szorbit, laktóz, trehalóz, glicerin, dextrán, maltóz, maltodextrinek, glicin, alanin, prolin, arginin és lizin. Néhány kiserelésben a cukrok és aminosavak kombinációja használatos, például szacharóz-mannit (szacharóz 5–8% w/v, mannit 2,5–1% tömeg/térfogat); szacharóz-glicin (szacharóz 8% tömeg/térfogat, glicin 60 mM). Ezek a kötőanyagok tonizálóként is szerepelnek, vagyis fiziológiás ozmolaritást nyújtanak. A pufferek lehetnek foszfátot (5–50 mM); citrátot; foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldatot (PBS); acetátot; maleátot; aszkorbátot; trometamint tartalmazó pufferek, hasonló pufferek.

Liposzmák esetében a krioprotektánsok és pufferek vagy a) a vizes külső és belső közegben vannak jelen, vagy b) csak külsőleg vannak az oldathoz adva. Az utóbbi esetben minden puffer és só (például NaCl) ozmotikus egyensúlyban van a liposzmák belső közegével, és a külső közegben lévő só ismételt centrifugálással és mosással távolítjuk el. A liposzmákat ezután szuszpendáljuk a találmány szerinti kötőkeverékben. Az emulziókat jellemzően vízben készítjük el, és a fent tárgyalt közegben szuszpendáljuk. A cukor/aminosav/puffer kombinációkhoz viszkozitásnövelőket is adunk.

Általánosan elfogadott, hogy ezek a polimer anyagok körülveszik a részecskéket és megelőzik a részecskék érintkezését, amely egyébként kapcsolódást, egyesülést, vagy vegyülést eredményezhetne. A használt polimerek a polietilén-glikol 300, 400, 1450 és 1350; a poli(vinil-pirrolidon); a dextrán-szulfát; a karboxi-metil-cellulóz; a hidroxietil-cellulóz és az alginsav. Előnyös a polietilén-glikol 1450 használata 1% (tömeg/térfogat) koncentrációban (a jellemző alapanyagok listája a 12. táblázatban található).

A fent felsorolt kötőanyagokon kívül a liposzmák szintén optimálisan tartalmaznak 1 mólszázalék E-vitamint vagy d1 α -tokoferolt, mint antioxidánst. Ez védi a felületaktív anyagok telített zsírsavgyökeit az oxidációtól, amelyek katalizálhatnák az antigéndegradálódást.

Az így kialakított liposzómákat különböző arányokban keverjük emulziókkal, 1:10-től 10:1-ig (térfogat/térfogat), ahogy ezt korábban írtuk, bár kényelem szempontjából 1:1 (térfogat/térfogat) arány a legmegfelelőbb. Ez a keverék elegendő antigént és immunstimulálót tartalmaz gyógyászati dózisban.

Sok egyéb technológia használható a kívánt kompozíció elkészítéséhez. Így például Gauthier és Levinson (EP0211257) fagyasztva szárítottak egy foszfolipid-emulziót kétlépcsős eljárásban: az első lépés permet-fagyasztásból állt, aminek során egy előre kialakított emulziót permeteztünk ki valamilyen klór-fluor-szénhidrogénbe vagy más kompatibilis oldószerbe -20°C -on, majd a megfagyott részecskéket (amelyek már tartalmazták a krioprotektánsokat) összegyűjtöttük, végül liofilizáltuk a részecskéket. Az eredményképpen kapott port vagy masszát, amely nagy főlöslegben tartalmazott cukrokat, ismét hidratáltuk, hogy „olaj a vízben” emulziót alakítsunk ki 0,48–0,7 mikron méretű részecskékkel. Ez a módszer hosszadalmas, és nagy cseppméretű emulziót eredményez, amely esetleg nem használható bizonyos gyógyászati alkalmazásoknál, ahol az elvárások azt kívánják, hogy a részecskék a befecskendezés helyén leülepedjenek, majd lassan a nyirokrendszerbe vagy a test más alkalmas helyére kerüljenek. Így a jelen találmány egyik szempontja, hogy kis-méretű, szubmikronos ($<0,4$ mikron) liposzómákat és emulziórészecskéket kapjunk olyan közegben, amelynek tárolása kedvező, ami azt jelenti, hogy a részecskeméret fennmarad és később sem növekszik a tárolás alatt. A találmány másik szempontja, hogy liofilizált liposzóma/emulzió kombinációkat állítsunk elő, amelyek könnyen átalakíthatók $<0,4$ mikron átmérőjű részecskékké, és így módon vakcinaként felhasználhatók legyenek.

A következők példán keresztül illusztrálják az antigént tartalmazó olyan liposzóma/emulzió kombinációk különféle kiszerezési formáit, amelyek vakcinaként felhasználhatók arra, hogy az állatoknak nagyobb immunitást nyújtsanak a korábban tárgyalt módon.

1. Folyékony, antigénhordozó liposzóma/emulzió kombináció

Liposzómákat szacharóz-citrátban [10% tömeg/térfogat, 10 mM] vagy az e fejezetben tárgyalt kötőanyagok bármely más kombinációjában vegyítünk az antigénnel. A nem kötődött fehérjéket erre alkalmas technológiával – úgymint dialízis, diafiltráció vagy centrifugálás (előnyösen centrifugálás) – távolítjuk el. A liposzómákat a bennük található kötőanyaggal meg-egyező kötőanyagot – az antigént kivéve – tartalmazó közegben szuszpendáljuk. A liposzóma egy másik csoportjánál (bár ez nem előnyös eljárás) a vezikulumokat fiziológiás konyhasóoldatban (0,9% tömeg/térfogat) vagy PBS-ben készítjük el az antigénnel együtt, majd a nem kötődött fehérjék kimosása után a liposzómákat egy krioprotektáns/viszkózitásnövelő és pufferhatású közegben szuszpendáljuk, amely lehet például szacharóz, PEG 1450 vagy citrát. Az emulziókat, amelyeket jellemzően vízben való homogenizálással készítünk, a fiziológiás ozmolalitási szintre hozzuk a kötő-

anyag-kombinációk segítségével, hogy a liposzómákhoz illeszkedjenek. A vezikulumok és az emulziók egyenlő mennyiségeit egyesítjük és $2-8^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű hűtőben tároljuk. A különböző időpontokban végzett analízis nem mutatta a liposzóma mennyiségének csökkenését, illetve a két alkotóelem (a liposzóma és az emulzió) méretének csökkenését.

2. Fagyasztott antigénhordozó liposzóma/emulzió kombinációk

10 Liposzómákat állítunk elő (fuzogén vagy más) szacharózt (8% tömeg/térfogat)/mannitot (1% tömeg/térfogat)-t, és foszfát 10mM/PEG 1450-et (1% tömeg/térfogat) tartalmazó oldatban, amely tartalmazza a fehérjeantigént is, majd polikarbonátszűrőn szűrjük keresztül, hogy az átlagos részecskeméretet 0,1–0,4 mikronra csökkentsük. A főlöslegben lévő antigént centrifugálással eltávolítjuk, majd az üledékbe vitt vezikulumokat újra szuszpendáljuk ugyanabban a puffer-kötőanyag keverékben. A liposzómákat ezután a mikrofluidizált emulziókkal ($<0,4$ mikron) egyesítjük és megfagyasztjuk hűtőben -10°C hőmérsékleten. Az egy éjszakán keresztül történt tárolás után a keveréket lassan olvadni hagyjuk, míg a szobahőmérsékletet el nem éri. Egy másik eljárás szerint a liposzómákat és az emulziókat elkülönítve fagyasztjuk, olvasztjuk, majd összekeverjük; illetve a liposzómákat $2-8^{\circ}\text{C}$ -on elegyítjük a fagyasztással és felengedéssel kezelt emulziókkal, az egyesítést csak az állatok kezelését megelőzően végezve. Mindkét szilárd alkotórész megtartja fizikai elkülönültségét a fagyasztási-olvasztási ciklus alatt. Ezekről elvárható, hogy humán célú felhasználáshoz kényelmesen tárolhatók lesznek egy- vagy kétampullás kiszerezésben. Úgy találtuk, hogy bizonyos egyedüli krioprotektánsként alkalmazott meghatározott szacharidok (például mannit, laktóz) nem segítik a liposzóma és az emulziók fizikai szerkezetének fennmaradását. Ugyanakkor az olyan krioprotektánsok, mint a glicerol (2–20% tömeg/térfogat, előnyösen 2%), prolin (0,3M), arginin (0,3M), szacharóz-mannit (szacharóz 8% tömeg/térfogat, mannit 1% tömeg/térfogat), szacharóz-glicin vagy arginin (szacharóz 8% tömeg/térfogat, glicin vagy arginin 60mM), illetve aminosavak keveréke (prolin, glicin, alanin; egyenként 100mM) mind kel-
45 lő krioprotektáns hatást fejtenek ki a fagyasztási-felengedtetési eljárás során, ami az oltóanyag-kiszerezésekben való lehetséges alkalmazhatóságukat támasztja alá. Az antigént és kötőanyagokat (például PBS, fiziológiás konyhasóoldat vagy foszfát) belső közegükben, valamint krioprotektáns/puffer/(viszkózitásnövelő) ele-
50 gyet külső közegükben tartalmazó liposzóma szintén elegyíthetők az emulziókkal ugyanezen krioprotektáns-kombinációban a találmány szerinti eljárásban.

3. Liofilizált, antigénhordozó liposzóma/antigén kombinációk

55 Mint stabil tárolási forma ez a kombináció igen előnyös, mivel a felesleges vizet, amely a fehérjék és lipidek kémiai instabilitását okozhatja, eltávolítjuk belőle. Ezenfelül a szénhidrátok és az aminosavak, amelyek általában használt krioprotektánsok, jó táptalajt nyújtanak a mikrobák elszaporodásának. A következők jól

bemutatják ezt a liofilizálási eljárást, amellyel szárított oltóanyag-kiszerezések készíthetők.

Az antigént hordozó liposzómákat, amelyeket megfelelő, a XII. táblázat szerinti krioprotektáns/puffer/(viszkozitásnövelő) kombinációkban szuszpendálunk, mikrofluidizált emulziókkal egyesítjük azonos közegekben, majd fagyasztva szárítjuk 24–72 (előnyösen 24) órán keresztül olyan hőmérsékleten, amely az adott kötőanyag-kombinációban az összetapadt részecskék szétesési hőmérséklete alatt van. Egy kiviteli módban például, amely szacharózt (10% tömeg/térfogat) és citrátot (10 mM) tartalmaz, a primer szárítást –40 °C-on indítjuk be, majd a hőmérsékletet fokozatosan –10 °C-ig emeljük erős vákuum mellett (10–100 mikron, előnyösen 50 mikron). A primer szárítás befejezése után a szárítópalc hőmérsékletét fokozatosan (10–20 °C/óra) szobahőmérsékletre emeljük, és ezen a hőmérsékleten és vákuumon hagyjuk további 2–10 órán (előnyösen 4 órán) keresztül, illetve addig, amíg a szárított termék nedvességtartalma 1–3%-ig le nem csökken. E kiszerezés egy másik változata, amelyben a liposzómákat és az emulziót külön szárítjuk, majd a helyreállított szuszpenziókat elegyítjük a kívánt kiszerezés elkészítése végett. Mindkét esetben a liofilizált masszák elfogadható fizikai állapotban vannak és könnyen helyreállíthatók, hogy injektálható oltóanyag-kiszerezés legyen belőlük.

A liofilizált egy- vagy kétampullás változatok stabilitása az alacsony víztartalomnál fogva elfogadható a lipidkomponensek és a fehérjeantigének szempontjából. A kiszerezések 2–8 °C-on vagy szobahőmérsékleten tárolhatók.

XII. táblázat

A kiszerezésekben használt krioprotektánsok és viszkozitásnövelők kombinációi*

szacharóz* (10% tömeg/térfogat)
szacharóz (8% tömeg/térfogat), mannit (1% tömeg/térfogat)
dextróz (5% tömeg/térfogat)
szacharóz (9% tömeg/térfogat), PEG 400, 1450 vagy 3350 (1% tömeg/térfogat)
szacharóz (9% tömeg/térfogat), hidrolizált zselatin (hal-, szarvasmarha- vagy sertésbőr 1% tömeg/térfogat)
szacharóz (9% tömeg/térfogat), Povidone 10 000 vagy 40 000 (1% tömeg/térfogat)
glicin, alanin vagy prolin (0,3 M, pH 6–6,5)
szacharóz 9% (tömeg/térfogat), karboximetil-cellulóz (1% tömeg/térfogat)
glicerol (2–20% tömeg/térfogat)

* Ezenfelül foszfát- vagy citrátpuffer is használatos 10 mM koncentrációban az antigénstabilitás biztosítása érdekében.

* Más cukrok, mint a laktóz, trehalóz, maltóz stb. is használhatók megfelelő tömegben, amelyek azonos fiziológiás ozmolalitást biztosítanak.

Minden, a szabadalmi leírásban idézett publikáció és szabadalmi leírás referenciaként épül be a jelen leírásba. Ezek a publikációk vagy szabadalmi leírások

speciálisan azon helyen tekinthetők referenciának, ahol idéztük azokat.

Bár a találmányt néhány részletében már leírtuk illesztésként és példák bemutatása végett, a megértés és tisztázás céljából, a szakterületen átlagosan képzett szakemberek számára is világos a leírás fényében, hogy bizonyos változtatások és módosítások végezhetők anélkül, hogy eltérnénk a találmány szellemétől vagy kilépjünk a találmány oltalmi köréből.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás oltóanyag-kompozíció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(1) immunstimuláló mennyiségű antigénanyagot, amely anionos és/vagy semleges lipidekből származó liposzómákban vagy azok felszínén helyezkedik el; és

(2) egy, kombinálás után a liposzómákat folyamatos fázisban körülvevő, metabolizálható olajat tartalmazó „olaj a vízben” emulziót kombinálunk, ahol az emulziót az antigénanyag és liposzómák potenciálózó mennyiségében alkalmazzuk,

ahol az antigénanyagot 1–500 mg/ml koncentrációban, és a liposzómákat és az emulziót 1:10 és 10:1 közötti térfogatarányban alkalmazzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fuzogén liposzómákat is tartalmazó liposzómákat alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eljárás során a liposzómák és az emulzió olajrétegei azonos mérettartományba esnek.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a részecskék átmérője 1 mikronnál kisebb.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az „olaj a vízben” emulzió immunstimuláló mennyiségű muramil-peptidet tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az „olaj a vízben” emulzió (I) általános képletű muramil-peptidet tartalmaz, ahol a képletben R jelentése hidrogénatom vagy COCH₃ csoport, R¹, R² és R³ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy lipidgyök,

R⁴ jelentése hidrogénatom vagy alkilcsoport,

X és Z jelentése egymástól függetlenül aminoacilgyökök, amely alanil-, valil-, leucil-, izoleucil-, alfa-amino-butiril-, treonil-, metionil-, ciszteinitil-, glutaminil-, izoglutaminil-, aszparagil-, fenil-alanil-, tirozil-triptofenil-, lizil-, ornitinil-, arginil-, hisztidil-, aszparaginil-, prolin-, hidroxipropil-, szeril- vagy glicilgyökök lehet,

n jelentése 0 vagy 1,

Y jelentése –NHCHR₅CH₂CH₂CO– általános képletű csoport, ahol

R⁵ jelentése egy, kívánt esetben észterezett vagy amidált karboxilcsoport, és

L jelentése OH– csoport vagy NR⁶R⁷ általános képletű csoport, ahol

R⁶ és R⁷ egymástól függetlenül hidrogénatomot, kis szénatomos alkilcsoportot vagy lipidgyököt jelent.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy muramil-peptidként muramil-dipeptidet vagy muramil-tripeptidet alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy muramil-peptidként olyan muramil-dipeptidet és -tripeptidet alkalmazunk, amely foszfolipidgyökhöz van kapcsolva egy hidrox-alkil-amin részen keresztül.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy muramil-peptidként N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-/hidroxil-foszforil-oxi/)-etilamidot alkalmazunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olajként állati olajat alkalmazunk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olajként szkvalént alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keverés során egy további emulgeálószer is alkalmazunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kompozíció összes mennyiségére számított, legfeljebb 15 térfogatszázalék olajat alkalmazunk.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy emulgeálószerként valamely szorbitán észtert,

polioxi-etilén szorbitán mono-, di- vagy triésztert valamely polioxi-etilén zsírsavat, polioxi-etilén zsírsavét vagy ezek kombinációit alkalmazzuk.

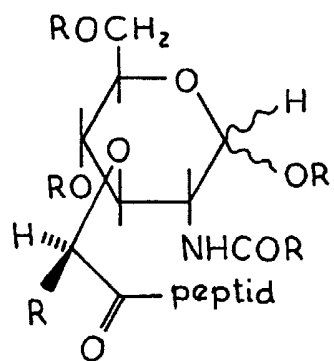
15. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy emulgeálószerként polioxi-etilén szorbitán 20 monooleátot, Span 85 szorbitán trioleátot vagy ezek kombinációit alkalmazzuk.

16. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legfeljebb 2,5 tömegszázalék emulgeálószer alkalmazunk.

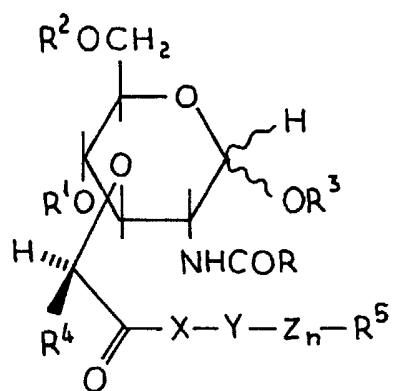
17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigénanyagként egy vírusrészecskét vagy -alegységet alkalmazunk.

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigénanyagként vírusmolekuláris antigént alkalmazunk.

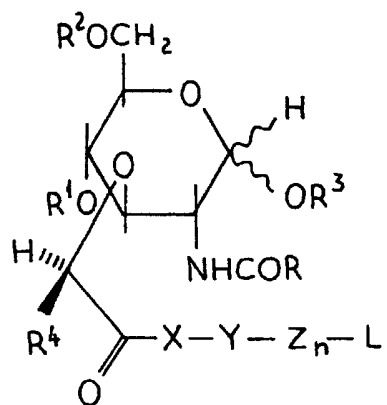
19. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigénanyagként genetikai manipulációs technikával előállított fehérjét, így HSV rgD2, HIV gp120, HIV RT6, HSV gB2, HCV proteinek, 1. maláriaszérumot és/vagy influenza-oltóanyag antigént alkalmazunk.



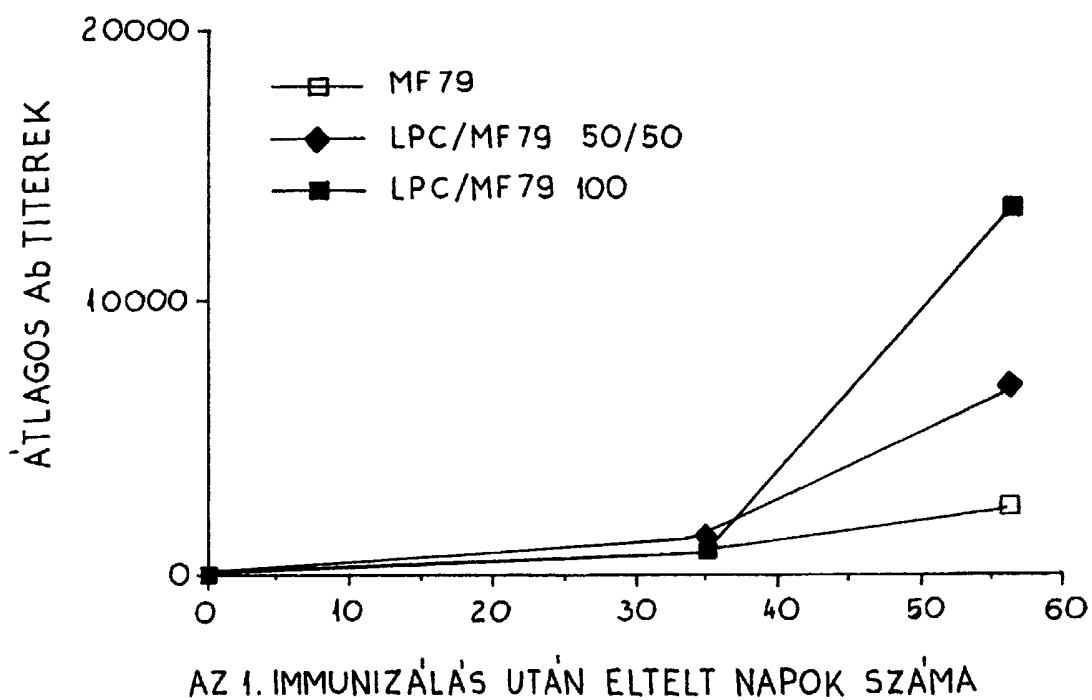
(I)



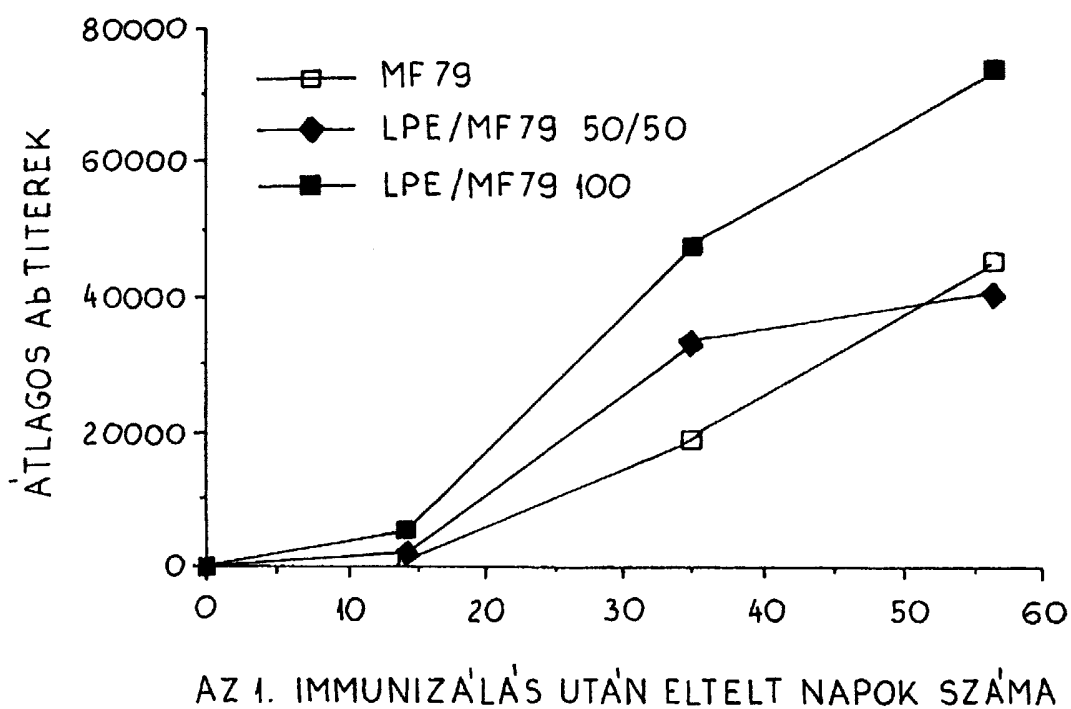
(II)



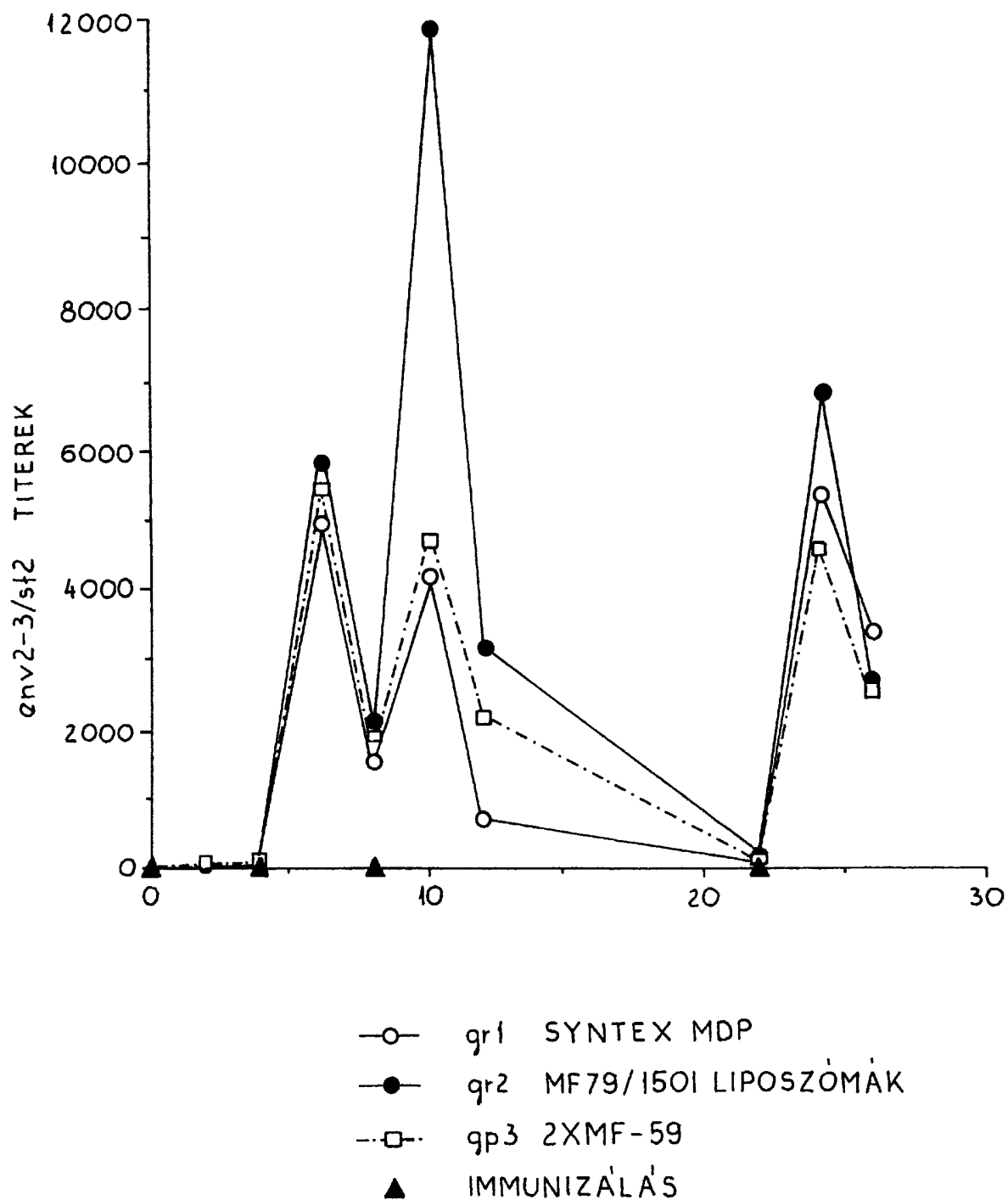
(III)



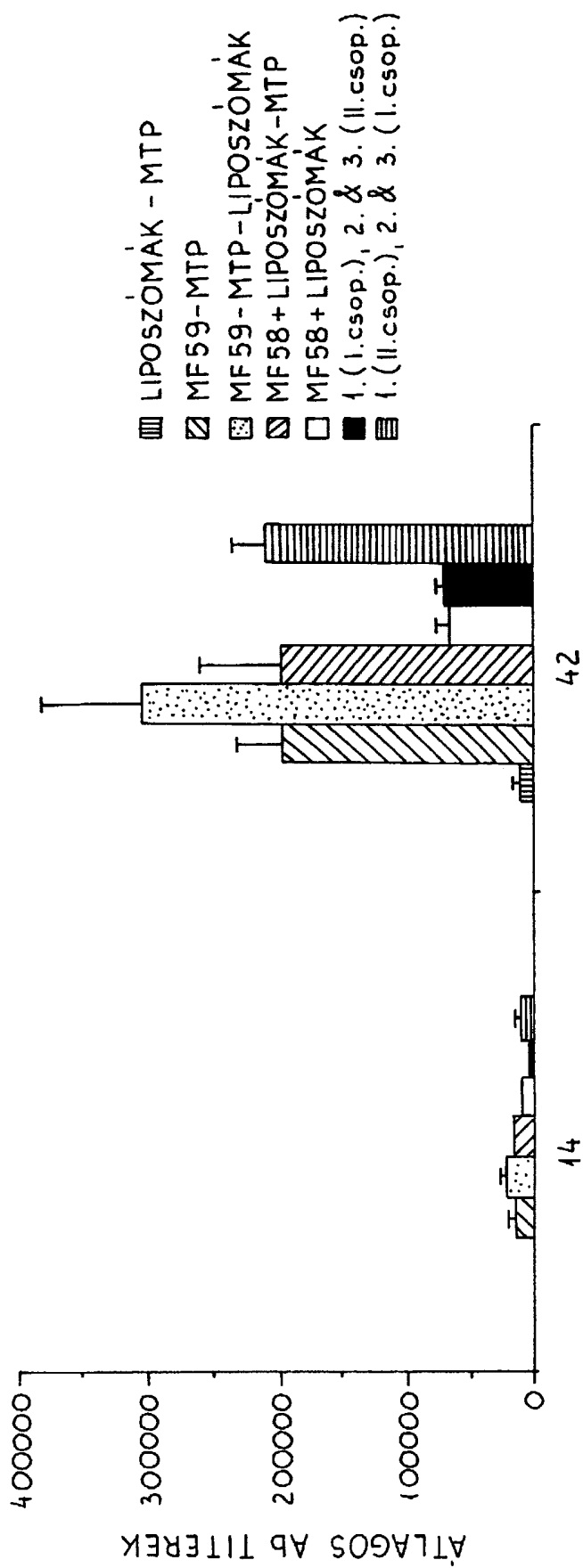
1. ÁBRA



2. ÁBRA

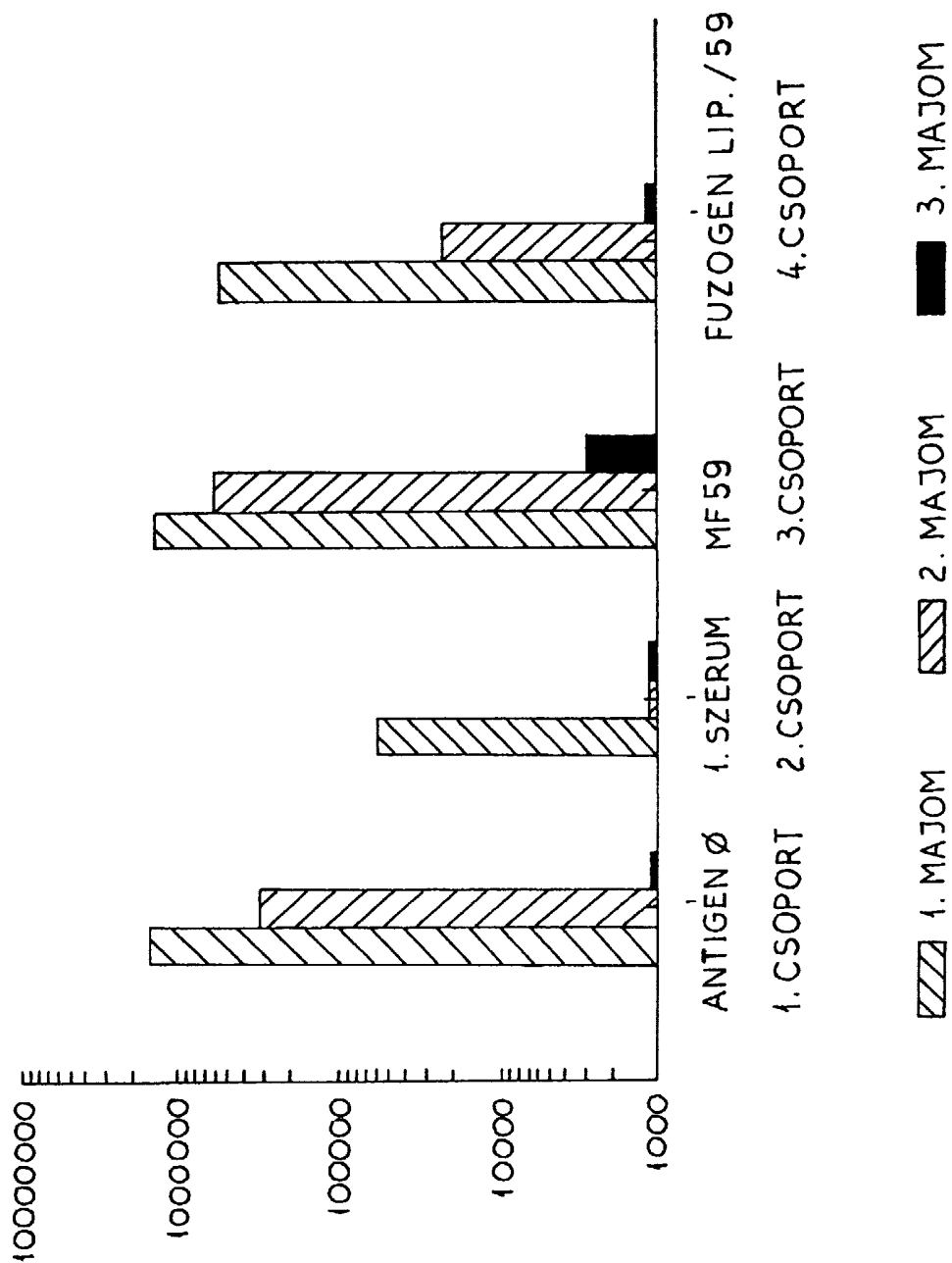


3. ÁBRA



AZ 1. INJEKCIÓ UTÁN ELTELT NAPOK SZÁMA

4. ÁBRA



5. ÁBRA