ÖZET

RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

Buluş, bir bebeğin, hamileliği sırasında annesine bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını takiben doğduktan sonra bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması suretiyle respiratuar sinsitiyal virüse (RSV) karşı korunduğu bir immünizasyon rejimi ile ilgilidir.

ÖZET

RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

Buluş, bir bebeğin, hamileliği sırasında annesine bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını takiben doğduktan sonra bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması suretiyle respiratuar sinsitiyal virüse (RSV) karşı korunduğu bir immünizasyon rejimi ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamaya veya RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korumaya yönelik bir yöntemde kullanılmak için bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) immün yanıtı indükleme kompozisyonu olup, burada yöntem, 4 aylık veya daha küçük bebeğe, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar ki burada adı geçen bebeği doğuran kadına, adı geçen kadının adı geçen bebeğe hamile olduğu sırada bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmıştır; buradaki bir veya daha fazla RSV antijeni, bir RSV F glikoproteini içerir.

2. İstem 1'e göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir prime veya bir boost'tur.

3. İstem 1 ila 2'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, hamileliğin ikinci veya üçüncü trimesteri sırasında uygulanmıştır.

4. İstem 1 ila 3'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulama, doğumdan hemen sonra, doğumdan 2 hafta sonra, doğumdan 4 hafta sonra, doğumdan 6 hafta sonra, doğumdan 2 ay sonra, doğumdan 3 ay sonra ve doğumdan 4 ay

İSTEMLER

1. Bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamaya veya RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korumaya yönelik bir yöntemde kullanılmak için bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) immün yanıtı indükleme kompozisyonu olup, burada yöntem, 4 aylık veya daha küçük bebeğe, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar ki burada adı geçen bebeği doğuran kadına, adı geçen kadının adı geçen bebeğe hamile olduğu sırada bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmıştır; buradaki bir veya daha fazla RSV antijeni, bir RSV F glikoproteini içerir.

2. İstem 1'e göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir prime veya bir boost'tur.

3. İstem 1 ila 2'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, hamileliğin ikinci veya üçüncü trimesteri sırasında uygulanmıştır.

4. İstem 1 ila 3'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulama, doğumdan hemen sonra, doğumdan 2 hafta sonra, doğumdan 4 hafta sonra, doğumdan 6 hafta sonra, doğumdan 2 ay sonra, doğumdan 3 ay sonra ve doğumdan 4 ay

sonranın oluşturduğu gruptan seçilen bir veya daha fazla zamanda yapılır.

5. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynıdır.

6. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı değildir.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü (VRP) içerir.

8. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit içerir.

9. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu içerir.

sonranın oluşturduğu gruptan seçilen bir veya daha fazla zamanda yapılır.

5. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynıdır.

6. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı değildir.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü (VRP) içerir.

8. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada adı geçen bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit içerir.

9. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu içerir.

10. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir viral replikon partikülü içerir.

11. İstem 7 veya 9'a göre kullanım için kompozisyon olup, burada RSV alt birim kompozisyonu: (a) bir RSV F proteininin furin klivaj sahalarından birinde veya her ikisinde de klivajı engelleyen bir veya daha fazla mutasyon; ve/veya (b) bir RSV proteininin füzyon peptidi bölgesinde bir veya daha fazla mutasyon içerir.

12. İstem 7 veya 8'e göre kullanım için kompozisyon olup, burada nükleik asit: (a) DNA; veya (b) RNA içerir.

13. İstem 12'ye göre kullanım için kompozisyon olup, burada RNA, kendi kendini kopyalayan RNA'dır.

14. İstem 7 veya 9'a göre kullanım için kompozisyon olup, burada viral replikon partikülü, bir alfavirüsü VRP'si içerir.

10. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanım için kompozisyon olup, burada bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir viral replikon partikülü içerir.

11. İstem 7 veya 9'a göre kullanım için kompozisyon olup, burada RSV alt birim kompozisyonu: (a) bir RSV F proteininin furin klivaj sahalarından birinde veya her ikisinde de klivajı engelleyen bir veya daha fazla mutasyon; ve/veya (b) bir RSV proteininin füzyon peptidi bölgesinde bir veya daha fazla mutasyon içerir.

12. İstem 7 veya 8'e göre kullanım için kompozisyon olup, burada nükleik asit: (a) DNA; veya (b) RNA içerir.

13. İstem 12'ye göre kullanım için kompozisyon olup, burada RNA, kendi kendini kopyalayan RNA'dır.

14. İstem 7 veya 9'a göre kullanım için kompozisyon olup, burada viral replikon partikülü, bir alfavirüsü VRP'si içerir.

25423

TARİFNAME

RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

İLGİLİ BAŞVURULAR

Bu başvuru, 26 Ocak 2011 tarihinde dosyalanan ABD Patent Başvurusu No. 61/436,355'ten fayda isteminde bulunur.

SEKANS LİSTESİ

Mevcut başvuru, EFS-Web yoluyla ASCII formatında arz edilmiş olan bir Sekans Listesi ihtiva eder. 25 Ocak 2012 tarihinde yaratılmış adı geçen ASCII kopyasına, 85448116.txt adı verilir ve büyüklüğü 15,682 bayttır.

ARKA PLAN

Respiratuar sinsitiyal virüs (RSV), *Pneumovirus* cinsi *Paramyxoviridae* familyasından bir zarflı segmentli olmayan negatif iplikçikli RNA virüsüdür. Yaşamlarının ilk yılında olan çocuklar arasındaki bronkiyolit ve pnömoninin en yaygın nedenidir. RSV ayrıca herhangi bir yaşta, özellikle kardiyak, pulmoner veya immün sistemleri risk altında bulunanlar arasında meydana gelebilen şiddetli alt solunum yolu hastalıkları dahil olmak üzere tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olur.

25423

TARİFNAME

RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

İLGİLİ BAŞVURULAR

Bu başvuru, 26 Ocak 2011 tarihinde dosyalanan ABD Patent Başvurusu No. 61/436,355'ten fayda isteminde bulunur.

SEKANS LİSTESİ

Mevcut başvuru, EFS-Web yoluyla ASCII formatında arz edilmiş olan bir Sekans Listesi ihtiva eder. 25 Ocak 2012 tarihinde yaratılmış adı geçen ASCII kopyasına, 85448116.txt adı verilir ve büyüklüğü 15,682 bayttır.

ARKA PLAN

Respiratuar sinsitiyal virüs (RSV), *Pneumovirus* cinsi *Paramyxoviridae* familyasından bir zarflı segmentli olmayan negatif iplikçikli RNA virüsüdür. Yaşamlarının ilk yılında olan çocuklar arasındaki bronkiyolit ve pnömoninin en yaygın nedenidir. RSV ayrıca herhangi bir yaşta, özellikle kardiyak, pulmoner veya immün sistemleri risk altında bulunanlar arasında meydana gelebilen şiddetli alt solunum yolu hastalıkları dahil olmak üzere tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olur.

RSV gibi paramiksovirüsler, influenza virüsü ve HIV gibi diğer zarflı virüslere benzer şekilde, bir konakçı hücreyi enfekte etmek için viral membranın ilgili konakçı hücrenin membranıyla füzyonlanmasına ihtiyaç duyarlar. RSV durumunda konzerve füzyon proteini (RSV F), viral ve hücresel membranları, geri döndürülemez protein tekrar katlanmasını membranların yan yana konulması ile birleştirmek suretiyle füzyonla birleştirir. Paramiksovirüs çalışmalarına dayanan günümüz yöntemlerinde, RSV F proteini ilk başta bir yarı-kararlı "füzyon öncesi" konformasyon halinde katlanır. Bu füzyon öncesi konformasyon, tekrar katlanmaya ve kararlı "füzyon sonrası" konformasyonu için konformasyonel değişikliklere girer.

RSV F proteini, mRNA'dan F_0 olarak adlandırılan yaklaşık 574 amino asitli bir proteine traslate edilir. F_0 proteininin translasyon sonrası işlemleri, endoplazmik retikulumdaki bir sinyal peptidazı tarafından bir N-terminal sinyal peptidinin çıkarılmasını kapsar. Fo, trans-Golgi'deki hücresel proteazlar (özellikle furin) tarafından iki sahada da klivaj edilir (yaklaşık olarak 109/110 ve yaklaşık olarak 136/137). Bu klivaj, kısa müdahale edici bir sekansın çıkarılmasıyla sonuçlanır ve F_1 (50 kDa; C-terminali; yaklaşık olarak 137-574 arası tortular) ve F_2 (20 kDa; N-terminali; yaklaşık olarak 1-109 arası tortular) adında birbiriyle bağlantılı kalmayı sürdüren iki alt birim üretir. F_1, N-terminalinde bir hidrofobik füzyon peptidi ve ayrıca iki amfipatik heptad-tekrar bölgesi (HRA ve HRB) ihtiva eder. HRA, füzyon peptidinin yanında ve HRB de, transmembran alanın yanındadır. Üç F_1-F_2 heterodimeri, virionda F_1-F_2 homotrimerleri şeklinde bir araya toplanır. Hali hazırda RSV enfeksiyonuna karşı uygun bir aşı mevcut değildir ancak arzu edilmektedir.

RSV gibi paramiksovirüsler, influenza virüsü ve HIV gibi diğer zarflı virüslere benzer şekilde, bir konakçı hücreyi enfekte etmek için viral membranın ilgili konakçı hücrenin membranıyla füzyonlanmasına ihtiyaç duyarlar. RSV durumunda konzerve füzyon proteini (RSV F), viral ve hücresel membranları, geri döndürülemez protein tekrar katlanmasını membranların yan yana konulması ile birleştirmek suretiyle füzyonla birleştirir. Paramiksovirüs çalışmalarına dayanan günümüz yöntemlerinde, RSV F proteini ilk başta bir yarı-kararlı "füzyon öncesi" konformasyon halinde katlanır. Bu füzyon öncesi konformasyon, tekrar katlanmaya ve kararlı "füzyon sonrası" konformasyonu için konformasyonel değişikliklere girer.

RSV F proteini, mRNA'dan F_0 olarak adlandırılan yaklaşık 574 amino asitli bir proteine traslate edilir. F_0 proteininin translasyon sonrası işlemleri, endoplazmik retikulumdaki bir sinyal peptidazı tarafından bir N-terminal sinyal peptidinin çıkarılmasını kapsar. Fo, trans-Golgi'deki hücresel proteazlar (özellikle furin) tarafından iki sahada da klivaj edilir (yaklaşık olarak 109/110 ve yaklaşık olarak 136/137). Bu klivaj, kısa müdahale edici bir sekansın çıkarılmasıyla sonuçlanır ve F_1 (50 kDa; C-terminali; yaklaşık olarak 137-574 arası tortular) ve F_2 (20 kDa; N-terminali; yaklaşık olarak 1-109 arası tortular) adında birbiriyle bağlantılı kalmayı sürdüren iki alt birim üretir. F_1, N-terminalinde bir hidrofobik füzyon peptidi ve ayrıca iki amfipatik heptad-tekrar bölgesi (HRA ve HRB) ihtiva eder. HRA, füzyon peptidinin yanında ve HRB de, transmembran alanın yanındadır. Üç F_1-F_2 heterodimeri, virionda F_1-F_2 homotrimerleri şeklinde bir araya toplanır. Hali hazırda RSV enfeksiyonuna karşı uygun bir aşı mevcut değildir ancak arzu edilmektedir.

RSV aşıları ile ilgili önceki girişimler, aşının, enfeksiyona karşı koruma sağlamadığı ve gerçekte aşılanmış çocukların enfekte olduğu durumda ciddi RSV hastalığı riskinin artmış olmasıyla bağlantılı başarısız klinik denemelere yol açmıştır. Kim, H.W. ve arkadaşları, Am. J. Epidemiol., 89:422-434 (1969). Bebeklerin RSV'ye karşı aşılanmasına yönelik geleneksel immünizasyon yöntemleri mevcut değildir. Englund J ve arkadaşları, Vaccine 16 (1998) 1456-1463'te, bebeklerin, hamilelik sırasında annenin immünize edilmesi yoluyla belirli enfeksiyonlara karşı korunmasını tartışır ve bunun, RSV için düşünüldüğünü, bundan sonra daha büyük bebeklerin canlı atenüe edilmiş aşılar ile immünizasyonunun değerlendirilebileceğini belirtir.

Bu yüzden gelişmiş RSV immünizasyon rejimlerine ihtiyaç vardır.

ÖZET

Buluş, bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamaya veya RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korumaya yönelik bir yöntemde kullanılmak için bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) immün yanıtı indükleme kompozisyonu ile ilgilidir; burada yöntem, yaklaşık 4 aylık veya daha küçük bebeğe, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar ki burada adı geçen bebeği doğuran kadına, adı geçen kadının adı geçen bebeğe hamile olduğu sırada bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanır; buradaki bir veya daha fazla RSV antijeni, bir RSV F glikoproteini içerir. Buna göre bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamak için açıklanan yöntemler, (a) bir kadına

RSV aşıları ile ilgili önceki girişimler, aşının, enfeksiyona karşı koruma sağlamadığı ve gerçekte aşılanmış çocukların enfekte olduğu durumda ciddi RSV hastalığı riskinin artmış olmasıyla bağlantılı başarısız klinik denemelere yol açmıştır. Kim, H.W. ve arkadaşları, Am. J. Epidemiol., 89:422-434 (1969). Bebeklerin RSV'ye karşı aşılanmasına yönelik geleneksel immünizasyon yöntemleri mevcut değildir. Englund J ve arkadaşları, Vaccine 16 (1998) 1456-1463'te, bebeklerin, hamilelik sırasında annenin immünize edilmesi yoluyla belirli enfeksiyonlara karşı korunmasını tartışır ve bunun, RSV için düşünüldüğünü, bundan sonra daha büyük bebeklerin canlı atenüe edilmiş aşılar ile immünizasyonunun değerlendirilebileceğini belirtir.

Bu yüzden gelişmiş RSV immünizasyon rejimlerine ihtiyaç vardır.

ÖZET

Buluş, bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamaya veya RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korumaya yönelik bir yöntemde kullanılmak için bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) immün yanıtı indükleme kompozisyonu ile ilgilidir; burada yöntem, yaklaşık 4 aylık veya daha küçük bebeğe, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar ki burada adı geçen bebeği doğuran kadına, adı geçen kadının adı geçen bebeğe hamile olduğu sırada bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayan bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanır; buradaki bir veya daha fazla RSV antijeni, bir RSV F glikoproteini içerir. Buna göre bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamak için açıklanan yöntemler, (a) bir kadına

hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar.

Açıklama ayrıca bir bebeğin, RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korunmasına yönelik olup, bir bebeğe, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyci kompozisyon uygulanmasını kapsayan yöntemler ile ilgilidir; burada bebeği doğuran kadına, kadının bebeğe hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmıştı.

Bazı yönlerde bir kadına hamilelik sırasında uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadında bir nötralize edici antikor tepkisini boost eder. Nötralize edici antikor tepkisi, nötralize edici titerinde bir 2 kat veya üzeri artışla karakterize edilebilir. Nötralize edici antikor tepkisi, nötralize edici antikorlar ile karakterize edilebilir. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikorlar, komplementten bağımsızdır. Bazı düzeneklerde bir kadına hamilelik sırasında uygulama, hamileliğin ikinci veya üçüncü döneminde yapılır. Bazı düzeneklerde hamilelikten doğan bebeğe uygulama, doğumdan hemen sonra, doğumdan yaklaşık 2 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 4 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 6 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 2 ay sonra, doğumdan yaklaşık 3 ay sonra veya doğumdan yaklaşık 4 ay sonra yapılır.

Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici

hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsar.

Açıklama ayrıca bir bebeğin, RSV'nin neden olduğu bir hastalıktan korunmasına yönelik olup, bir bebeğe, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyci kompozisyon uygulanmasını kapsayan yöntemler ile ilgilidir; burada bebeği doğuran kadına, kadının bebeğe hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmıştı.

Bazı yönlerde bir kadına hamilelik sırasında uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadında bir nötralize edici antikor tepkisini boost eder. Nötralize edici antikor tepkisi, nötralize edici titerinde bir 2 kat veya üzeri artışla karakterize edilebilir. Nötralize edici antikor tepkisi, nötralize edici antikorlar ile karakterize edilebilir. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikorlar, komplementten bağımsızdır. Bazı düzeneklerde bir kadına hamilelik sırasında uygulama, hamileliğin ikinci veya üçüncü döneminde yapılır. Bazı düzeneklerde hamilelikten doğan bebeğe uygulama, doğumdan hemen sonra, doğumdan yaklaşık 2 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 4 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 6 hafta sonra, doğumdan yaklaşık 2 ay sonra, doğumdan yaklaşık 3 ay sonra veya doğumdan yaklaşık 4 ay sonra yapılır.

Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici

kompozisyon aynıdır. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlardan her biri bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir viral replikon partikülü, bir canlı atenüe edilmiş virüs, eylemsizleştirilmiş bir virüs partikülü, bir rekombinant viral vektör veya virüs benzeri bir partikül içerebilir. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlardan her biri, bir veya daha fazla peptit veya bir virozomal kompozisyon içerebilir.

Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile aynı değildir. Birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ancak birinci ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü olamaz. Birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ancak birinci ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü olamaz. Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonunu kapsar. Bazı

kompozisyon aynıdır. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlardan her biri bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir viral replikon partikülü, bir canlı atenüe edilmiş virüs, eylemsizleştirilmiş bir virüs partikülü, bir rekombinant viral vektör veya virüs benzeri bir partikül içerebilir. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlardan her biri, bir veya daha fazla peptit veya bir virozomal kompozisyon içerebilir.

Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile aynı değildir. Birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ancak birinci ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü olamaz. Birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya bir viral replikon partikülü içerebilir; ancak birinci ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikon partikülü olamaz. Bazı düzeneklerde birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonunu kapsar. Bazı

düzeneklerde ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit veya viral replikon partikülünü kapsar. Bazı düzeneklerde ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya viral replikon partikülünü kapsar.

Bir tercih edilen yönde bir kadına hamilelik sırasında uygulanan birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, uygulandıktan sonra kadının içerisinde kopyalanmaz ve hamilelikten doğan bebeğe uygulanan ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun kendisi veya bunun genomu, bebek içerisinde kopyalanır. Örneğin birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, örneğin, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir RSV virüsü benzeri partikül (VLP), bir veya daha fazla RSV peptidi, bir epitop mimetik kompozisyonu, bir virozomal kompozisyon veya öldürülmüş bir RSV virion kompozisyonu olabilir ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, örneğin, bir kendi kendini kopyalayan nükleik asit (örn., bir kendi kendini kopyalayan (kendiliğinden amplifiye olan) RNA), bir canlı atenüe edilmiş virüs, bir heterolog canlı virüs (örn., bir insan dışı primer konakçı durumunda bir RSV ile alakalı virüs), bir canlı viral vektör, bir kimerik canlı virüs veya bir viral replikon partikülü olabilir.

ÇİZİMLERİN KISA TARİFİ

ŞEKİL 1A ve 1B, pamuk sıçanları (ŞEKİL 1A) ve BALB/c farelerinde (ŞEKİL 1B) serum nötralizasyon titerleri ile RSC tehdidi için koruma arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerdir. Pamuk

düzeneklerde ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit veya viral replikon partikülünü kapsar. Bazı düzeneklerde ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir nükleik asit, bir rekombinant viral vektör veya viral replikon partikülünü kapsar.

Bir tercih edilen yönde bir kadına hamilelik sırasında uygulanan birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, uygulandıktan sonra kadının içerisinde kopyalanmaz ve hamilelikten doğan bebeğe uygulanan ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun kendisi veya bunun genomu, bebek içerisinde kopyalanır. Örneğin birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, örneğin, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir RSV virüsü benzeri partikül (VLP), bir veya daha fazla RSV peptidi, bir epitop mimetik kompozisyonu, bir virozomal kompozisyon veya öldürülmüş bir RSV virion kompozisyonu olabilir ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, örneğin, bir kendi kendini kopyalayan nükleik asit (örn., bir kendi kendini kopyalayan (kendiliğinden amplifiye olan) RNA), bir canlı atenüe edilmiş virüs, bir heterolog canlı virüs (örn., bir insan dışı primer konakçı durumunda bir RSV ile alakalı virüs), bir canlı viral vektör, bir kimerik canlı virüs veya bir viral replikon partikülü olabilir.

ÇİZİMLERİN KISA TARİFİ

ŞEKİL 1A ve 1B, pamuk sıçanları (ŞEKİL 1A) ve BALB/c farelerinde (ŞEKİL 1B) serum nötralizasyon titerleri ile RSC tehdidi için koruma arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerdir. Pamuk

sıçanlarına ve farelere, i.p. yoluyla, farklı seviyelerde RSV'ye özel antikor (daha fazla detay için bakınız Örnek 3'teki yöntemler ve Tablo 3 ve 4) ihtiva eden donör serumu enjekte edildi ve bunlar, 2 gün sonra RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi. Her bir daire, tek bir hayvan için transferden bir gün sonraki serum nötralizasyon titerini ve tehdit sonrası (pamuk sıçanlarında tehditten 5 gün sonra, farelerde tehditten 4 gün sonra) akciğer viral yükünü temsil eder. Noktalı çizgiler, deneyin saptama limitlerini ve bütün çizgi, tehdit sonrasında saptanabilir hiçbir virüs olmaması ile ilişkili nötralizasyon titerini hesaplamak için kullanılan veriler için 4 parametreli en uygun eğriyi işaret eder.

DETAYLI TARİFNAME

Burada tarif edildiği gibi mucitler, bir bebeğin, hamileliği sırasında annesine (yani bir gebe kadına) bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını takiben doğduktan sonra bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması suretiyle respiratuar sinsitiyal virüse (RSV) karşı korunduğu bir immünizasyon rejimi keşfetmiştir. Gebe kadının immünizasyonu, pasif maternal immünite yoluyla bebeğe antikor aracılı immünite sağlar. Maternal antikorlar, plasenta yoluyla fetüse aktarıldığında pasif immünite doğal yoldan meydana gelir.

Pasif immünite, bebekler için özellikle önemlidir, çünkü bunlar, aktif şekilde edinilmiş immünite olmadan doğarlar. Bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bir gebe kadına uygulanması, kadında RSV'ye yönelik immüniteyi güçlendirir ve anti-RSV

sıçanlarına ve farelere, i.p. yoluyla, farklı seviyelerde RSV'ye özel antikor (daha fazla detay için bakınız Örnek 3'teki yöntemler ve Tablo 3 ve 4) ihtiva eden donör serumu enjekte edildi ve bunlar, 2 gün sonra RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi. Her bir daire, tek bir hayvan için transferden bir gün sonraki serum nötralizasyon titerini ve tehdit sonrası (pamuk sıçanlarında tehditten 5 gün sonra, farelerde tehditten 4 gün sonra) akciğer viral yükünü temsil eder. Noktalı çizgiler, deneyin saptama limitlerini ve bütün çizgi, tehdit sonrasında saptanabilir hiçbir virüs olmaması ile ilişkili nötralizasyon titerini hesaplamak için kullanılan veriler için 4 parametreli en uygun eğriyi işaret eder.

DETAYLI TARİFNAME

Burada tarif edildiği gibi mucitler, bir bebeğin, hamileliği sırasında annesine (yani bir gebe kadına) bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını takiben doğduktan sonra bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması suretiyle respiratuar sinsitiyal virüse (RSV) karşı korunduğu bir immünizasyon rejimi keşfetmiştir. Gebe kadının immünizasyonu, pasif maternal immünite yoluyla bebeğe antikor aracılı immünite sağlar. Maternal antikorlar, plasenta yoluyla fetüse aktarıldığında pasif immünite doğal yoldan meydana gelir.

Pasif immünite, bebekler için özellikle önemlidir, çünkü bunlar, aktif şekilde edinilmiş immünite olmadan doğarlar. Bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bir gebe kadına uygulanması, kadında RSV'ye yönelik immüniteyi güçlendirir ve anti-RSV

antikorları, plasenta yoluyla yeni doğana geçerek bebeğe pasif maternal immünite kazandırır. Bununla birlikte bebeklerde pasif immünite geçicidir ve yaşamlarının ilk birkaç haftası veya ayından sonra azalmaya başlar. Pasif immünite geçici olduğundan bebekte aktif immünite indüklemek için pasif immünite azalmadan önce bebeğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulaması alması önemlidir. Bir ikinci immünojenik kompozisyonun bebeğe doğumdan sonra uygulanması, bebekte RSV'ye karşı aktif immünite indükler ve gebelik sırasında anneden geçen immünitenin süresini uzatır.

Burada tarif edilen immünizasyon rejimi, birkaç avantaj sağlar. Örneğin bu yaklaşım, doğum sonrası bebekte RSV enfeksiyonundan korunma sağlar. İlave bir avantaj, burada tarif edilen rejime göre bebeğe bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasının, bebek immünizasyonuna yönelik önceki yaklaşımlardan daha fazla nötralize edici RSV immünitesi indüklenmesiyle sonuçlanabilmesidir. RSV'ye bağlı ciddi hastalık, yaklaşık olarak iki ila üç aylıkken pik yapar. Gebe kadınların, antikor titerlerini ve bebeklerindeki pasif antikor titerlerini arttırmak suretiyle immünize edilmesi, bebeklerde RSV'nin neden olduğu hastalığın başlamasını, respiratuar sistemlerinin daha olgun bir hal aldığı ve ciddi şekilde hastalanma ihtimallerinin azaldığı bir zamana kadar geciktirebilir. Yeni doğan immün sistemi, olgunlaşmamıştır; bu da, yeni doğanın aktif immünizasyonunu, daha büyük bebeklerin immünizasyonundan daha az etkili yapar. Gebe kadınların immünizasyonundan pasif immünitenin güçlenmiş olmasından dolayı bebeklerde RSV hastalığının gecikmesi, aktif bebek immünizasyonu

antikorları, plasenta yoluyla yeni doğana geçerek bebeğe pasif maternal immünite kazandırır. Bununla birlikte bebeklerde pasif immünite geçicidir ve yaşamlarının ilk birkaç haftası veya ayından sonra azalmaya başlar. Pasif immünite geçici olduğundan bebekte aktif immünite indüklemek için pasif immünite azalmadan önce bebeğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulaması alması önemlidir. Bir ikinci immünojenik kompozisyonun bebeğe doğumdan sonra uygulanması, bebekte RSV'ye karşı aktif immünite indükler ve gebelik sırasında anneden geçen immünitenin süresini uzatır.

Burada tarif edilen immünizasyon rejimi, birkaç avantaj sağlar. Örneğin bu yaklaşım, doğum sonrası bebekte RSV enfeksiyonundan korunma sağlar. İlave bir avantaj, burada tarif edilen rejime göre bebeğe bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasının, bebek immünizasyonuna yönelik önceki yaklaşımlardan daha fazla nötralize edici RSV immünitesi indüklenmesiyle sonuçlanabilmesidir. RSV'ye bağlı ciddi hastalık, yaklaşık olarak iki ila üç aylıkken pik yapar. Gebe kadınların, antikor titerlerini ve bebeklerindeki pasif antikor titerlerini arttırmak suretiyle immünize edilmesi, bebeklerde RSV'nin neden olduğu hastalığın başlamasını, respiratuar sistemlerinin daha olgun bir hal aldığı ve ciddi şekilde hastalanma ihtimallerinin azaldığı bir zamana kadar geciktirebilir. Yeni doğan immün sistemi, olgunlaşmamıştır; bu da, yeni doğanın aktif immünizasyonunu, daha büyük bebeklerin immünizasyonundan daha az etkili yapar. Gebe kadınların immünizasyonundan pasif immünitenin güçlenmiş olmasından dolayı bebeklerde RSV hastalığının gecikmesi, aktif bebek immünizasyonu

için ciddi hastalık riskinin en yüksek olduğu yaştan önce daha fazla zaman kazandıracaktır. Bu etkili immünizasyon için ek süre, bir bebeğe çoklu aşı dozları verilmesini ve/veya dozların, bebekliğin daha sonraki dönemlerinde, immün sistemin daha olgun olduğu ancak hala bebeğin ilk RSV enfeksiyonundan veya RSV'nin neden olduğu hastalığından önce verilmesini sağlayabilir.

Burada kullanıldığı gibi bir bebek, bir yaşın altında (örn., bir günlük, 1 haftalık, 2 haftalık, 3 haftalık, 4 haftalık, 2 aylık, 3 aylık, 4 aylık, 5 aylık, 6 aylık, 7 aylık, 8 aylık, 9 aylık, 10 aylık, 11 aylıktan küçük, 12 aylıktan küçük) bir kişidir.

Burada kullanıldığı gibi bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir memeliye uygulanmak için uygun ve RSV'ye karşı aktif immünite indüklemek veya bir immün yanıtı, tercihen bir koruyucu immün yanıtı boost etmek için etkili olan herhangi bir kompozisyondur. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayacaktır ve bu, örneğin, bir RSV protein antijeni, bir RSV protein antijenini şifreleyen bir nükleik asit, bir RSV protein antijenini şifreleyen bir nükleik asit ihtiva eden bir viral replikon partikülü (VRP), canlı atenüe edilmiş virüsler, eylemsizleştirilmiş virüsler, virüs benzeri partiküller (VLP) veya rekombinant viral vektörler içeren bir alt birim kompozisyonu şeklinde olabilir. RSV antijeni, arzu edilen herhangi bir RSV antijeni olabilir. Örneğin anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV glikoproteini veya bunun bir bölümünü (örn., ekto-alan), tercihen bir RSV F glikoproteini içerebilir. RSV glikoproteini, herhangi bir konformasyonda (örn., füzyon öncesi konformasyon,

için ciddi hastalık riskinin en yüksek olduğu yaştan önce daha fazla zaman kazandıracaktır. Bu etkili immünizasyon için ek süre, bir bebeğe çoklu aşı dozları verilmesini ve/veya dozların, bebekliğin daha sonraki dönemlerinde, immün sistemin daha olgun olduğu ancak hala bebeğin ilk RSV enfeksiyonundan veya RSV'nin neden olduğu hastalığından önce verilmesini sağlayabilir.

Burada kullanıldığı gibi bir bebek, bir yaşın altında (örn., bir günlük, 1 haftalık, 2 haftalık, 3 haftalık, 4 haftalık, 2 aylık, 3 aylık, 4 aylık, 5 aylık, 6 aylık, 7 aylık, 8 aylık, 9 aylık, 10 aylık, 11 aylıktan küçük, 12 aylıktan küçük) bir kişidir.

Burada kullanıldığı gibi bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir memeliye uygulanmak için uygun ve RSV'ye karşı aktif immünite indüklemek veya bir immün yanıtı, tercihen bir koruyucu immün yanıtı boost etmek için etkili olan herhangi bir kompozisyondur. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla RSV antijeni sağlayacaktır ve bu, örneğin, bir RSV protein antijeni, bir RSV protein antijenini şifreleyen bir nükleik asit, bir RSV protein antijenini şifreleyen bir nükleik asit ihtiva eden bir viral replikon partikülü (VRP), canlı atenüe edilmiş virüsler, eylemsizleştirilmiş virüsler, virüs benzeri partiküller (VLP) veya rekombinant viral vektörler içeren bir alt birim kompozisyonu şeklinde olabilir. RSV antijeni, arzu edilen herhangi bir RSV antijeni olabilir. Örneğin anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV glikoproteini veya bunun bir bölümünü (örn., ekto-alan), tercihen bir RSV F glikoproteini içerebilir. RSV glikoproteini, herhangi bir konformasyonda (örn., füzyon öncesi konformasyon,

füzyon sonrası konformasyon) veya konformasyonların bir karışımı halinde olabilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulanan RSV antijeni, farklı serogruplardan, farklı serotiplerden, farklı immünotiplerden, farklı serovarlardan, farklı biyovarlardan, farklı suşlardan, farklı soylardan veya farklı türlerden olabilir ve/veya mutasyonlar (örn., delesyonlar) ihtiva edebilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulanan RSV antijeni, farklı alt tiplerden olabilir.

İmmünizasyon rejiminde kullanılan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlar, aynı veya farklı olabilir. Örneğin kadına gebelik sırasında bir RSV alt birim kompozisyonu, bir viral replikasyon partikülü (VRP) veya atenüe edilmiş bir virüs uygulanabilir ve bebeğe doğumdan sonra aynı veya farklı RSV alt birim kompozisyonu, nükleik asit, viral replikasyon partikülü (VRP) veya atenüe edilmiş virüs uygulanır. Bir başka örnekte kadına gebelik sırasında atenüe edilmiş bir virüs uygulanabilir ve bebeğe doğumdan sonra bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik ait veya bir VRP uygulanır. Bazı durumlarda hem bebeğe hem de gebe kadına, atenüe edilmiş aşılar uygulanır. Diğer durumlarda hem bebeğe hem de gebe kadına, RSV alt birim kompozisyonları, nükleik asitler ve VRPlerin oluşturduğu gruptan seçilen aynı veya farklı anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanır. Yine diğer durumlarda bebeğe, bir adet anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile bir prime uygulanır ve bir başka anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile bir boost uygulanır. Örneğin bebek, bir nükleik asit ile prime edilebilir ve bir alt birim kompozisyonu ile boost edilebilir. Bazı durumlarda bebek yada gebe kadın veya hem bebel hem de gebe kadından her birine aynı anda birden fazla anti-RSV immün yanıtı

füzyon sonrası konformasyon) veya konformasyonların bir karışımı halinde olabilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulanan RSV antijeni, farklı serogruplardan, farklı serotiplerden, farklı immünotiplerden, farklı serovarlardan, farklı biyovarlardan, farklı suşlardan, farklı soylardan veya farklı türlerden olabilir ve/veya mutasyonlar (örn., delesyonlar) ihtiva edebilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulanan RSV antijeni, farklı alt tiplerden olabilir.

İmmünizasyon rejiminde kullanılan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlar, aynı veya farklı olabilir. Örneğin kadına gebelik sırasında bir RSV alt birim kompozisyonu, bir viral replikasyon partikülü (VRP) veya atenüe edilmiş bir virüs uygulanabilir ve bebeğe doğumdan sonra aynı veya farklı RSV alt birim kompozisyonu, nükleik asit, viral replikasyon partikülü (VRP) veya atenüe edilmiş virüs uygulanır. Bir başka örnekte kadına gebelik sırasında atenüe edilmiş bir virüs uygulanabilir ve bebeğe doğumdan sonra bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik ait veya bir VRP uygulanır. Bazı durumlarda hem bebeğe hem de gebe kadına, atenüe edilmiş aşılar uygulanır. Diğer durumlarda hem bebeğe hem de gebe kadına, RSV alt birim kompozisyonları, nükleik asitler ve VRPlerin oluşturduğu gruptan seçilen aynı veya farklı anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanır. Yine diğer durumlarda bebeğe, bir adet anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile bir prime uygulanır ve bir başka anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile bir boost uygulanır. Örneğin bebek, bir nükleik asit ile prime edilebilir ve bir alt birim kompozisyonu ile boost edilebilir. Bazı durumlarda bebek yada gebe kadın veya hem bebel hem de gebe kadından her birine aynı anda birden fazla anti-RSV immün yanıtı

indükleyici kompozisyon uygulanır. Örneğin bebek, gebe kadın veya bebek ve gebe kadından her birine, aynı anda bir nükleik asit ve bir alt birim kompozisyonu aynı anda uygulanabilir.

Bazı düzeneklerde kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı değildir. Örneğin kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir VRP içerebilir ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir VRP içerebilir ancak kadına ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikasyon partikülü olamaz.

Kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon çok muhtemel şekilde bir boost olacaktır. Örneğin kadın muhtemelen yaşamında gebelikten önceki bir zamanda bir RSV enfeksiyonu geçirmiş olacak, bu yüzden de kadına hamileliği sırasında uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir boost görevi görecektir. Boost, annede anti-RSV antikoru titerini arttıracak ve fetüse ve bebeğe geçen maternal immüniteyi güçlendirecektir.

Gebe kadına, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, gebeliği sırasında herhangi bir zamanda uygulanabilir. Örneğin anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadına, gebeliğinin birinci, ikinci veya üçüncü trimesterinde uygulanabilir. Bazı

indükleyici kompozisyon uygulanır. Örneğin bebek, gebe kadın veya bebek ve gebe kadından her birine, aynı anda bir nükleik asit ve bir alt birim kompozisyonu aynı anda uygulanabilir.

Bazı düzeneklerde kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı değildir. Örneğin kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir VRP içerebilir ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir VRP içerebilir ancak kadına ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonların her ikisi de bir RSV alt birim kompozisyonu, bir nükleik asit veya bir viral replikasyon partikülü olamaz.

Kadına uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon çok muhtemel şekilde bir boost olacaktır. Örneğin kadın muhtemelen yaşamında gebelikten önceki bir zamanda bir RSV enfeksiyonu geçirmiş olacak, bu yüzden de kadına hamileliği sırasında uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir boost görevi görecektir. Boost, annede anti-RSV antikoru titerini arttıracak ve fetüse ve bebeğe geçen maternal immüniteyi güçlendirecektir.

Gebe kadına, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, gebeliği sırasında herhangi bir zamanda uygulanabilir. Örneğin anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadına, gebeliğinin birinci, ikinci veya üçüncü trimesterinde uygulanabilir. Bazı

düzeneklerde anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadına, gebeliğin son 6-12 haftasında (örn., 28 haftalık gebelik, 29 haftalık gebelik, 30 haftalık gebelik, 31 haftalık gebelik, 32 haftalık gebelik, 33 haftalık gebelik, 34 haftalık gebelik, 35 haftalık gebelik, 36 haftalık gebelik, 37 haftalık gebelik, 38 haftalık gebelik, 39 haftalık gebelikte) uygulanır. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, gebe kadına, bebek gelmeden en az dört hafta önce uygulanır.

Bazı düzeneklerde gebe kadına, gebeliğin 32 ile 36ncı haftaları arasında bir tek doz rejimi uygulanır.

Diğer düzeneklerde gebe kadına, bir iki dozlu rejim, birinci doz yaklaşık olarak gebeliğin 32nci haftasında ve ikinci doz yaklaşık olarak gebeliğin 36ncı haftasında olmak üzere uygulanır.

Bebeğe, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, yaşamının birinci yılında herhangi bir zaman ve arzu edilirse daha sonra uygulanabilir. Genel olarak bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, yaşamının ilk yılında bir, iki, üç, dört veya daha fazla kez uygulanacaktır ve kompozisyon, aynı veya farklı olabilir. Örneğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, doğum, 2 haftalık, 4 haftalık, 6 haftalık, 2 aylık, 3 aylık, 4 aylık, 6 aylık, 9 aylık ve 12 aylık arasından seçilen bir veya daha fazla kez uygulanabilir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorlar koruyucu olmayan titerlere düşmeden önceki bir zamanda uygulanır, böylelikle mevcut buluşa göre anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon

düzeneklerde anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, kadına, gebeliğin son 6-12 haftasında (örn., 28 haftalık gebelik, 29 haftalık gebelik, 30 haftalık gebelik, 31 haftalık gebelik, 32 haftalık gebelik, 33 haftalık gebelik, 34 haftalık gebelik, 35 haftalık gebelik, 36 haftalık gebelik, 37 haftalık gebelik, 38 haftalık gebelik, 39 haftalık gebelikte) uygulanır. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, gebe kadına, bebek gelmeden en az dört hafta önce uygulanır.

Bazı düzeneklerde gebe kadına, gebeliğin 32 ile 36ncı haftaları arasında bir tek doz rejimi uygulanır.

Diğer düzeneklerde gebe kadına, bir iki dozlu rejim, birinci doz yaklaşık olarak gebeliğin 32nci haftasında ve ikinci doz yaklaşık olarak gebeliğin 36ncı haftasında olmak üzere uygulanır.

Bebeğe, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, yaşamının birinci yılında herhangi bir zaman ve arzu edilirse daha sonra uygulanabilir. Genel olarak bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, yaşamının ilk yılında bir, iki, üç, dört veya daha fazla kez uygulanacaktır ve kompozisyon, aynı veya farklı olabilir. Örneğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, doğum, 2 haftalık, 4 haftalık, 6 haftalık, 2 aylık, 3 aylık, 4 aylık, 6 aylık, 9 aylık ve 12 aylık arasından seçilen bir veya daha fazla kez uygulanabilir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorlar koruyucu olmayan titerlere düşmeden önceki bir zamanda uygulanır, böylelikle mevcut buluşa göre anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon

bebeğe ilk olarak yaklaşık 4 aylıkken veya daha küçükken uygulanır. Takip eden uygulamalar, arzu edilen herhangi bir programda olabilir.

Örneğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, bir üç dozluk rejim halinde uygulanabilir. Muhtemel bir dozlama rejimi, doğumda, 1 aylıkken ve 2 aylıkken uygulamayı kapsar. Bir başka olası dozlama rejimi, 1 aylıkken, 2 aylıkken ve 3 aylıkken uygulamayı kapsar. Bir başka olası dozlama rejimi, 1 aylıkken, 2 aylıkken ve 4 aylıkken uygulamayı kapsar.

Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun uygulaması, diğer aşılarla önemli ölçüde aynı anda (*örn.*, aynı tıbbi danışma veya bir sağlık profesyoneline veya aşılama merkezine ziyaret sırasında) erken başlangıçlı RSV hastalığı durumunda daha erken zamanlarda yapılabilir.

Bazı düzeneklerde anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, proteinler, DNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya VRPler içerir. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ayrıca bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak bir adjuvan da içerebilir. *Bakınız örneğin,* U.S. 6,299,884; U.S. 7,641,911; U.S. 7,306,805; ve US 2007/0207090. Tercih edilen belirli anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlar, burada ayrıca açıklanır.

İmmün yanıt, bir hümoral immün yanıt, bir hücre aracılı immün yanıt veya her ikisini kapsayabilir. Bazı düzeneklerde bir immün yanıt, verilen her bir RSV proteinine karşı indüklenir. Bir hücre aracılı

bebeğe ilk olarak yaklaşık 4 aylıkken veya daha küçükken uygulanır. Takip eden uygulamalar, arzu edilen herhangi bir programda olabilir.

Örneğin bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, bir üç dozluk rejim halinde uygulanabilir. Muhtemel bir dozlama rejimi, doğumda, 1 aylıkken ve 2 aylıkken uygulamayı kapsar. Bir başka olası dozlama rejimi, 1 aylıkken, 2 aylıkken ve 3 aylıkken uygulamayı kapsar. Bir başka olası dozlama rejimi, 1 aylıkken, 2 aylıkken ve 4 aylıkken uygulamayı kapsar.

Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun uygulaması, diğer aşılarla önemli ölçüde aynı anda (*örn.*, aynı tıbbi danışma veya bir sağlık profesyoneline veya aşılama merkezine ziyaret sırasında) erken başlangıçlı RSV hastalığı durumunda daha erken zamanlarda yapılabilir.

Bazı düzeneklerde anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, proteinler, DNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya VRPler içerir. Anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ayrıca bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak bir adjuvan da içerebilir. *Bakınız örneğin,* U.S. 6,299,884; U.S. 7,641,911; U.S. 7,306,805; ve US 2007/0207090. Tercih edilen belirli anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonlar, burada ayrıca açıklanır.

İmmün yanıt, bir hümoral immün yanıt, bir hücre aracılı immün yanıt veya her ikisini kapsayabilir. Bazı düzeneklerde bir immün yanıt, verilen her bir RSV proteinine karşı indüklenir. Bir hücre aracılı

immün yanıt, bir yardımcı T hücresi (Th) yanıtını, bir CD8+ sitotoksik T hücresi (CTL) yanıtını veya her ikisini kapsayabilir. Bazı düzeneklerde immün yanıt, bir hümoral immün yanıtı kapsar ve antikorlar, nötralize edici antikorlardır. Nötralize edici antikorlar, hücrelerin viral enfeksiyonunu bloke eder. Bazı düzeneklerde immün yanıt, hücrelerin enfeksiyonunu azaltır veya önler. Nötralize edici antikor tepkileri, komplemente bağımlı veya komplementten bağımsız olabilir. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, komplementten bağımsızdır. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, çapraz nötralize edicidir; yani bir uygulanan kompozisyona karşı üretilen bir antikor, kompozisyonda kullanılandan başka bir suştan bir RSV virüsünü nötralize eder. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, IgG antikorlarının nötralize edilmesiyle karakterize edilir.

Bu konuda faydalı bir antikor potansı ölçüsü, "% nötralizasyon titeri"dir (örn., %50 nötralizasyon titeri, %60 nötralizasyon titeri). %50 nötralize edici tieri belirlemek için immünize edilmiş kişilerden gelen serum seyreltilerek seyrek serumun, enfeksiyöz virüslerin ayrı ayrı %50'sinin veya %60'ının hücrelere girişini bloke etme kabiliyetini hala nasıl koruyabildiği değerlendirilir. Örneğin, %50 nötralizasyon titerinin 20 olması, serumun, 20 kat seyreltildikten sonra virüsün %50'sini nötralize etme kabiliyetini koruduğu anlamına gelir. Bu yüzden daha yüksek titerler, daha güçlü nötralize edici antikor tepkilerini işaret eder. Bazı düzeneklerde bu titer, alt sınırı yaklaşık 20, yaklaşık 40, yaklaşık 50, yaklaşık 60, yaklaşık 70, yaklaşık 80, yaklaşık 90, yaklaşık 100 veya yaklaşık 200 olan bir aralıktadır. %50 nötralizasyon titeri aralığının üst sınırı, yaklaşık 40, yaklaşık 40,

immün yanıt, bir yardımcı T hücresi (Th) yanıtını, bir CD8+ sitotoksik T hücresi (CTL) yanıtını veya her ikisini kapsayabilir. Bazı düzeneklerde immün yanıt, bir hümoral immün yanıtı kapsar ve antikorlar, nötralize edici antikorlardır. Nötralize edici antikorlar, hücrelerin viral enfeksiyonunu bloke eder. Bazı düzeneklerde immün yanıt, hücrelerin enfeksiyonunu azaltır veya önler. Nötralize edici antikor tepkileri, komplemente bağımlı veya komplementten bağımsız olabilir. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, komplementten bağımsızdır. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, çapraz nötralize edicidir; yani bir uygulanan kompozisyona karşı üretilen bir antikor, kompozisyonda kullanılandan başka bir suştan bir RSV virüsünü nötralize eder. Bazı düzeneklerde nötralize edici antikor tepkisi, IgG antikorlarının nötralize edilmesiyle karakterize edilir.

Bu konuda faydalı bir antikor potansı ölçüsü, "% nötralizasyon titeri"dir (örn., %50 nötralizasyon titeri, %60 nötralizasyon titeri). %50 nötralize edici tieri belirlemek için immünize edilmiş kişilerden gelen serum seyreltilerek seyrek serumun, enfeksiyöz virüslerin ayrı ayrı %50'sinin veya %60'ının hücrelere girişini bloke etme kabiliyetini hala nasıl koruyabildiği değerlendirilir. Örneğin, %50 nötralizasyon titerinin 20 olması, serumun, 20 kat seyreltildikten sonra virüsün %50'sini nötralize etme kabiliyetini koruduğu anlamına gelir. Bu yüzden daha yüksek titerler, daha güçlü nötralize edici antikor tepkilerini işaret eder. Bazı düzeneklerde bu titer, alt sınırı yaklaşık 20, yaklaşık 40, yaklaşık 50, yaklaşık 60, yaklaşık 70, yaklaşık 80, yaklaşık 90, yaklaşık 100 veya yaklaşık 200 olan bir aralıktadır. %50 nötralizasyon titeri aralığının üst sınırı, yaklaşık 40, yaklaşık 40,

yaklaşık 50, yaklaşık 60, yaklaşık 70, yaklaşık 80, yaklaşık 90, yaklaşık 100, yaklaşık 200, yaklaşık 400, yaklaşık 800, yaklaşık 1600, yaklaşık 3000, yaklaşık 6000, yaklaşık 8000, yaklaşık 10000 veya yaklaşık 20000 olabilir. Örneğin, %50 nötralizasyon titeri, yaklaşık 1:20, 1:40, 1:80 veya yaklaşık 1:100 olabilir. "Yaklaşık", belirtilen değerin iki katı içerisinde anlamına gelir. Nötralizasyon titeri, burada tarif edildiği gibi ölçülebilir.

Nötralizasyon titeri, bir RSV preparasyonunun bir antikor preparasyonu ile karıştırılması, o karışımın kültürlenmiş memeli hücrelerine katılması ve sonra antikor-virüs karışımı içerisinde kalan orijinal RSV enfektifliği oranının, karışımı hücrelere katmanın sonuçlarını değerlendirmek suretiyle belirlenmesiyle ölçülebilir. Antikor içerikli preparasyon, örneğin, hayvan serumu, insan serumu, serumsan saflaştırılmış antikorlar veya kültürden gelen monoklonal antikorları kapsayabilir. Bazı durumlarda komplement, örneğin, guinea domuzu komplementi, antikor ve RSV preparasyonu ile karıştırılabilir. Bazı düzeneklerde virüs örneklerine, seri antikor içerikli preparasyon seyreltmeleri ilave edilir. Nötralizasyon deneyinde kullanılan memeli hücreleri, bir mono-tabaka halinde veya süspansiyon halinde olabilir ve enfekte edilmiş olabilir. Hem virüs hem de antikor içerebilen inokülüm, hücreler üzerinde kalabilir veya kısa bir süre sonra (örn., 30 dakika, 60 dakika, 90 dakika) çıkarılabilir. Enfekte olmuş hücrelerin oranı, örneğin, bir yarı katı kaplama altında oluşan plakların sayılması, bir yarı katı kaplama altında oluşan sinsitianın sayılması, virüs ile kısa bir inkübasyonun ardından enfeksiyöz odakların immüno-boyanması, bir rekombinant RSV'nin eksprese ettiği flöresan markerinin saptanması, sitopatik etkiyi

yaklaşık 50, yaklaşık 60, yaklaşık 70, yaklaşık 80, yaklaşık 90, yaklaşık 100, yaklaşık 200, yaklaşık 400, yaklaşık 800, yaklaşık 1600, yaklaşık 3000, yaklaşık 6000, yaklaşık 8000, yaklaşık 10000 veya yaklaşık 20000 olabilir. Örneğin, %50 nötralizasyon titeri, yaklaşık 1:20, 1:40, 1:80 veya yaklaşık 1:100 olabilir. "Yaklaşık", belirtilen değerin iki katı içerisinde anlamına gelir. Nötralizasyon titeri, burada tarif edildiği gibi ölçülebilir.

Nötralizasyon titeri, bir RSV preparasyonunun bir antikor preparasyonu ile karıştırılması, o karışımın kültürlenmiş memeli hücrelerine katılması ve sonra antikor-virüs karışımı içerisinde kalan orijinal RSV enfektifliği oranının, karışımı hücrelere katmanın sonuçlarını değerlendirmek suretiyle belirlenmesiyle ölçülebilir. Antikor içerikli preparasyon, örneğin, hayvan serumu, insan serumu, serumsan saflaştırılmış antikorlar veya kültürden gelen monoklonal antikorları kapsayabilir. Bazı durumlarda komplement, örneğin, guinea domuzu komplementi, antikor ve RSV preparasyonu ile karıştırılabilir. Bazı düzeneklerde virüs örneklerine, seri antikor içerikli preparasyon seyreltmeleri ilave edilir. Nötralizasyon deneyinde kullanılan memeli hücreleri, bir mono-tabaka halinde veya süspansiyon halinde olabilir ve enfekte edilmiş olabilir. Hem virüs hem de antikor içerebilen inokülüm, hücreler üzerinde kalabilir veya kısa bir süre sonra (örn., 30 dakika, 60 dakika, 90 dakika) çıkarılabilir. Enfekte olmuş hücrelerin oranı, örneğin, bir yarı katı kaplama altında oluşan plakların sayılması, bir yarı katı kaplama altında oluşan sinsitianın sayılması, virüs ile kısa bir inkübasyonun ardından enfeksiyöz odakların immüno-boyanması, bir rekombinant RSV'nin eksprese ettiği flöresan markerinin saptanması, sitopatik etkiyi

gözlemlemek suretiyle enfekte olmuş hücrelerin tanımlanması, bir RSV markeri için immüno-boyama yapmak suretiyle enfekte olmuş hücrelerin tanımlanması, bozulmamış veya lizlenmiş hücrelerin süpernatanındaki RSV antijeni miktarının değerlendirilmesi, bir flöresan antijenini eksprese eden bir rekombinant RSV'den gelen flöresan miktarının saptanması, bir biyokimyasal deney (örn., LDH) yoluyla hücre lizizi miktarının saptanması ve yeterli bir inkübasyon süresinin ardından herhangi bir sitopatik etkinin gözlemlendiği en büyük virüs seyreltmesinin gözlemlenmesi dahil olmak üzere çeşitli vasıtalarla belirlenebilir. Nötralizasyon deneyindeki ilave varyasyonlar arasında, örneğin, tamponlar, bloke edici ajanlar, inkübasyon süreleri, kontroller, plakanın tipi, inkübasyon sıcaklıkları, hücre kültürü ortamı, geçirgenleştirici ajan, sabitleme ajanı, hücre substratı tipi, kaplama kompozisyonu, hücre boyası, reaktiflerin hacmi, yıkama sayısı, sekonder antikorların kullanımı, sayım yöntemi, hesaplama yöntemi ve titeri hesaplamak için kullanılan nötralizasyon yüzdesinde varyasyonlar yer alabilir.

Bir immün yanıt, bir kişiye bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon (proteinler, DNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya VRPler içeren bir kompozisyon) uygulanması suretiyle uyarılabilir. Bazı düzeneklerde indüklenen immün yanıt, bir koruyucu immün yanıttır; *yani* yanıt, RSV enfeksiyonu riskini azaltır, RSV enfeksiyonunun başlamasını geciktirir, RSV'nin neden olduğu hastalık riskini azaltır, RSV'nin neden olduğu hastalığın ciddiyetini azaltır, RSV'nin neden olduğu hastalığın sıklığını azaltır, RSV enfeksiyonu veya RSV'nin neden olduğu hastalık sekellerini azaltır

gözlemlemek suretiyle enfekte olmuş hücrelerin tanımlanması, bir RSV markeri için immüno-boyama yapmak suretiyle enfekte olmuş hücrelerin tanımlanması, bozulmamış veya lizlenmiş hücrelerin süpernatanındaki RSV antijeni miktarının değerlendirilmesi, bir flöresan antijenini eksprese eden bir rekombinant RSV'den gelen flöresan miktarının saptanması, bir biyokimyasal deney (örn., LDH) yoluyla hücre lizizi miktarının saptanması ve yeterli bir inkübasyon süresinin ardından herhangi bir sitopatik etkinin gözlemlendiği en büyük virüs seyreltmesinin gözlemlenmesi dahil olmak üzere çeşitli vasıtalarla belirlenebilir. Nötralizasyon deneyindeki ilave varyasyonlar arasında, örneğin, tamponlar, bloke edici ajanlar, inkübasyon süreleri, kontroller, plakanın tipi, inkübasyon sıcaklıkları, hücre kültürü ortamı, geçirgenleştirici ajan, sabitleme ajanı, hücre substratı tipi, kaplama kompozisyonu, hücre boyası, reaktiflerin hacmi, yıkama sayısı, sekonder antikorların kullanımı, sayım yöntemi, hesaplama yöntemi ve titeri hesaplamak için kullanılan nötralizasyon yüzdesinde varyasyonlar yer alabilir.

Bir immün yanıt, bir kişiye bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon (proteinler, DNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya VRPler içeren bir kompozisyon) uygulanması suretiyle uyarılabilir. Bazı düzeneklerde indüklenen immün yanıt, bir koruyucu immün yanıttır; *yani* yanıt, RSV enfeksiyonu riskini azaltır, RSV enfeksiyonunun başlamasını geciktirir, RSV'nin neden olduğu hastalık riskini azaltır, RSV'nin neden olduğu hastalığın ciddiyetini azaltır, RSV'nin neden olduğu hastalığın sıklığını azaltır, RSV enfeksiyonu veya RSV'nin neden olduğu hastalık sekellerini azaltır

veya RSV ile enfekte olmuş bir kişinin RSV'yi bir başka kişiye yayma riskini azaltır.

Uygun herhangi bir uygulama yolu kullanılabilir. Örneğin bir kompozisyon, intramüsküler, intraperitonel, subkütan, transdermal veya intradermal yoldan uygulanabilir. Arzu edilirse kompozisyon, intra-oral, intra-nazal, intra-vajinal ve intra-rektal gibi intra-mukozal yoldan uygulanabilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulama, aynı yoldan veya farklı yollardan olabilir. Kompozisyonlar, uygun herhangi bir plana göre uygulanabilir.

Burada tarif edildiği gibi bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, (a) bir kadına hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması adımlarını kapsayacak şekilde sağlanır. Burada tarif edildiği gibi birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı veya farklı olabilir. Bu yaklaşım tercihen gebe kadındaki, maternal immünite vasıtasıyla bebeğe geçen nötralize edici anti-RSV antikorlarını indükler veya boost eder ve bebekte bir aktif immün yanıt indükler. Bu yüzden tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bebeğe ilk uygulandığı anda bebekte, RSV'ye karşı maternal antikorlar vardır ve uygulamanın sonucunda RSV'ye karşı bir immün yanıt aktif şekilde gelişecektir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorların bebekte hala koruyucu seviyelerde olduğu sırada uygulanır.

veya RSV ile enfekte olmuş bir kişinin RSV'yi bir başka kişiye yayma riskini azaltır.

Uygun herhangi bir uygulama yolu kullanılabilir. Örneğin bir kompozisyon, intramüsküler, intraperitonel, subkütan, transdermal veya intradermal yoldan uygulanabilir. Arzu edilirse kompozisyon, intra-oral, intra-nazal, intra-vajinal ve intra-rektal gibi intra-mukozal yoldan uygulanabilir. Gebe kadına ve bebeğe uygulama, aynı yoldan veya farklı yollardan olabilir. Kompozisyonlar, uygun herhangi bir plana göre uygulanabilir.

Burada tarif edildiği gibi bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, (a) bir kadına hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanması adımlarını kapsayacak şekilde sağlanır. Burada tarif edildiği gibi birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı veya farklı olabilir. Bu yaklaşım tercihen gebe kadındaki, maternal immünite vasıtasıyla bebeğe geçen nötralize edici anti-RSV antikorlarını indükler veya boost eder ve bebekte bir aktif immün yanıt indükler. Bu yüzden tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bebeğe ilk uygulandığı anda bebekte, RSV'ye karşı maternal antikorlar vardır ve uygulamanın sonucunda RSV'ye karşı bir immün yanıt aktif şekilde gelişecektir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorların bebekte hala koruyucu seviyelerde olduğu sırada uygulanır.

Özel bir düzenekte bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, bir kadına hamilelik sırasında bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanması ve hamilelikten doğan bebeğe bir anti-RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasıyla sağlanır. Tercih edilen bir düzenekte bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, bir kadına hamilelik sırasında bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanması ve hamilelikten doğan bebeğe bir veya daha fazla anti-RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasını takiben bebeğe bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanmasıyla sağlanır.

Burada tarif edildiği gibi bir bebek, RSV enfeksiyonundan, bir bvebeğe bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle korunur; burada bebeği doğuran kadına, kadının bebeğe hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün indükleyici veya boost edici kompozisyon uygulanmıştır. Kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı veya farklı olabilir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bebeğe ilk uygulandığı anda bebekte, RSV'ye karşı maternal antikorlar vardır ve uygulamanın sonucunda RSV'ye karşı bir immün yanıt aktif şekilde gelişecektir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorların bebekte hala koruyucu titerlerde olduğu sırada uygulanır.

Bir tercih edilen düzenekte bir bebek, RSV enfeksiyonundan, bir kadının bebeğe gebe olduğu sırada bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanmış kadının doğurduğu bir bebeğe bir anti-

Özel bir düzenekte bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, bir kadına hamilelik sırasında bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanması ve hamilelikten doğan bebeğe bir anti-RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasıyla sağlanır. Tercih edilen bir düzenekte bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite, bir kadına hamilelik sırasında bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanması ve hamilelikten doğan bebeğe bir veya daha fazla anti-RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasını takiben bebeğe bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanmasıyla sağlanır.

Burada tarif edildiği gibi bir bebek, RSV enfeksiyonundan, bir bvebeğe bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle korunur; burada bebeği doğuran kadına, kadının bebeğe hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün indükleyici veya boost edici kompozisyon uygulanmıştır. Kadına uygulanmış olan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ve bebeğe uygulanan anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon aynı veya farklı olabilir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bebeğe ilk uygulandığı anda bebekte, RSV'ye karşı maternal antikorlar vardır ve uygulamanın sonucunda RSV'ye karşı bir immün yanıt aktif şekilde gelişecektir. Tercihen anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bebeğe, maternal antikorların bebekte hala koruyucu titerlerde olduğu sırada uygulanır.

Bir tercih edilen düzenekte bir bebek, RSV enfeksiyonundan, bir kadının bebeğe gebe olduğu sırada bir anti-RSV alt birim kompozisyonu uygulanmış kadının doğurduğu bir bebeğe bir anti-

RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasıyla korunur.

Anti-RSV İmmün Yanıt İndükleyici Kompozisyon

Buluşta, arzu edilen herhangi bir anti-RSV İmmün yanıt indükleyici kompozisyon kullanılabilir. Örneğin RSV proteinleri veya fragmanları, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bileşenleri şeklinde direkt olarak verilebilir veya bir veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen nükleik asitler uygulanarak *in vivo* RSV proteini veya fragmanı üretilebilir veya canlı atenüe edilmiş virüsler uygulanabilir veya RSV proteinlerini eksprese eden rekombinant viral vektörler uygulanabilir veya eylemsizleştirilmiş RSV virüsleri uygulanabilir veya RSV antijenleri ihtiva eden virüs benzeri partiküller uygulanabilir. Tercih edilen belirli düzenekler, örn., RSV proteinleri veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar ihtiva eden protein formülasyonları, rekombinant nükleik asitler (örn., kendi kendini kopyalayan RNA) ve alfavirüsü VRP'si, burada ayrıca tarif edilir.

Protein Formülasyonları

Buluşa göre kullanılan immünojenik proteinler veya bunların fragmanları genellikle izole edilmiş veya saflaştırılmış olacaktır. Böylece bunlar, molekülün doğada birlikte bulunduğu veya aynı tipte diğer biyolojik makromoleküllerin önemli ölçüde olmadığı durumda mevcut olduğu bütün organizma veya viriondan ayrı ve ayrık olacaktır.

RSV kendi kendini kopyalayan RNA kompozisyonu uygulanmasıyla korunur.

Anti-RSV İmmün Yanıt İndükleyici Kompozisyon

Buluşta, arzu edilen herhangi bir anti-RSV İmmün yanıt indükleyici kompozisyon kullanılabilir. Örneğin RSV proteinleri veya fragmanları, anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun bileşenleri şeklinde direkt olarak verilebilir veya bir veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen nükleik asitler uygulanarak *in vivo* RSV proteini veya fragmanı üretilebilir veya canlı atenüe edilmiş virüsler uygulanabilir veya RSV proteinlerini eksprese eden rekombinant viral vektörler uygulanabilir veya eylemsizleştirilmiş RSV virüsleri uygulanabilir veya RSV antijenleri ihtiva eden virüs benzeri partiküller uygulanabilir. Tercih edilen belirli düzenekler, örn., RSV proteinleri veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar ihtiva eden protein formülasyonları, rekombinant nükleik asitler (örn., kendi kendini kopyalayan RNA) ve alfavirüsü VRP'si, burada ayrıca tarif edilir.

Protein Formülasyonları

Buluşa göre kullanılan immünojenik proteinler veya bunların fragmanları genellikle izole edilmiş veya saflaştırılmış olacaktır. Böylece bunlar, molekülün doğada birlikte bulunduğu veya aynı tipte diğer biyolojik makromoleküllerin önemli ölçüde olmadığı durumda mevcut olduğu bütün organizma veya viriondan ayrı ve ayrık olacaktır.

RSV, tek bir serotip olarak çıkar ancak iki antijenik alt gruba sahiptir: A ve B. İki grubun F glikoproteinleri, yaklaşık %90 özdeştir. A alt grubu, B alt grubu veya her ikisinin bir kombinasyonu veya hibridi, buluşta kullanılabilir. A alt grubu için bir örnek sekans, SEK.KİM.NO: 1 (A2 suşu; GenBank GI: 138251; Swiss Prot P03420) ve B alt grubu için SEK.KİM.NO: 2'dir (18537 suşu; GI: 138250; Swiss Prot P13843). SEK.KİM.NO:1 ve SEK.KİM.NO:2'nin her ikisi de, 574 amino asitli sekanslardır. A2 suşundaki sinyal peptidi, a.a. 1-21'dir ancak 18537 suşunda bu, 1-22'dir. Her iki sekansta da TM alanı, yaklaşık a.a. 530-550 arasındadır ancak alternatif olarak 525-548 şeklinde de bildirilmiştir.

SEK.KİM.NO: 1

SEK.KİM.NO: 2

RSV, tek bir serotip olarak çıkar ancak iki antijenik alt gruba sahiptir: A ve B. İki grubun F glikoproteinleri, yaklaşık %90 özdeştir. A alt grubu, B alt grubu veya her ikisinin bir kombinasyonu veya hibridi, buluşta kullanılabilir. A alt grubu için bir örnek sekans, SEK.KİM.NO: 1 (A2 suşu; GenBank GI: 138251; Swiss Prot P03420) ve B alt grubu için SEK.KİM.NO: 2'dir (18537 suşu; GI: 138250; Swiss Prot P13843). SEK.KİM.NO:1 ve SEK.KİM.NO:2'nin her ikisi de, 574 amino asitli sekanslardır. A2 suşundaki sinyal peptidi, a.a. 1-21'dir ancak 18537 suşunda bu, 1-22'dir. Her iki sekansta da TM alanı, yaklaşık a.a. 530-550 arasındadır ancak alternatif olarak 525-548 şeklinde de bildirilmiştir.

SEK.KİM.NO: 1

SEK.KİM.NO: 2

RSV proteinleri, furin klivaj sahalarının birinde veya her ikisinde de (*yani* SEK.KİM.NO.:1 ve 2'ye ait amino asitler 109 ve 136) klivajı önleyen bir veya daha fazla mutasyon ihtiva edebilir. Bu mutasyonlar çözülebilir polipeptitlerin veya proteinlerin topaklaşmasını önleyebilir ve böylelikle saflaştırmaları kolaylaştırabilir; RSV F proteininin, bir hücrenin yüzeyi üzerinde örneğin bir viral replikondan (örn., alfavirüs replikon partikülleri) ekspresyon yoluyla eksprese edilmesi durumunda veya RSV F proteininin bir virüs benzeri partikülün bir bileşeni olması durumunda hücre-hücre füzyonunu önleyebilir. Bu mutasyonlar tek başlarına ya da burada açıklanan başka mutasyonlarla birlikte füzyon öncesi konformasyondaki proteini stabilize de edebilir.

Uygun furin klivaj mutasyonlarının örnekleri arasında SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 106-109 arası amino asit tortularının RARK (SEK.KİMNO.:3), RARQ (SEK.KİM.NO.:4), QAQN (SEK.KİM.NO.:5) veya IEGR (SEK.KİM.NO.:6) ile değiştirilmesi yer alır. Alternatif veya ek olarak SEK.KİM.NO:: 1 vya 2'ye ait 133-136 arası amino asit tortuları, RKKK (SEK.KİM.NO:7), ⊗⊗⊗R, QNQN (SEK.KİM.NO:8), QQQR (SEK.KİM.NO:9) veya IEGR (SEK.KİM.NO:10) ile de değiştirilebilir. (⊗, amino asit tortusunın delete edilmiş olduğunu işaret eder.) Bu mutasyonlar, istenirse, p27 bölgesinin tamamen veya kısmen delete edilmesi dahil olmak üzere, p27 bölgesindeki (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 110-136 arası amino asitler) mutasyonlar gibi burada açıklanan başka mutasyonlar ile birleştirilebilir.

Bu furin klivaj mutasyonları, istenirse, tripsin klivaj mutasyonları ve füzyon peptidi mutasyonları gibi burada açıklanan başka mutasyonlar

RSV proteinleri, furin klivaj sahalarının birinde veya her ikisinde de (*yani* SEK.KİM.NO.:1 ve 2'ye ait amino asitler 109 ve 136) klivajı önleyen bir veya daha fazla mutasyon ihtiva edebilir. Bu mutasyonlar çözülebilir polipeptitlerin veya proteinlerin topaklaşmasını önleyebilir ve böylelikle saflaştırmaları kolaylaştırabilir; RSV F proteininin, bir hücrenin yüzeyi üzerinde örneğin bir viral replikondan (örn., alfavirüs replikon partikülleri) ekspresyon yoluyla eksprese edilmesi durumunda veya RSV F proteininin bir virüs benzeri partikülün bir bileşeni olması durumunda hücre-hücre füzyonunu önleyebilir. Bu mutasyonlar tek başlarına ya da burada açıklanan başka mutasyonlarla birlikte füzyon öncesi konformasyondaki proteini stabilize de edebilir.

Uygun furin klivaj mutasyonlarının örnekleri arasında SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 106-109 arası amino asit tortularının RARK (SEK.KİMNO.:3), RARQ (SEK.KİM.NO.:4), QAQN (SEK.KİM.NO.:5) veya IEGR (SEK.KİM.NO.:6) ile değiştirilmesi yer alır. Alternatif veya ek olarak SEK.KİM.NO:: 1 vya 2'ye ait 133-136 arası amino asit tortuları, RKKK (SEK.KİM.NO:7), ⊗⊗⊗R, QNQN (SEK.KİM.NO:8), QQQR (SEK.KİM.NO:9) veya IEGR (SEK.KİM.NO:10) ile de değiştirilebilir. (⊗, amino asit tortusunın delete edilmiş olduğunu işaret eder.) Bu mutasyonlar, istenirse, p27 bölgesinin tamamen veya kısmen delete edilmesi dahil olmak üzere, p27 bölgesindeki (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 110-136 arası amino asitler) mutasyonlar gibi burada açıklanan başka mutasyonlar ile birleştirilebilir.

Bu furin klivaj mutasyonları, istenirse, tripsin klivaj mutasyonları ve füzyon peptidi mutasyonları gibi burada açıklanan başka mutasyonlar

ile birleştirilebilir. Uygun tripsin klivaj mutasyonlarının örnekleri arasında SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait yaklaşık 101 pozisyonu ile 161 pozisyonu arasındaki herhangi bir lisin veya arginin tortusunun delesyonu veya bu tür bir lisin veya arginin tortusunun, lisin veya arginin dışındaki bir amino asit ile değiştirilmesi yer alır. Örneğin, p27 bölgesindeki (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait yaklaşık 110-136 arası amino asitler) lisin ve/veya arginin tortuları, p27 bölgesinin tamamen veya kısmen delete edilmesi de dahil olmak üzere ikame edilebilir veya delete edilebilir.

Furin klivaj mutasyonlarına alternatif veya ek olarak RSV F polipeptitleri veya proteinleri, füzyon peptidi bölgesinde (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 137 ile 153 arası amino asitler) bir veya daha fazla mutasyon ihtiva edebilir. Örneğin, bu bölge tamamen veya kısmen delete edilebilir.

Özel düzeneklerde RSV proteininin 100-150 arası amino asit tortusunu içeren sekans, örn., SEK.KİM.NO:1, SEK.KİM.NO:2 veya bunların çözülebilir ekto alanları, şu şekildedir

(Füzyon peptidi delesyonu 1)

TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR---------SAIAS (SEK.KİM.NO:11) veya

(Füzyon peptidi delesyonu 2)

TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR------GVGSAIAS (SEK.KİM.NO:12).

ile birleştirilebilir. Uygun tripsin klivaj mutasyonlarının örnekleri arasında SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait yaklaşık 101 pozisyonu ile 161 pozisyonu arasındaki herhangi bir lisin veya arginin tortusunun delesyonu veya bu tür bir lisin veya arginin tortusunun, lisin veya arginin dışındaki bir amino asit ile değiştirilmesi yer alır. Örneğin, p27 bölgesindeki (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait yaklaşık 110-136 arası amino asitler) lisin ve/veya arginin tortuları, p27 bölgesinin tamamen veya kısmen delete edilmesi de dahil olmak üzere ikame edilebilir veya delete edilebilir.

Furin klivaj mutasyonlarına alternatif veya ek olarak RSV F polipeptitleri veya proteinleri, füzyon peptidi bölgesinde (SEK.KİM.NO.:1 veya 2'ye ait 137 ile 153 arası amino asitler) bir veya daha fazla mutasyon ihtiva edebilir. Örneğin, bu bölge tamamen veya kısmen delete edilebilir.

Özel düzeneklerde RSV proteininin 100-150 arası amino asit tortusunu içeren sekans, örn., SEK.KİM.NO:1, SEK.KİM.NO:2 veya bunların çözülebilir ekto alanları, şu şekildedir

(Füzyon peptidi delesyonu 1)

TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR---------SAIAS (SEK.KİM.NO:11) veya

(Füzyon peptidi delesyonu 2)

TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR------GVGSAIAS (SEK.KİM.NO:12).

Furin klivajı ve füzyon peptidi mutasyonlarına veya alternatif olarak çözülebilir RSV proteinlerine, örn., transmembran bölge ve sitoplazmik kuyruktan yoksun olanlara ek olarak RSV proteinleri, bir veya daha fazla oligomerizasyon sekansı da ihtiva edebilir. Bir oligomerizasyon sekansının mevcut olduğu durumda bu tercihen bir trimerizasyon sekansıdır. Uygun oligomerizasyon sekansları, bu konuda iyi bilinir ve bunlar arasında, örneğin, maya GCN4 lösin fermuar proteininin sarılı sarmalı, bakteriyofaj T4 fibritininden trimerize edici sekans ("foldon") ve influenza HA'nın trimer alanı yer alır. Bu ve diğer uygun oligomerizasyon sekansları burada daha ayrıntılı olarak açıklanır.

Proteinler veya bunların fragmanları genellikle bir rekombinant konakçı sistem içerisinde ekspresyon yoluyla hazırlanacaktır. Genel olarak bunlar (örn., RSV proteinleri), her ne kadar uygun herhangi bir yöntem kullanılabilse de uygun rekombinant konakçı hücreler içinde proteinleri şifreleyen rekombinant yapıların eksprese edilmesiyle üretilir. Uygun rekombinant konakçı hücreler arasında, örneğin, böcek hücreleri (örn., Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda ve Trichoplusia ni), memeli hücreleri (örn., insan, insan dışı primat, at, inek, koyun, köpek, kedi ve kemirgen (örn., hamster)), kuş hücreleri (örn., tavuk, ördek ve kaz), bakteriler (örn., E. coli, Bacillus subtilis ve Streptococcus spp.), maya hücreleri (örn., Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Candida maltosa, Hansenual polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guillerimondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe ve Yarrowia lipolytica), Tetrahimena hücreleri (örn., Tetrahymena thermophila) veya bunların

Furin klivajı ve füzyon peptidi mutasyonlarına veya alternatif olarak çözülebilir RSV proteinlerine, örn., transmembran bölge ve sitoplazmik kuyruktan yoksun olanlara ek olarak RSV proteinleri, bir veya daha fazla oligomerizasyon sekansı da ihtiva edebilir. Bir oligomerizasyon sekansının mevcut olduğu durumda bu tercihen bir trimerizasyon sekansıdır. Uygun oligomerizasyon sekansları, bu konuda iyi bilinir ve bunlar arasında, örneğin, maya GCN4 lösin fermuar proteininin sarılı sarmalı, bakteriyofaj T4 fibritininden trimerize edici sekans ("foldon") ve influenza HA'nın trimer alanı yer alır. Bu ve diğer uygun oligomerizasyon sekansları burada daha ayrıntılı olarak açıklanır.

Proteinler veya bunların fragmanları genellikle bir rekombinant konakçı sistem içerisinde ekspresyon yoluyla hazırlanacaktır. Genel olarak bunlar (örn., RSV proteinleri), her ne kadar uygun herhangi bir yöntem kullanılabilse de uygun rekombinant konakçı hücreler içinde proteinleri şifreleyen rekombinant yapıların eksprese edilmesiyle üretilir. Uygun rekombinant konakçı hücreler arasında, örneğin, böcek hücreleri (örn., Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda ve Trichoplusia ni), memeli hücreleri (örn., insan, insan dışı primat, at, inek, koyun, köpek, kedi ve kemirgen (örn., hamster)), kuş hücreleri (örn., tavuk, ördek ve kaz), bakteriler (örn., E. coli, Bacillus subtilis ve Streptococcus spp.), maya hücreleri (örn., Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Candida maltosa, Hansenual polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guillerimondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe ve Yarrowia lipolytica), Tetrahimena hücreleri (örn., Tetrahymena thermophila) veya bunların

kombinasyonları yer alır. Çoğu uygun böcek hücresi ve memeli hücresi, bu konuda iyi bilinir. Uygun böcek hücreleri arasında, örneğin Sf9 hücreleri, Sf21 hücreleri, Tn5 hücreleri, Schneider S2 hücreleri ve High Five hücreleri (parental Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 hücre çizgisinden (Invitrogen) türetilen bir klonal izolat) yer alır. Uygun memeli hücreleri arasında, örneğin, Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, insan embriyonik böbrek hücreleri (tipik olarak kesilmiş adenovirüs tip 5 DNA'sıyla transforme edilen HEK293 hücreleri), NIH-3T3 hücreleri, 293-T hücreleri, Vero hücreleri, HeLa hücreleri, PERC.6 hücreleri (ECACC bırakma numarası 96022940), Hep G2 hücreleri, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), fetal resus akciğer hücreleri (ATCC CL-160), Madin-Darby inek böbreği ("MDBK") hücreleri, Madin-Darby köpek böbreği ("MDCK") hücreleri (örn., MDCK (NBL2), ATCC CCL34 veya MDCK 33016, DSM ACC 2219), bebek hamster böbreği (BHK) hücreleri, örn., BHK21-F, HKCC hücreleri ve benzeri yer alır. Uygun kuş hücreleri arasında, örneğin, tavuk embriyonik kök hücreleri (örn., EBx® hücreleri), tavuk embriyonik fibroblastları, tavuk embriyonik germ hücreleri, ördek hücreleri (örn., AGE1.CR ve AGE1.CR.pIX hücre çizgileri (ProBioGen); bunlar, örneğin Vaccine 27:4975-4982 (2009) ve WO2005/042728''de açıklanmıştır), EB66 hücreleri ve benzeri yer alır.

Uygun böcej hücresi ekspresyon sistemleri, örn., bakülovirüs sistemleri, bu konuda uzman kişilerce bilinir ve örn., Summers ve Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)'de tarif edilir. Bakülovirüs/böcek hücresi ekspresyon sistemleri için materyaller ve yöntemler, diğerleri arasında, Invitrogen, San

kombinasyonları yer alır. Çoğu uygun böcek hücresi ve memeli hücresi, bu konuda iyi bilinir. Uygun böcek hücreleri arasında, örneğin Sf9 hücreleri, Sf21 hücreleri, Tn5 hücreleri, Schneider S2 hücreleri ve High Five hücreleri (parental Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 hücre çizgisinden (Invitrogen) türetilen bir klonal izolat) yer alır. Uygun memeli hücreleri arasında, örneğin, Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, insan embriyonik böbrek hücreleri (tipik olarak kesilmiş adenovirüs tip 5 DNA'sıyla transforme edilen HEK293 hücreleri), NIH-3T3 hücreleri, 293-T hücreleri, Vero hücreleri, HeLa hücreleri, PERC.6 hücreleri (ECACC bırakma numarası 96022940), Hep G2 hücreleri, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), fetal resus akciğer hücreleri (ATCC CL-160), Madin-Darby inek böbreği ("MDBK") hücreleri, Madin-Darby köpek böbreği ("MDCK") hücreleri (örn., MDCK (NBL2), ATCC CCL34 veya MDCK 33016, DSM ACC 2219), bebek hamster böbreği (BHK) hücreleri, örn., BHK21-F, HKCC hücreleri ve benzeri yer alır. Uygun kuş hücreleri arasında, örneğin, tavuk embriyonik kök hücreleri (örn., EBx® hücreleri), tavuk embriyonik fibroblastları, tavuk embriyonik germ hücreleri, ördek hücreleri (örn., AGE1.CR ve AGE1.CR.pIX hücre çizgileri (ProBioGen); bunlar, örneğin Vaccine 27:4975-4982 (2009) ve WO2005/042728''de açıklanmıştır), EB66 hücreleri ve benzeri yer alır.

Uygun böcej hücresi ekspresyon sistemleri, örn., bakülovirüs sistemleri, bu konuda uzman kişilerce bilinir ve örn., Summers ve Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)'de tarif edilir. Bakülovirüs/böcek hücresi ekspresyon sistemleri için materyaller ve yöntemler, diğerleri arasında, Invitrogen, San

Diego CA'dan kit formunda ticari olarak temin edilebilir. Kuş hücresi ekspresyon sistemleri de bu konuda uzman kişilerce bilinir ve örn., ABD Patent No. 5,340,740; 5,656,479; 5,830,510; 6,114,168; ve 6,500,668; Avrupa Patenti No. EP 0787180B; Avrupa Patenti No. EP03291813.8 ;WO 03/043415; ve WO 03/076601'de tarif edilir. Benzer şekilde bakteriyel ve memeli hücresi ekspresyon sistemleri de bu konuda bilinir ve örn., Yeast Genetic Engineering (Barr ve arkadaşları, eds., 1989) Butterworths, Londra'da tarif edilir.

RSV proteinlerini şifreleyen rekombinant yapılar, geleneksel yöntemler kullanılarak uygun vektörler halinde hazırlanabilir. Böcek veya memeli hücrelerinde rekombinant protein ekspresyonu için uygun bir çok vektör iyi bilinir ve bu konuda gelenekseldir. Uygun vektörler, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakilerden biri veya daha fazlası gibi birçok bileşen ihtiva edebilir: bir replikasyon kaynağı; bir seçilebilir marker gen; bir veya daha fazla ekspresyon kontrol elemanı, örn., bir transkripsiyonel kontrol elemanı (örn., bir promoter, bir güçlendirici, bir sonlandırıcı) ve/veya bir veya daha fazla translasyon sinyali; ve bir seçilen konakçı hücrede (örn., memeli kaynaklı veya bir heterolog memeliden veya memeli dışı türden) sekretuar yolağa hedefleme yapması için bir sinyal sekansı veya lider sekans. Örneğin böcek hücrelerinde ekspresyon durumunda rekombinant bakülovirüs partikülleri üretmek için uygun bir bakülovirüs ekspresyon vektörü, örn., pFastBac (Invitrogen) kullanılır. Bakülovirüs partikülleri amplifiye edilir ve rekombinant proteini eksprese etmesi için böcek hücrelerini enfekte etmede kullanılır. Memeli hücrelerinde ekspresyon durumunda, yapının arzu edilen

Diego CA'dan kit formunda ticari olarak temin edilebilir. Kuş hücresi ekspresyon sistemleri de bu konuda uzman kişilerce bilinir ve örn., ABD Patent No. 5,340,740; 5,656,479; 5,830,510; 6,114,168; ve 6,500,668; Avrupa Patenti No. EP 0787180B; Avrupa Patenti No. EP03291813.8 ;WO 03/043415; ve WO 03/076601'de tarif edilir. Benzer şekilde bakteriyel ve memeli hücresi ekspresyon sistemleri de bu konuda bilinir ve örn., Yeast Genetic Engineering (Barr ve arkadaşları, eds., 1989) Butterworths, Londra'da tarif edilir.

RSV proteinlerini şifreleyen rekombinant yapılar, geleneksel yöntemler kullanılarak uygun vektörler halinde hazırlanabilir. Böcek veya memeli hücrelerinde rekombinant protein ekspresyonu için uygun bir çok vektör iyi bilinir ve bu konuda gelenekseldir. Uygun vektörler, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakilerden biri veya daha fazlası gibi birçok bileşen ihtiva edebilir: bir replikasyon kaynağı; bir seçilebilir marker gen; bir veya daha fazla ekspresyon kontrol elemanı, örn., bir transkripsiyonel kontrol elemanı (örn., bir promoter, bir güçlendirici, bir sonlandırıcı) ve/veya bir veya daha fazla translasyon sinyali; ve bir seçilen konakçı hücrede (örn., memeli kaynaklı veya bir heterolog memeliden veya memeli dışı türden) sekretuar yolağa hedefleme yapması için bir sinyal sekansı veya lider sekans. Örneğin böcek hücrelerinde ekspresyon durumunda rekombinant bakülovirüs partikülleri üretmek için uygun bir bakülovirüs ekspresyon vektörü, örn., pFastBac (Invitrogen) kullanılır. Bakülovirüs partikülleri amplifiye edilir ve rekombinant proteini eksprese etmesi için böcek hücrelerini enfekte etmede kullanılır. Memeli hücrelerinde ekspresyon durumunda, yapının arzu edilen

memeli konakçı hücresinde (örn., Çin hamsteri yumurtalık hücreleri) ekspresyonunu yönlendirecek bir vektör kullanılır.

RSV proteinleri, uygun herhangi bir yöntem kullanılarak saflaştırılabilir. Örneğin RSV proteinlerinin immünoafinite kromatografisiyle saflaştırılmasına yönelik yöntemler, bu konuda bilinir. Ruiz-Arguello ve arkadaşları, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). İstenen proteinleri saflaştırmak için uygun yöntemler, örneğin çökeltme ve çeşitli kromatografi tipleri, örn., hidrofobik etkileşim, iyon değiştirme, afinite, şelatlama ve boyut dışlama, bu konuda iyi bilinir. Bu veya başka uygun yöntemlerden ikisi veya daha fazlası kullanılarak uygun saflaştırma şemaları oluşturulabilir. İstenirse RSV proteinleri, saflaştırmayı kolaylaştıran bir "takı", örn., bir epitop takısı veya bir HIS takısı içerebilir. Bu tür takılı proteinler, örneğin koşullu ortamlardan, şelatlama kromatografisi ya da afinite kromatografisiyle uygun şekilde saflaştırılabilir. İlave saflaştırma teknikleri arasında diafiltrasyon ve teğetsel akış filtrasyonu yer alır.

Proteinler, RSV sekanslarına ek olarak ilave sekanslar da içerebilir. Örneğin bir polipeptit, saflaştırmayı kolaylaştıracak bir sekans (örn., bir bağlayıcı ile veya onsuz bir poli-His sekansı) içerebilir. Benzer şekilde ekspresyon amaçlarına yönelik olarak doğal lider peptit, farklı birinin yerine konulabilir.

Bazı düzeneklerde RSV proteinleri, alfavirüsü replikon partikülleri (VRP) kullanılarak verilir. Proteini üretmek için bir RSV proteinini şifreleyen herhangi bir nükleotit sekansı kullanılabilir. Burada kullanıldığı gibi, “alfavirüsü” terimi, bu konuda geleneksel anlamına

memeli konakçı hücresinde (örn., Çin hamsteri yumurtalık hücreleri) ekspresyonunu yönlendirecek bir vektör kullanılır.

RSV proteinleri, uygun herhangi bir yöntem kullanılarak saflaştırılabilir. Örneğin RSV proteinlerinin immünoafinite kromatografisiyle saflaştırılmasına yönelik yöntemler, bu konuda bilinir. Ruiz-Arguello ve arkadaşları, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). İstenen proteinleri saflaştırmak için uygun yöntemler, örneğin çökeltme ve çeşitli kromatografi tipleri, örn., hidrofobik etkileşim, iyon değiştirme, afinite, şelatlama ve boyut dışlama, bu konuda iyi bilinir. Bu veya başka uygun yöntemlerden ikisi veya daha fazlası kullanılarak uygun saflaştırma şemaları oluşturulabilir. İstenirse RSV proteinleri, saflaştırmayı kolaylaştıran bir "takı", örn., bir epitop takısı veya bir HIS takısı içerebilir. Bu tür takılı proteinler, örneğin koşullu ortamlardan, şelatlama kromatografisi ya da afinite kromatografisiyle uygun şekilde saflaştırılabilir. İlave saflaştırma teknikleri arasında diafiltrasyon ve teğetsel akış filtrasyonu yer alır.

Proteinler, RSV sekanslarına ek olarak ilave sekanslar da içerebilir. Örneğin bir polipeptit, saflaştırmayı kolaylaştıracak bir sekans (örn., bir bağlayıcı ile veya onsuz bir poli-His sekansı) içerebilir. Benzer şekilde ekspresyon amaçlarına yönelik olarak doğal lider peptit, farklı birinin yerine konulabilir.

Bazı düzeneklerde RSV proteinleri, alfavirüsü replikon partikülleri (VRP) kullanılarak verilir. Proteini üretmek için bir RSV proteinini şifreleyen herhangi bir nükleotit sekansı kullanılabilir. Burada kullanıldığı gibi, “alfavirüsü” terimi, bu konuda geleneksel anlamına

sahiptir ve Venezuela at ensefalit virüsü (VEE; *örn.*, Trinidad eşeği, TC83CR, V3014, vb.), Semliki Forest virüsü (SFV), Sindbis virüsü, Ross River virüsü, Batıya özgü at ensefalit virüsü, Doğuya özgü at ensefalit virüsü, Chikungunya virüsü, S.A. AR86 virüsü, Everglades virüsü, Mucambo virüsü, Barmah Forest virüsü, Middelburg virüsü, Pixuna virüsü, O'nyong-nyong virüsü, Getah virüsü, Sagiyama virüsü, Bebaru virüsü, Mayaro virüsü, Una virüsü, Aura virüsü, Whataroa virüsü, Banbanki virüsü, Kyzylagach virüsü, Highlands J virüsü, Fort Morgan virüsü, Ndumu virüsü ve Buggy Creek virüsü gibi çeşitli türleri kapsar.

Bir "alfavirüsü replikon partikülü" (VRP) veya "replikon partikülü", alfavirüsü yapısal proteinleri ile paketlenmiş bir alfavirüsü replikonudur.

Bir "alfavirüsü replikonu" (veya "replikon"), bir hedef hücrede *in vivo* olarak kendi amplifikasyonunu yönlendirebilen bir RNA molekülüdür. Replikon, RNA amplifikasyonunu katalize eden polimeraz(lar)ı (nsPl, nsP2, nsP3, nsP4) şifreler ve şifrelenmiş polimeraz(lar) tarafından tanınan ve kullanılan, replikasyon için gerekli cis RNA sekanslarını ihtiva eder. Bir alfavirüsü replikonu tipik olarak aşağıda sıralanan elemanları ihtiva eder: kopyalama için cis'te gereken 5' viral sekansları, biyolojik olarak aktif alfavirüsü yapısal olmayan alfavirüs proteinlerini (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) şifreleyen sekanslar, kopyalama için cis'te gereken 3' viral sekansları ve bir poliadenilat yolu. Bir alfavirüsü replikonu ayrıca belirli düzeneklerde eksprese edilecek subgenomik fragmanın ve heterolog sekans(lar)ın viral transkripsiyonunu artırmak veya azaltmak için modifiye edilebilen

sahiptir ve Venezuela at ensefalit virüsü (VEE; *örn.*, Trinidad eşeği, TC83CR, V3014, vb.), Semliki Forest virüsü (SFV), Sindbis virüsü, Ross River virüsü, Batıya özgü at ensefalit virüsü, Doğuya özgü at ensefalit virüsü, Chikungunya virüsü, S.A. AR86 virüsü, Everglades virüsü, Mucambo virüsü, Barmah Forest virüsü, Middelburg virüsü, Pixuna virüsü, O'nyong-nyong virüsü, Getah virüsü, Sagiyama virüsü, Bebaru virüsü, Mayaro virüsü, Una virüsü, Aura virüsü, Whataroa virüsü, Banbanki virüsü, Kyzylagach virüsü, Highlands J virüsü, Fort Morgan virüsü, Ndumu virüsü ve Buggy Creek virüsü gibi çeşitli türleri kapsar.

Bir "alfavirüsü replikon partikülü" (VRP) veya "replikon partikülü", alfavirüsü yapısal proteinleri ile paketlenmiş bir alfavirüsü replikonudur.

Bir "alfavirüsü replikonu" (veya "replikon"), bir hedef hücrede *in vivo* olarak kendi amplifikasyonunu yönlendirebilen bir RNA molekülüdür. Replikon, RNA amplifikasyonunu katalize eden polimeraz(lar)ı (nsPl, nsP2, nsP3, nsP4) şifreler ve şifrelenmiş polimeraz(lar) tarafından tanınan ve kullanılan, replikasyon için gerekli cis RNA sekanslarını ihtiva eder. Bir alfavirüsü replikonu tipik olarak aşağıda sıralanan elemanları ihtiva eder: kopyalama için cis'te gereken 5' viral sekansları, biyolojik olarak aktif alfavirüsü yapısal olmayan alfavirüs proteinlerini (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) şifreleyen sekanslar, kopyalama için cis'te gereken 3' viral sekansları ve bir poliadenilat yolu. Bir alfavirüsü replikonu ayrıca belirli düzeneklerde eksprese edilecek subgenomik fragmanın ve heterolog sekans(lar)ın viral transkripsiyonunu artırmak veya azaltmak için modifiye edilebilen

heterolog nükleotit sekanslarının ekspresyonunu yönlendiren bir veya daha fazla viral altgenomik "bağlantı bölgesi" promoteri de içerebilir. Aşağıda tarif edildiği gibi başka kontrol elemanları da kullanılabilir.

VRP'leri üretmek için bir veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen alfavirüsü replikonları kullanılır. Bu tür alfavirüsü replikonları, bir veya daha fazla RSV proteinini veya bunların fragmanlarını şifreleyen sekanslar içerir. Bu sekanslar, bir alt genomik promoter, bir IRES (örn, EMCV, EV71) ve bir viral 2A sahası gibi, aynı veya farklı olabilen bir veya daha fazla uygun kontrol elemanına işlevsel olarak bağlanır. Uygun kontrol elemanlarının herhangi biri veya kombinasyonu, herhangi bir sırayla kullanılabilir.

Polisistronik vektörlerin kullanımı, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen nükleik asit sekanslarını istenen göreli miktarlarda sağlamanın verimli bir yoludur. Bir örnekte, bir tek alt genomik promoter, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekansa işlevsel olarak bağlanır ve bir IRES, iki kodlama sekansı arasında konumlandırılır. Bir başka örnekte, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, ayrı promoterlere işlevsel olarak bağlanır. Yine bir başka örnekte, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, tek bir promotere işlevsel olarak bağlanır. İki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, bir viral 2A sahasını şifreleyen bir nükleotit sekansı vasıtasıyla birbirine bağlanır ve böylece her iki RSV proteininin amino asit sekanslarını ihtiva eden tek bir amino asit zincirini şifreler. Bu bağlamda viral 2A sahası, orijinal poliproteinden iki RSV proteini üretmek için kullanılır.

heterolog nükleotit sekanslarının ekspresyonunu yönlendiren bir veya daha fazla viral altgenomik "bağlantı bölgesi" promoteri de içerebilir. Aşağıda tarif edildiği gibi başka kontrol elemanları da kullanılabilir.

VRP'leri üretmek için bir veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen alfavirüsü replikonları kullanılır. Bu tür alfavirüsü replikonları, bir veya daha fazla RSV proteinini veya bunların fragmanlarını şifreleyen sekanslar içerir. Bu sekanslar, bir alt genomik promoter, bir IRES (örn, EMCV, EV71) ve bir viral 2A sahası gibi, aynı veya farklı olabilen bir veya daha fazla uygun kontrol elemanına işlevsel olarak bağlanır. Uygun kontrol elemanlarının herhangi biri veya kombinasyonu, herhangi bir sırayla kullanılabilir.

Polisistronik vektörlerin kullanımı, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen nükleik asit sekanslarını istenen göreli miktarlarda sağlamanın verimli bir yoludur. Bir örnekte, bir tek alt genomik promoter, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekansa işlevsel olarak bağlanır ve bir IRES, iki kodlama sekansı arasında konumlandırılır. Bir başka örnekte, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, ayrı promoterlere işlevsel olarak bağlanır. Yine bir başka örnekte, iki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, tek bir promotere işlevsel olarak bağlanır. İki farklı RSV proteinini şifreleyen iki sekans, bir viral 2A sahasını şifreleyen bir nükleotit sekansı vasıtasıyla birbirine bağlanır ve böylece her iki RSV proteininin amino asit sekanslarını ihtiva eden tek bir amino asit zincirini şifreler. Bu bağlamda viral 2A sahası, orijinal poliproteinden iki RSV proteini üretmek için kullanılır.

Alt genomik Promoterler

Bağlantı bölgesi promoterleri olarak da bilinen alt enomik promoterler, protein ekspresyonunu regüle etmek için kullanılabilir. Alfaviral alt genomik promoterler, alfaviral yapısal proteinlerin ekspresyonunu regüle eder. Bakınız Strauss ve Strauss, "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution," Microbiol Rev. 1994 Sep;58(3):491-562. Bir polinükleotit, herhangi bir alfavirüsünden bir alt genomik promoter içerebilir. Örneğin bir polisistronik polinükleotit içerisinde iki veya daha fazla alt genomik promoter mevcut olduğu durumda promoterler aynı veya farklı olabilir. Örneğin alt genomik promoterl, CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA sekansına (SEK.KİM.NO:13) sahip olabilir. Belirli düzeneklerde alt genomik promoterler, proteinlerin viral transkripsiyonunu artırmak veya azaltmak için modifiye edilebilir. Bakınız ABD Patenti No. 6,592,874.

Dahili Ribozom Giriş Sahası (IRES)

Bazı düzeneklerde bir veya daha fazla kontrol elemanı, bir dahili ribozomal giriş sahasıdır (IRES). Bir IRES, tek bir mRNA transkriptinden çoklu proteinlerin yapılmasına izin verir, çünkü ribozomlar, her bir IRES'e bağlanır ve normalde translasyonu başlatmak için gerekli olan bir 5' başlığı olmadan translasyonu başlatır. Örneğin IRES, enterovirüs 71 (EV71) veya ensefalomiyokardit virüsünün (EMCV) klonlanmış genomundan elde edilebilir.

Alt genomik Promoterler

Bağlantı bölgesi promoterleri olarak da bilinen alt enomik promoterler, protein ekspresyonunu regüle etmek için kullanılabilir. Alfaviral alt genomik promoterler, alfaviral yapısal proteinlerin ekspresyonunu regüle eder. Bakınız Strauss ve Strauss, "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution," Microbiol Rev. 1994 Sep;58(3):491-562. Bir polinükleotit, herhangi bir alfavirüsünden bir alt genomik promoter içerebilir. Örneğin bir polisistronik polinükleotit içerisinde iki veya daha fazla alt genomik promoter mevcut olduğu durumda promoterler aynı veya farklı olabilir. Örneğin alt genomik promoterl, CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA sekansına (SEK.KİM.NO:13) sahip olabilir. Belirli düzeneklerde alt genomik promoterler, proteinlerin viral transkripsiyonunu artırmak veya azaltmak için modifiye edilebilir. Bakınız ABD Patenti No. 6,592,874.

Dahili Ribozom Giriş Sahası (IRES)

Bazı düzeneklerde bir veya daha fazla kontrol elemanı, bir dahili ribozomal giriş sahasıdır (IRES). Bir IRES, tek bir mRNA transkriptinden çoklu proteinlerin yapılmasına izin verir, çünkü ribozomlar, her bir IRES'e bağlanır ve normalde translasyonu başlatmak için gerekli olan bir 5' başlığı olmadan translasyonu başlatır. Örneğin IRES, enterovirüs 71 (EV71) veya ensefalomiyokardit virüsünün (EMCV) klonlanmış genomundan elde edilebilir.

Viral 2A Sahası

Ayak ve ağız hastalığı virüsü (FMDV) 2A proteini, FMDV'nin yapısal proteinlerini yapısal olmayan bir proteinden (FMDV 2B) ayırma görevi gören bir kısa peptittir. Bu peptit üzerinde yapılan önceki çalışmalar, bunun, bir otokatalitik proteaz olarak aktivite gösterdiğini işaret etmiştir ancak diğer çalışmalar (örn., Donnelly ve arkadaşları, (2001), J.Gen.Virol. 82, 1013-1025), FMDV 2B'ye ait bu kısa sekansın ve devamındaki tekli amino asidin, bir translasyonel durdurma-başlatma görevi gördüğünü işaret eder. Kesin etki tarzına bakılmaksızın sekans, iki polipeptit arasına sokulabilir ve tek bir açık okuma çerçevesinden çoklu münferit polipeptitlerin üretilmesi sağlanabilir. FMDV 2A sekansları, en az iki RSV proteinini şifreleyen sekanslar arasına sokularak bunların, tek bir açık okuma çerçevesinin bir parçası olarak sentezlenmeleri sağlanabilir. Örneğin, açık okuma çerçevesi, bir viral 2A sahasını şifreleyen bir sekansla ayrılan bir RL111 proteinini ve bir UL119 proteinini şifreleyebilir. Tek bir mRNA transkripte edildikten sonra translasyon adımı sırasında viral 2A sahasının aktivitesinden dolayı RL11 ve UL119 peptitleri ayrı olarak üretilir. Herhangi bir uygun viral 2A sekansı kullanılabilir. Sıklıkla, bir viral 2A sahası, Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro konsensüs sekansını içerir ki burada X, herhangi bir amino asittir. (SEK.KİM.NO:14). Örneğin, Ayak ve Ağız Hastalığı Virüsü 2A peptit sekansı, DVESNPGP'dir (SEK.KİM.NO:15). BakınızTrichas ve arkadaşları, "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice," BMC Biol. 15 Eylül 2008;6:40 ve Halpin ve arkadaşları, "Self-processing 2A-polyproteins--a system for co-

Viral 2A Sahası

Ayak ve ağız hastalığı virüsü (FMDV) 2A proteini, FMDV'nin yapısal proteinlerini yapısal olmayan bir proteinden (FMDV 2B) ayırma görevi gören bir kısa peptittir. Bu peptit üzerinde yapılan önceki çalışmalar, bunun, bir otokatalitik proteaz olarak aktivite gösterdiğini işaret etmiştir ancak diğer çalışmalar (örn., Donnelly ve arkadaşları, (2001), J.Gen.Virol. 82, 1013-1025), FMDV 2B'ye ait bu kısa sekansın ve devamındaki tekli amino asidin, bir translasyonel durdurma-başlatma görevi gördüğünü işaret eder. Kesin etki tarzına bakılmaksızın sekans, iki polipeptit arasına sokulabilir ve tek bir açık okuma çerçevesinden çoklu münferit polipeptitlerin üretilmesi sağlanabilir. FMDV 2A sekansları, en az iki RSV proteinini şifreleyen sekanslar arasına sokularak bunların, tek bir açık okuma çerçevesinin bir parçası olarak sentezlenmeleri sağlanabilir. Örneğin, açık okuma çerçevesi, bir viral 2A sahasını şifreleyen bir sekansla ayrılan bir RL111 proteinini ve bir UL119 proteinini şifreleyebilir. Tek bir mRNA transkripte edildikten sonra translasyon adımı sırasında viral 2A sahasının aktivitesinden dolayı RL11 ve UL119 peptitleri ayrı olarak üretilir. Herhangi bir uygun viral 2A sekansı kullanılabilir. Sıklıkla, bir viral 2A sahası, Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro konsensüs sekansını içerir ki burada X, herhangi bir amino asittir. (SEK.KİM.NO:14). Örneğin, Ayak ve Ağız Hastalığı Virüsü 2A peptit sekansı, DVESNPGP'dir (SEK.KİM.NO:15). BakınızTrichas ve arkadaşları, "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice," BMC Biol. 15 Eylül 2008;6:40 ve Halpin ve arkadaşları, "Self-processing 2A-polyproteins--a system for co-

ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants," Plant J. Şubat 1999;17(4):453-9.

Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü replikonu, bir VEE-Sindbis kimerik replikonu (VCR) veya bir VEE suşu TC83 replikonu (TC83R) veya bir TC83-Sindbis kimerik replikonu (TC83CR) veya bir VEE suşu V3014 replikonu gibi kimerik bir replikondur. Bazı düzeneklerde bir VCR, paketleme sinyali ve nsP3'teki sekanslar yerine ve VEE replikonunun 3' ucunda bir Sinbis replikonundan 3' UTR ihtiva eder; bakınız Perri ve arkadaşları, J. Virol. 77, 10394-403, 2003. Bazı düzeneklerde bir TC83CR, paketleme sinyali ve nsP3'teki sekanslar yerine ve bir VEE suşu TC83 replikonunun 3' ucunda bir Sindbis replikonundan 3' UTR ihtiva eder.

VRPlerin Üretimi

VRPleri hazırlamaya yönelik yöntemler, bu konuda iyi bilinir. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü, bir paketleme hücresi kullanılarak bir VRP içine monte edilir. Bir "alfavirüsü paketleme hücresi" (veya "paketleme hücresi"), bir veya daha fazla alfavirüsü yapısal protein ekspresyon kaseti ihtiva eden ve bir alfavirüsü replikonu dahil edildikten sonra rekombinant alfavirüsü partikülleri üreten bir hücre, ökaryotik katmanlı vektör başlatma sistemi (*örn.*, ABD Patenti 5,814,482) veya rekombinant alfavirüsü partikülüdür. Bir veya daha fazla farklı alfavirüsü yapısal proteini kaseti, alfavirüsü yapısal proteinleri temin etmekle "yardımcılar" olarak görev yapar. Bir "alfavirüsü yapısal proteini kaseti", bir veya daha fazla alfavirüsü yapısal proteinini şifreleyen ve bir alfavirüsü replikaz tanıma

ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants," Plant J. Şubat 1999;17(4):453-9.

Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü replikonu, bir VEE-Sindbis kimerik replikonu (VCR) veya bir VEE suşu TC83 replikonu (TC83R) veya bir TC83-Sindbis kimerik replikonu (TC83CR) veya bir VEE suşu V3014 replikonu gibi kimerik bir replikondur. Bazı düzeneklerde bir VCR, paketleme sinyali ve nsP3'teki sekanslar yerine ve VEE replikonunun 3' ucunda bir Sinbis replikonundan 3' UTR ihtiva eder; bakınız Perri ve arkadaşları, J. Virol. 77, 10394-403, 2003. Bazı düzeneklerde bir TC83CR, paketleme sinyali ve nsP3'teki sekanslar yerine ve bir VEE suşu TC83 replikonunun 3' ucunda bir Sindbis replikonundan 3' UTR ihtiva eder.

VRPlerin Üretimi

VRPleri hazırlamaya yönelik yöntemler, bu konuda iyi bilinir. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü, bir paketleme hücresi kullanılarak bir VRP içine monte edilir. Bir "alfavirüsü paketleme hücresi" (veya "paketleme hücresi"), bir veya daha fazla alfavirüsü yapısal protein ekspresyon kaseti ihtiva eden ve bir alfavirüsü replikonu dahil edildikten sonra rekombinant alfavirüsü partikülleri üreten bir hücre, ökaryotik katmanlı vektör başlatma sistemi (*örn.*, ABD Patenti 5,814,482) veya rekombinant alfavirüsü partikülüdür. Bir veya daha fazla farklı alfavirüsü yapısal proteini kaseti, alfavirüsü yapısal proteinleri temin etmekle "yardımcılar" olarak görev yapar. Bir "alfavirüsü yapısal proteini kaseti", bir veya daha fazla alfavirüsü yapısal proteinini şifreleyen ve bir alfavirüsü replikaz tanıma

sekansının en az bir ve en fazla beş kopyasını (yani 1, 2, 3, 4 veya 5) içeren bir ekspresyon kasetidir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri tipik olarak 5''den 3''ye kadar, alfavirüsü RNA'sının transkripsiyonunu başlatan bir 5' sekansı, bir opsiyonel alfavirüsü alt genomik bölge promoteri, alfavirüsü yapısal proteinini şifreleyen bir nükleotit sekansı, bir 3' translate edilmemiş bölgesi (aynı zamanda RNA transkripsiyonunu da yönlendirir) ve bir poliA yolu içerir. Bakınız, örneğin WO 2010/019437.

Bir düzenekte bir replikasyona muktedir virüs üretebilecek rekombinasyon olaylarını en aza indirmek için bir paketleme hücresinde iki farklı alfavirüsü yapısal protein kaseti ("bölünmüş" kusurlu yardımcılar) kullanılır. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal proteini kaseti, kapsid proteinini (C) şifreler ancak glikoproteinlerden (E2 ve E1) herhangi birini şifrelemez. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, kapsid proteinini ve E1 veya E2 glikoproteinlerinden birini (fakat her ikisini de değil) şifreler. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, E2 ve E1 glikoproteinlerini şifreler ancak kapsid proteinini şifrelemez. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, E1 veya E2 glikoproteinini (fakat her ikisini de değil) şifreler ve kapsid proteinini şifrelemez.

Bazı düzeneklerde VRP'ler, replikonların ve yardımcı RNA'ların çeşitli kaynaklardan hücreler içerisine aynı anda dahil edilmesiyle üretilir. Bu koşullar altında, örneğin, BHKV veya Vero hücreleri ($1x10^7$), örneğin, 220 volt, 1000μF, 10μg replikon RNA'sı: 6μg kusurlu yardımcı Cap RNA:10μg kusurlu yardımcı Gly RNA ile 2

sekansının en az bir ve en fazla beş kopyasını (yani 1, 2, 3, 4 veya 5) içeren bir ekspresyon kasetidir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri tipik olarak 5''den 3''ye kadar, alfavirüsü RNA'sının transkripsiyonunu başlatan bir 5' sekansı, bir opsiyonel alfavirüsü alt genomik bölge promoteri, alfavirüsü yapısal proteinini şifreleyen bir nükleotit sekansı, bir 3' translate edilmemiş bölgesi (aynı zamanda RNA transkripsiyonunu da yönlendirir) ve bir poliA yolu içerir. Bakınız, örneğin WO 2010/019437.

Bir düzenekte bir replikasyona muktedir virüs üretebilecek rekombinasyon olaylarını en aza indirmek için bir paketleme hücresinde iki farklı alfavirüsü yapısal protein kaseti ("bölünmüş" kusurlu yardımcılar) kullanılır. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal proteini kaseti, kapsid proteinini (C) şifreler ancak glikoproteinlerden (E2 ve E1) herhangi birini şifrelemez. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, kapsid proteinini ve E1 veya E2 glikoproteinlerinden birini (fakat her ikisini de değil) şifreler. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, E2 ve E1 glikoproteinlerini şifreler ancak kapsid proteinini şifrelemez. Bazı düzeneklerde bir alfavirüsü yapısal protein kaseti, E1 veya E2 glikoproteinini (fakat her ikisini de değil) şifreler ve kapsid proteinini şifrelemez.

Bazı düzeneklerde VRP'ler, replikonların ve yardımcı RNA'ların çeşitli kaynaklardan hücreler içerisine aynı anda dahil edilmesiyle üretilir. Bu koşullar altında, örneğin, BHKV veya Vero hücreleri ($1x10^7$), örneğin, 220 volt, 1000μF, 10μg replikon RNA'sı: 6μg kusurlu yardımcı Cap RNA:10μg kusurlu yardımcı Gly RNA ile 2

manuel pulsta elektroporate edilir; VRP içerikli süpernatan veya VRPlerin birleştirilmiş olduğu hücreler, 24 saat sonra toplanır. Replikonlar ve/veya yardımcılar, transfekte edilmiş hücreler içine uygun RNA'lar veren DNA formlarına da dahil edilebilir.

Bir paketleme hücresi, bir memeli hücresi veya bir böcek (örn., SF9) veya kuş hücresi (örn., bir birincil civciv veya ördek fibroblastı veya fibroblast hücre çizgisi) gibi memeli dışı bir hücre olabilir. Bakınız ABD Patenti 7,445,924. Kuş hücresi kaynakları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, EB66® (VIVALIS) gbi kuş embriyonik kök hücreleri; EBx® hücreleri gibi tavuk embriyonik kök hücreleri, tavuk embriyonik fibroblastları ve tavuk embriyonik germ hücreleri dahil olmak üzere tavuk hücreleri; AGE1.CR ve AGE1.CR.pIX hücre çizgileri (ProBioGen) gibi örneğin Vaccine 27:4975-4982 (2009) ve WO2005/042728'de tarif edilen ördek hücreleri; ve kaz hücreleri yer alır. Bazı düzeneklerde bir paketleme hücresi, bir birincil ördek fibroblastı veya AGE.CR (PROBIOGEN) gibi ördek retinal hücre çizgisidir.

Eş zamanlı nükleik asit dahil edilmesi için olan hücrelerin ve/veya paketleme hücrelerinin memeli kaynakları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, insan veya insan dışı primat hücreleri, örneğin WO 01/38362 ve WO 02/40665'te tarif edilen ve ayrıca ECACC bırakma numarası 96022940 altında bırakılmış olan PerC6 (PER.C6) hücreleri (CRUCELL N.V.); MRC-5 (ATCC CCL-171); WI-38 (ATCC CCL-75); fetal resus akciğer hücreleri (ATCC CL-160); insan embriyonik böbrek hücreleri (*örn.*, tipik olarak kırpılmış adenovirüs tip 5 DNA'sı tarafından transforme edilen 293 hücreleri; maymun böbreklerinden VERO hücreleri; at, inek (*örn.*, MDBK hücreleri), koyun, köpek (*örn.*,

manuel pulsta elektroporate edilir; VRP içerikli süpernatan veya VRPlerin birleştirilmiş olduğu hücreler, 24 saat sonra toplanır. Replikonlar ve/veya yardımcılar, transfekte edilmiş hücreler içine uygun RNA'lar veren DNA formlarına da dahil edilebilir.

Bir paketleme hücresi, bir memeli hücresi veya bir böcek (örn., SF9) veya kuş hücresi (örn., bir birincil civciv veya ördek fibroblastı veya fibroblast hücre çizgisi) gibi memeli dışı bir hücre olabilir. Bakınız ABD Patenti 7,445,924. Kuş hücresi kaynakları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, EB66® (VIVALIS) gbi kuş embriyonik kök hücreleri; EBx® hücreleri gibi tavuk embriyonik kök hücreleri, tavuk embriyonik fibroblastları ve tavuk embriyonik germ hücreleri dahil olmak üzere tavuk hücreleri; AGE1.CR ve AGE1.CR.pIX hücre çizgileri (ProBioGen) gibi örneğin Vaccine 27:4975-4982 (2009) ve WO2005/042728'de tarif edilen ördek hücreleri; ve kaz hücreleri yer alır. Bazı düzeneklerde bir paketleme hücresi, bir birincil ördek fibroblastı veya AGE.CR (PROBIOGEN) gibi ördek retinal hücre çizgisidir.

Eş zamanlı nükleik asit dahil edilmesi için olan hücrelerin ve/veya paketleme hücrelerinin memeli kaynakları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, insan veya insan dışı primat hücreleri, örneğin WO 01/38362 ve WO 02/40665'te tarif edilen ve ayrıca ECACC bırakma numarası 96022940 altında bırakılmış olan PerC6 (PER.C6) hücreleri (CRUCELL N.V.); MRC-5 (ATCC CCL-171); WI-38 (ATCC CCL-75); fetal resus akciğer hücreleri (ATCC CL-160); insan embriyonik böbrek hücreleri (*örn.*, tipik olarak kırpılmış adenovirüs tip 5 DNA'sı tarafından transforme edilen 293 hücreleri; maymun böbreklerinden VERO hücreleri; at, inek (*örn.*, MDBK hücreleri), koyun, köpek (*örn.*,

köpek böbreklerinden MDCK hücreleri, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) veya MDCK 33016, WO 97/37001'de tarif edildiği gibi bırakma numarası DSM ACC 2219); kedi ve kemirgen hücreleri (*örn.*, hamster hücreleri, örn., BHK21-F, HKCC hücreleri veya Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri) yer alır ve bunlar, örneğin yetişkin, neonatal, fetal ve embriyo dahil olmak üzere çok çeşitli gelişim evrelerinden elde edilebilir.

Bazı düzeneklerde bir paketleme hücresi, bir veya daha fazla yapısal protein ekspresyon kaseti ile stabil şekilde transforme edilir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri, transferrin-polikatyon aracılı DNA transferi, çıplak veya kapsüle edilmiş nükleik asitler ile transfeksiyon, lipozom aracılı hücresel füzyon, DNA kaplı lateks tanelerinin hücre içi nakli, protoplast füzyonu, viral enfeksiyon, elektroporasyon, "gen tabancası" yöntemleri ve DEAE veya kalsiyum fosfat aracılı transfeksiyon dahil olmak üzere standart rekombinant DNA teknikleri kullanılarak hücreler içerisine dahil edilebilir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri tipik olarak bir konakçı hücre içerisine DNA molekülleri şeklinde dahil edilir ancak ayrıca *in vitro* transkripte edilmiş RNA şeklinde de dahil edilebilir. Her bir ekspresyon kaseti ayrı ayrı veya önemli ölçüde aynı anda dahil edilebilir.

Bazı düzeneklerde stabil alfavirüsü paketleme hücre çizgileri, rekombinant alfavirüsü partikülleri üretmek için kullanılır. Bunlar, genomlarına stabil bir şekilde entegre edilmiş kusurlu yardımcı RNA'yı eksprese eden DNA kasetlerini içeren, alfavirüsü izinli hücrelerdir. Bakınız Polo ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 96, 4598-603, 1999. Örneğin bir düzenekte yardımcı RNAlar

köpek böbreklerinden MDCK hücreleri, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) veya MDCK 33016, WO 97/37001'de tarif edildiği gibi bırakma numarası DSM ACC 2219); kedi ve kemirgen hücreleri (*örn.*, hamster hücreleri, örn., BHK21-F, HKCC hücreleri veya Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri) yer alır ve bunlar, örneğin yetişkin, neonatal, fetal ve embriyo dahil olmak üzere çok çeşitli gelişim evrelerinden elde edilebilir.

Bazı düzeneklerde bir paketleme hücresi, bir veya daha fazla yapısal protein ekspresyon kaseti ile stabil şekilde transforme edilir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri, transferrin-polikatyon aracılı DNA transferi, çıplak veya kapsüle edilmiş nükleik asitler ile transfeksiyon, lipozom aracılı hücresel füzyon, DNA kaplı lateks tanelerinin hücre içi nakli, protoplast füzyonu, viral enfeksiyon, elektroporasyon, "gen tabancası" yöntemleri ve DEAE veya kalsiyum fosfat aracılı transfeksiyon dahil olmak üzere standart rekombinant DNA teknikleri kullanılarak hücreler içerisine dahil edilebilir. Yapısal protein ekspresyon kasetleri tipik olarak bir konakçı hücre içerisine DNA molekülleri şeklinde dahil edilir ancak ayrıca *in vitro* transkripte edilmiş RNA şeklinde de dahil edilebilir. Her bir ekspresyon kaseti ayrı ayrı veya önemli ölçüde aynı anda dahil edilebilir.

Bazı düzeneklerde stabil alfavirüsü paketleme hücre çizgileri, rekombinant alfavirüsü partikülleri üretmek için kullanılır. Bunlar, genomlarına stabil bir şekilde entegre edilmiş kusurlu yardımcı RNA'yı eksprese eden DNA kasetlerini içeren, alfavirüsü izinli hücrelerdir. Bakınız Polo ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 96, 4598-603, 1999. Örneğin bir düzenekte yardımcı RNAlar

konstitütif şekilde eksprese edilir ancak alfavirüsü yapısal proteinleri edilmez çünkü genler, bir alfavirüsü alt genomik promoterinin kontrolü altındadır (Polo *ve arkadaşları.*, 1999). Bir başka düzenekte alt genomik promoter, yardımcı RNAlarda yapısal protein ekspresyonunu yönlendirmek için kullanılmaz. Bir alfavirüsü replikonunun, transfeksiyonla veya VRP enfeksiyonuyla bir paketleme hücresinin genomuna dahil edilmesi üzerine replikaz enzimleri üretilir ve bunlar, yardımcı RNAlar üzerinde kapsid ve glikoprotein genlerinin ekspresyonunu tetikler ve nihai VRPler üretilir. Replikonun dahil edilmesi, alfavirüsü replikon partiküllerini içeren bir tohum stoku ile hem transfeksiyonu hem de enfeksiyonu kapsayan çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Paketleme hücresi daha sonra kültür süpernatanında paketlenmiş alfavirüsü replikon partikülleri üretmek için yeterli koşullar altında ve süreyle inkübe edilir.

Böylece paketleme hücreleri, VRP'lerin kendi kendine yayılan virüsler olarak davranmalarına izin verir. Bu teknoloji, VRP'lerin, canlı atenüe edilmiş aşılar veya adenovirüs E1A ve E1B genlerini eksprese eden hücrelerde büyütülen, replikasyona muktedir olmayan adenovirüs vektörleri gibi üreticinin mevcut hücre çizgilerine sahip başka viral vektörler için kullanılanlarla olanlarla hemen hemen aynı şekilde ve aynı ekipman kullanarak üretilmesine izin verir.

Bazı düzeneklerde iki adımlı bir proses kullanılır: birinci adım, alfavirüsü replikon partikülleri içeren bir tohum stokunun, bir paketleme hücresini bir plazmid DNA'sı bazlı replikon ile transfekte etmek suretiyle üretilmesini kapsar. Daha sonra bir ikinci adımda,

konstitütif şekilde eksprese edilir ancak alfavirüsü yapısal proteinleri edilmez çünkü genler, bir alfavirüsü alt genomik promoterinin kontrolü altındadır (Polo *ve arkadaşları.*, 1999). Bir başka düzenekte alt genomik promoter, yardımcı RNAlarda yapısal protein ekspresyonunu yönlendirmek için kullanılmaz. Bir alfavirüsü replikonunun, transfeksiyonla veya VRP enfeksiyonuyla bir paketleme hücresinin genomuna dahil edilmesi üzerine replikaz enzimleri üretilir ve bunlar, yardımcı RNAlar üzerinde kapsid ve glikoprotein genlerinin ekspresyonunu tetikler ve nihai VRPler üretilir. Replikonun dahil edilmesi, alfavirüsü replikon partiküllerini içeren bir tohum stoku ile hem transfeksiyonu hem de enfeksiyonu kapsayan çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Paketleme hücresi daha sonra kültür süpernatanında paketlenmiş alfavirüsü replikon partikülleri üretmek için yeterli koşullar altında ve süreyle inkübe edilir.

Böylece paketleme hücreleri, VRP'lerin kendi kendine yayılan virüsler olarak davranmalarına izin verir. Bu teknoloji, VRP'lerin, canlı atenüe edilmiş aşılar veya adenovirüs E1A ve E1B genlerini eksprese eden hücrelerde büyütülen, replikasyona muktedir olmayan adenovirüs vektörleri gibi üreticinin mevcut hücre çizgilerine sahip başka viral vektörler için kullanılanlarla olanlarla hemen hemen aynı şekilde ve aynı ekipman kullanarak üretilmesine izin verir.

Bazı düzeneklerde iki adımlı bir proses kullanılır: birinci adım, alfavirüsü replikon partikülleri içeren bir tohum stokunun, bir paketleme hücresini bir plazmid DNA'sı bazlı replikon ile transfekte etmek suretiyle üretilmesini kapsar. Daha sonra bir ikinci adımda,

paketleme hücrelerinin taze bir kültürünü tohum stoku ile enfekte etmek suretiyle çok daha büyük bir replikon partikülleri stoku üretilir. Bu enfeksiyon, bir MOI =0.00001, 0.00005, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3, 5, 10 veya 20 de dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyon dereceleri (MOI) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bazı düzeneklerde enfeksiyon, düşük bir MOI'da (örn., 1'in altında) gerçekleştirilir. Zaman içinde replikon partikülleri, tohum stoku ile enfekte edilmiş paketleme hücrelerinden hasat edilebilir. Bazı düzeneklerde replikon partikülleri daha sonra tekrarlamalı düşük enfeksiyon derecesiyle naif paketleme hücrelerinin daha da büyük kültürleri halinde geçiş yaptırılabilir, böylelikle aynı yüksek titerle ticari ölçekte preparasyonlar meydana gelir.

Nükleik Asit Kompozisyonları

Bir veya daha fazla RSV proteini veya fragmanını şifreleyen rekombinant nükleik asit molekülleri uygulanarak şifrelenmiş RSV proteinlerinin veya fragmanlarının üretimi ve buna bir immün yanıt indüklenebilir. Rekombinant nükleik asit, DNA (örn., plazmid veya viral DNA) veya RNA, tercihen kendi kendini kopyalayan RNA gibi arzu edilen herhangi bir nükleik aside dayanabilir ve monosistronik veya polisistronik olabilir. Herhangi bir uygun DNA veya RNA, RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen açık okuma çerçevelerini taşıyan nükleik asit vektörü olarak kullanılabilir. Uygun nükleik asit vektörleri, bir veya daha fazla RSV proteininin veya fragmanının ekspresyonunu taşıma ve tahrik etme kapasitesine sahiptir. Bu tür nükleik asit vektörleri, bu konuda bilinir ve bunlar arasında, örneğin, plazmidler, vaksinia virüs vektörleri gibi DNA

paketleme hücrelerinin taze bir kültürünü tohum stoku ile enfekte etmek suretiyle çok daha büyük bir replikon partikülleri stoku üretilir. Bu enfeksiyon, bir MOI =0.00001, 0.00005, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3, 5, 10 veya 20 de dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyon dereceleri (MOI) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bazı düzeneklerde enfeksiyon, düşük bir MOI'da (örn., 1'in altında) gerçekleştirilir. Zaman içinde replikon partikülleri, tohum stoku ile enfekte edilmiş paketleme hücrelerinden hasat edilebilir. Bazı düzeneklerde replikon partikülleri daha sonra tekrarlamalı düşük enfeksiyon derecesiyle naif paketleme hücrelerinin daha da büyük kültürleri halinde geçiş yaptırılabilir, böylelikle aynı yüksek titerle ticari ölçekte preparasyonlar meydana gelir.

Nükleik Asit Kompozisyonları

Bir veya daha fazla RSV proteini veya fragmanını şifreleyen rekombinant nükleik asit molekülleri uygulanarak şifrelenmiş RSV proteinlerinin veya fragmanlarının üretimi ve buna bir immün yanıt indüklenebilir. Rekombinant nükleik asit, DNA (örn., plazmid veya viral DNA) veya RNA, tercihen kendi kendini kopyalayan RNA gibi arzu edilen herhangi bir nükleik aside dayanabilir ve monosistronik veya polisistronik olabilir. Herhangi bir uygun DNA veya RNA, RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen açık okuma çerçevelerini taşıyan nükleik asit vektörü olarak kullanılabilir. Uygun nükleik asit vektörleri, bir veya daha fazla RSV proteininin veya fragmanının ekspresyonunu taşıma ve tahrik etme kapasitesine sahiptir. Bu tür nükleik asit vektörleri, bu konuda bilinir ve bunlar arasında, örneğin, plazmidler, vaksinia virüs vektörleri gibi DNA

virüslerinden elde edilen DNA (örn., NYVAC, bakınız US 5,494,807), adenovirüs vektörleri ve poksvirüsü vektörleri (örn., ALVAC kanarya çiçeği vektörü, Sanofi Pasteur) ve alfavirüsü gibi uygun RNA virüslerinden elde edilen RNA yer alır. Arzu edilirse rekombinant nükleik asit molekülü modifiye edilebilir, örn., burada da tarif edildiği gibi modifiye edilmiş nükleobazlar ve/veya bağlantılar ihtiva edebilir.

Polisistronik olan rekombinant nükleik asit molekülleri, bir hücreye, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen sekanslar verilmesinin ve örneğin *in vivo* iki veya daha fazla RSV proteini ihtiva eden bir protein kompleksi oluşmasını sağlamak için yeterli seviyelerde RSV proteinleri ekspresyonunun tahrik edilmesinin avantajını sunar. Bu yaklaşım kullanılarak, bir kompleks oluşturan iki veya daha fazla şifrelenmiş RSV proteini, RSV protein komplekslerinin oluşturulması için yeterli hücre içi seviyelerde eksprese edilebilir. Örneğin, şifrelenmiş RSV proteinleri veya bunların fragmanları, önemli ölçüde aynı seviyede veya istenirse uygun ekspresyon kontrol sekanslarının (örn., promoterler, IRES, 2A sahası, vb.) seçilmesiyle farklı seviyelerde eksprese edilebilir. Bu, *in vivo* protein kompleksleri üretmenin, farklı RSVleri şifreleyen iki veya daha fazla münferit DNA molekülünün aynı hücreye birlikte verilmesinden ki bu, verimsiz ve yüksek düzeyde değişken olabilir, anlamlı şekilde daha verimli bir yoludur. Bakınız, örneğin WO 2004/076645.

Burada tarif edilen "kendi kendini kopyalayan" nükleik asitlere de mucitler tarafından ve burada "kendi kendini amplifiye eden" şeklinde gönderme yapılır. Kendi kendini kopyalayan ve kendi kendini amplifiye eden terimlerinin aynı anlama gelmesi amaçlanır.

virüslerinden elde edilen DNA (örn., NYVAC, bakınız US 5,494,807), adenovirüs vektörleri ve poksvirüsü vektörleri (örn., ALVAC kanarya çiçeği vektörü, Sanofi Pasteur) ve alfavirüsü gibi uygun RNA virüslerinden elde edilen RNA yer alır. Arzu edilirse rekombinant nükleik asit molekülü modifiye edilebilir, örn., burada da tarif edildiği gibi modifiye edilmiş nükleobazlar ve/veya bağlantılar ihtiva edebilir.

Polisistronik olan rekombinant nükleik asit molekülleri, bir hücreye, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen sekanslar verilmesinin ve örneğin *in vivo* iki veya daha fazla RSV proteini ihtiva eden bir protein kompleksi oluşmasını sağlamak için yeterli seviyelerde RSV proteinleri ekspresyonunun tahrik edilmesinin avantajını sunar. Bu yaklaşım kullanılarak, bir kompleks oluşturan iki veya daha fazla şifrelenmiş RSV proteini, RSV protein komplekslerinin oluşturulması için yeterli hücre içi seviyelerde eksprese edilebilir. Örneğin, şifrelenmiş RSV proteinleri veya bunların fragmanları, önemli ölçüde aynı seviyede veya istenirse uygun ekspresyon kontrol sekanslarının (örn., promoterler, IRES, 2A sahası, vb.) seçilmesiyle farklı seviyelerde eksprese edilebilir. Bu, *in vivo* protein kompleksleri üretmenin, farklı RSVleri şifreleyen iki veya daha fazla münferit DNA molekülünün aynı hücreye birlikte verilmesinden ki bu, verimsiz ve yüksek düzeyde değişken olabilir, anlamlı şekilde daha verimli bir yoludur. Bakınız, örneğin WO 2004/076645.

Burada tarif edilen "kendi kendini kopyalayan" nükleik asitlere de mucitler tarafından ve burada "kendi kendini amplifiye eden" şeklinde gönderme yapılır. Kendi kendini kopyalayan ve kendi kendini amplifiye eden terimlerinin aynı anlama gelmesi amaçlanır.

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA virüslerinin genomik RNA'sına dayanır ancak bir veya daha fazla yapısal proteini şifreleyen genlerden yoksundur. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA virüsünün yapısal olmayan proteinlerini ve kendi kendini kopyalayan RNA tarafından şifrelenen RSV proteinlerini üretmek için translate edilebilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA genel olarak viral replikaz, viral proteazlar, viral helikazlar ve diğer yapısal olmayan viral proteinlerin oluşturduğu gruptan seçilen en az bir veya daha fazla gen ihtiva eder ve aynı zamanda 5' ve 3' ucu cis-aktif replikasyon sekansları ve iki veya daha fazla arzu edilen RSV proteinini şifreleyen bir heterolog sekans da içerir. Heterolog sekans(lar)ın ekspresyonunu yönlendiren bir alt genomik promoter, kendi kendini kopyalayan RNA'ya dahil edilebilir. Arzu edilirse bir heterolog sekans, kendi kendini kopyalayan RNA'daki diğer kodlama bölgelerine çerçeve halinde füzyonla birleştirilebilir. AM-vac, bir dahili ribozom giriş sahasının (IRES) kontrolü altında olabilir.

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, enfeksiyöz viral partiküllerin üretimini indükleyemeyecek şekilde tasarlanabilir. Bu, örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA'da viral partiküllerin üretimi için gereken yapısal proteinleri şifreleyen bir veya daha fazla viral genin atlanmasıyla sağlanabilir. Örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün, Sindbis virüsü (SIN), Semliki forest virüsü ve Venezuela at ensefalit virüsü (VEE) gibi bir alfa virüsüne dayandığı durumda kapsid ve/veya

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA virüslerinin genomik RNA'sına dayanır ancak bir veya daha fazla yapısal proteini şifreleyen genlerden yoksundur. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA virüsünün yapısal olmayan proteinlerini ve kendi kendini kopyalayan RNA tarafından şifrelenen RSV proteinlerini üretmek için translate edilebilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA genel olarak viral replikaz, viral proteazlar, viral helikazlar ve diğer yapısal olmayan viral proteinlerin oluşturduğu gruptan seçilen en az bir veya daha fazla gen ihtiva eder ve aynı zamanda 5' ve 3' ucu cis-aktif replikasyon sekansları ve iki veya daha fazla arzu edilen RSV proteinini şifreleyen bir heterolog sekans da içerir. Heterolog sekans(lar)ın ekspresyonunu yönlendiren bir alt genomik promoter, kendi kendini kopyalayan RNA'ya dahil edilebilir. Arzu edilirse bir heterolog sekans, kendi kendini kopyalayan RNA'daki diğer kodlama bölgelerine çerçeve halinde füzyonla birleştirilebilir. AM-vac, bir dahili ribozom giriş sahasının (IRES) kontrolü altında olabilir.

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, enfeksiyöz viral partiküllerin üretimini indükleyemeyecek şekilde tasarlanabilir. Bu, örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA'da viral partiküllerin üretimi için gereken yapısal proteinleri şifreleyen bir veya daha fazla viral genin atlanmasıyla sağlanabilir. Örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün, Sindbis virüsü (SIN), Semliki forest virüsü ve Venezuela at ensefalit virüsü (VEE) gibi bir alfa virüsüne dayandığı durumda kapsid ve/veya

zarf glikoproteinleri gibi viral yapısal proteinleri şifreleyen bir veya daha fazla gen atlanabilir. Arzu edilirse buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, atenüe edilmiş veya virülan nitelikteki enfeksiyöz viral partiküllerin üretimini indükleyecek veya müteakiben tek bir raund enfeksiyon yapabilen viral partikülleri üretecek şekilde tasarlanabilir.

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, herhangi bir protein olmadan bile bir omurgalı hücresine verildiği durumda, kendisinden (veya kendisinin bir antisens kopyasından) transkripsiyon yoluyla çoklu yavru RNAlar üretilmesine yol açabilir. Kendi kendini kopyalayan RNA, bir hücreye verildikten sonra doğrudan translate edilebilir ve bu translasyon, verilen RNA'dan transkriptler üreten bir RNA bağımlı RNA polimerazı sağlar. Böylece verilen RNA, çoklu yavru RNAların üretilmesine yol açar. Bu transkriptler, verilen RNA'ya göre antisenstir ve kendi başlarına translate edilerek şifrelenmiş RSV proteininin yerinde eksprese olmasını sağlayabilir veya şifrelenmiş RSV protein(ler)inin yerinde eksprese olmasını sağlayacak şekilde translate edilen, verilen RNA ile aynı senslikte başka transkriptler sağlamak için transkripte edilebilir.

Kendi kendini kopyalama elde etmek için uygun bir sistem, burada tarif edildiği gibi bir alfavirüsü replikonu gibi alfavirüsü bazlı bir RNA replikonu kullanılmasıdır. Bu + iplikçikli replikonlar, bir hücreye verildikten sonra translate edilerek bir replikaz (veya replikaz-transkriptaz) elde edilir. Replikaz, bir poliprotein olarak translate edilir ki bu, oto-klivaj olmak suretiyle verilen + iplikçikli RNA'nın genomik - iplikçikli kopyalarını yaratan bir replikasyon

zarf glikoproteinleri gibi viral yapısal proteinleri şifreleyen bir veya daha fazla gen atlanabilir. Arzu edilirse buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, atenüe edilmiş veya virülan nitelikteki enfeksiyöz viral partiküllerin üretimini indükleyecek veya müteakiben tek bir raund enfeksiyon yapabilen viral partikülleri üretecek şekilde tasarlanabilir.

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, herhangi bir protein olmadan bile bir omurgalı hücresine verildiği durumda, kendisinden (veya kendisinin bir antisens kopyasından) transkripsiyon yoluyla çoklu yavru RNAlar üretilmesine yol açabilir. Kendi kendini kopyalayan RNA, bir hücreye verildikten sonra doğrudan translate edilebilir ve bu translasyon, verilen RNA'dan transkriptler üreten bir RNA bağımlı RNA polimerazı sağlar. Böylece verilen RNA, çoklu yavru RNAların üretilmesine yol açar. Bu transkriptler, verilen RNA'ya göre antisenstir ve kendi başlarına translate edilerek şifrelenmiş RSV proteininin yerinde eksprese olmasını sağlayabilir veya şifrelenmiş RSV protein(ler)inin yerinde eksprese olmasını sağlayacak şekilde translate edilen, verilen RNA ile aynı senslikte başka transkriptler sağlamak için transkripte edilebilir.

Kendi kendini kopyalama elde etmek için uygun bir sistem, burada tarif edildiği gibi bir alfavirüsü replikonu gibi alfavirüsü bazlı bir RNA replikonu kullanılmasıdır. Bu + iplikçikli replikonlar, bir hücreye verildikten sonra translate edilerek bir replikaz (veya replikaz-transkriptaz) elde edilir. Replikaz, bir poliprotein olarak translate edilir ki bu, oto-klivaj olmak suretiyle verilen + iplikçikli RNA'nın genomik - iplikçikli kopyalarını yaratan bir replikasyon

kompleksi sağlar. Bu - iplikçikli transkriptler kendi başlarına transkripte edilerek + iplikçikli ana RNA'nın başka kopyaları da elde edilebilir ve ayrıca iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen bir alt genomik transkript de elde edilebilir. Alt genomik transkriptin translasyonu bu şekilde RSV protein(ler)inin, enfekte edilmiş hücre tarafından yerinde eksprese edilmesine yol açar. Uygun alfavirüsü replikonları, bir sindbis virüsü, bir semliki forest virüsü, bir doğuya özgü at ensefaliti virüsü, bir venezuela at ensefaliti virüsü, vb.'den bir replikaz kullanabilir.

Tercih edilen bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü bu yüzden (i) kendi kendini kopyalayan RNA molekülünden RNA transkripte edebilen bir RNA-bağımlı RNA polimerazını ve (ii) iki veya daha fazla RSV proteinini veya bunların fragmanlarını şifreler. Polimeraz, örn., alfavirüsü proteini nsP4 içeren bir alfavirüsü replikazı olabilir.

Doğal alfavirüsü genomları, yapısal olmayan replikaz poliproteinine ek olarak yapısal virion proteinlerini de şifrelerken buluşa ait bir alfavirüsü bazlı kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün, bütün alfavirüsü yapısal proteinlerini şifrelememesi tercih edilir. Böylece kendi kendini kopyalayan RNA, bir hücre içerisinde kendisinin genomik RNA kopyalarının üretilmesine yol açabilir ancak RNA içerikli alfavirüsü virionlarının üretilmesine yol açmaz. Bu virionların üretilememesi, bir vahşi tip alfavirüsünün aksine, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün kendisini enfeksiyöz formda sürdüremeyeceği anlamına gelir. Vahşi tip virüsler halinde devam etmek için gereken alfavirüsü yapısal proteinleri, buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA'lardan çıkarılır ve bunların yerini, istenen

kompleksi sağlar. Bu - iplikçikli transkriptler kendi başlarına transkripte edilerek + iplikçikli ana RNA'nın başka kopyaları da elde edilebilir ve ayrıca iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen bir alt genomik transkript de elde edilebilir. Alt genomik transkriptin translasyonu bu şekilde RSV protein(ler)inin, enfekte edilmiş hücre tarafından yerinde eksprese edilmesine yol açar. Uygun alfavirüsü replikonları, bir sindbis virüsü, bir semliki forest virüsü, bir doğuya özgü at ensefaliti virüsü, bir venezuela at ensefaliti virüsü, vb.'den bir replikaz kullanabilir.

Tercih edilen bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü bu yüzden (i) kendi kendini kopyalayan RNA molekülünden RNA transkripte edebilen bir RNA-bağımlı RNA polimerazını ve (ii) iki veya daha fazla RSV proteinini veya bunların fragmanlarını şifreler. Polimeraz, örn., alfavirüsü proteini nsP4 içeren bir alfavirüsü replikazı olabilir.

Doğal alfavirüsü genomları, yapısal olmayan replikaz poliproteinine ek olarak yapısal virion proteinlerini de şifrelerken buluşa ait bir alfavirüsü bazlı kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün, bütün alfavirüsü yapısal proteinlerini şifrelememesi tercih edilir. Böylece kendi kendini kopyalayan RNA, bir hücre içerisinde kendisinin genomik RNA kopyalarının üretilmesine yol açabilir ancak RNA içerikli alfavirüsü virionlarının üretilmesine yol açmaz. Bu virionların üretilememesi, bir vahşi tip alfavirüsünün aksine, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün kendisini enfeksiyöz formda sürdüremeyeceği anlamına gelir. Vahşi tip virüsler halinde devam etmek için gereken alfavirüsü yapısal proteinleri, buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA'lardan çıkarılır ve bunların yerini, istenen

gen ürününü (RSV proteini veya bunun fragmanı) şifreleyen gen(ler) alır, öyle ki alt genomik transkript, yapısal alfavirüsü virion proteinlerinden çok istenen gen ürününü şifreler.

Bu nedenle buluşla yararlı olan bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen bir veya daha fazla sekansa sahiptir. RSV proteinlerini veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar, istenen herhangi bir yönde olabilir ve aynı veya ayrı promotrrlere işlevsel olarak bağlanabilir. Arzu edilirse RSV proteinlerini veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar, tek bir açık okuma çerçevesinin bir parçası olabilir. Bazı düzeneklerde RNA, başka ilave RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen bir veya daha fazla ilave (aşağı yönde) sekansa veya açık okuma çerçevesine sahip olabilir. Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, şifrelenmiş replikazla uyumlu bir 5' sekansına sahip olabilir.

Bir yönde kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, burada tanımlanan bir alfavirüsü replikonu gibi bir alfavirüsünden türetilir veya ona dayanır. Diğer yönlerde kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, bir alfavirüsünden başka bir virüsten, tercihen bir pozitif iplikçikli RNA virüsünden ve daha tercihen bir pikornavirüsü, flavivirüsü, rubivirüsü, pestivirüsü, hepasivirüsü, kalisivirüsü veya koronavirüsünden türetilir veya onlara dayanır. Uygun vahşi tip alfavirüsü sekansları iyi bilinir ve Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, Rockville, Md. gibi sekans emanetçilerinden temin edilebilir. Uygun alfavirüslerinin temsili örnekleri arasında Aura (ATCC VR-368), Bebaru virüsü (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), Chikungunya virüsü (ATCC VR-64, ATCC VR-1241),

gen ürününü (RSV proteini veya bunun fragmanı) şifreleyen gen(ler) alır, öyle ki alt genomik transkript, yapısal alfavirüsü virion proteinlerinden çok istenen gen ürününü şifreler.

Bu nedenle buluşla yararlı olan bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen bir veya daha fazla sekansa sahiptir. RSV proteinlerini veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar, istenen herhangi bir yönde olabilir ve aynı veya ayrı promotrrlere işlevsel olarak bağlanabilir. Arzu edilirse RSV proteinlerini veya fragmanlarını şifreleyen sekanslar, tek bir açık okuma çerçevesinin bir parçası olabilir. Bazı düzeneklerde RNA, başka ilave RSV proteinlerini veya bunların fragmanlarını şifreleyen bir veya daha fazla ilave (aşağı yönde) sekansa veya açık okuma çerçevesine sahip olabilir. Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, şifrelenmiş replikazla uyumlu bir 5' sekansına sahip olabilir.

Bir yönde kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, burada tanımlanan bir alfavirüsü replikonu gibi bir alfavirüsünden türetilir veya ona dayanır. Diğer yönlerde kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, bir alfavirüsünden başka bir virüsten, tercihen bir pozitif iplikçikli RNA virüsünden ve daha tercihen bir pikornavirüsü, flavivirüsü, rubivirüsü, pestivirüsü, hepasivirüsü, kalisivirüsü veya koronavirüsünden türetilir veya onlara dayanır. Uygun vahşi tip alfavirüsü sekansları iyi bilinir ve Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, Rockville, Md. gibi sekans emanetçilerinden temin edilebilir. Uygun alfavirüslerinin temsili örnekleri arasında Aura (ATCC VR-368), Bebaru virüsü (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), Chikungunya virüsü (ATCC VR-64, ATCC VR-1241),

Doğuya özgü at ensefalomiyelit virüsü (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Getah virüsü (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro virüsü (ATCC VR-66; ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), Mucambo virüsü (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), Pixuna virüsü (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Ross River virüsü (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Sindbis virüsü (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Venezuela at ensefalomiyeliti (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Batıya özgü at ensefalomiyeliti (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) ve Y-62-33 (ATCC VR-375) bulunur.

Buluşa ait kendini kopyalayan RNA molekülleri, bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir ve bu sebeple gelişmiş stabiliteye sahip ve *in vivo* bozunma ve tasfiyeye dirençli ve başka avantajlara sahip olabilir. Herhangi bir özel teoriye bağlı kalma arzusu olmaksızın, modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinin, kendi kendini kopyalayan RNA'nın bir hücre içine veridliği durumda endozomal ve sitoplazmik immün reseptörlerinin uyarılmasını önlediğine veya azalttığına inanılır. Bu, proteinin kendini kopyalamasına, amplifikasyonuna ve ekspresyonuna izin verir. Bu aynı zamanda modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva etmeyen kendi kendini kopyalayan RNA'ya ilişkin göre güvenlik endişelerini azaltır, çünkü modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA, doğuştan gelen immün sistemin

Doğuya özgü at ensefalomiyelit virüsü (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Getah virüsü (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro virüsü (ATCC VR-66; ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), Mucambo virüsü (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), Pixuna virüsü (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Ross River virüsü (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Sindbis virüsü (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Venezuela at ensefalomiyeliti (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Batıya özgü at ensefalomiyeliti (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) ve Y-62-33 (ATCC VR-375) bulunur.

Buluşa ait kendini kopyalayan RNA molekülleri, bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir ve bu sebeple gelişmiş stabiliteye sahip ve *in vivo* bozunma ve tasfiyeye dirençli ve başka avantajlara sahip olabilir. Herhangi bir özel teoriye bağlı kalma arzusu olmaksızın, modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinin, kendi kendini kopyalayan RNA'nın bir hücre içine veridliği durumda endozomal ve sitoplazmik immün reseptörlerinin uyarılmasını önlediğine veya azalttığına inanılır. Bu, proteinin kendini kopyalamasına, amplifikasyonuna ve ekspresyonuna izin verir. Bu aynı zamanda modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva etmeyen kendi kendini kopyalayan RNA'ya ilişkin göre güvenlik endişelerini azaltır, çünkü modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA, doğuştan gelen immün sistemin

aktivasyonunu ve onu takip eden istenmeyen sonuçları (örn., enjeksiyon yerinde enflamasyon, enjeksiyon yerinde tahriş, ağrı ve benzeri) azaltır. Ayrıca kendi kendini kopyalamanın bir sonucu olarak üretilen RNA moleküllerinin, sitoplazmik immün reseptörleri tarafından yabancı nükleik asitler olarak tanındığına da inanılır. Bu sebeple modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA'nın bir konakçı hücrede verimli şekilde amplifiye olmasını ve CMV gB proteinlerinin eksprese olmasını ve yanı sıra adjuvan etkileri sağlar.

Burada kullanıldığı gibi, "modifiye edilmiş nükleotit", nükleosidin (örn., sitosin (C), timin (T) veya urasil (U), adenin (A) veya guanin (G)) nitrojenöz bazı içinde veya üstünde bir veya daha fazla kimyasal modifikasyon (örn., ikameler) ihtiva eden bir nükleotide karşılık gelir. Arzu edilirse, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, nükleosidin (örn., riboz, deoksiriboz, modifiye edilmiş riboz, modifiye edilmiş deoksiriboz, altı elemanlı şeker analogu veya açık zincirli şeker analogu) şeker yarımı içinde veya üstünde kimyasal modifikasyonlar ihtiva edebilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, tercihen 5' başlığının bir parçası olmayan en az bir modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir. Buna göre kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, tek bir pozisyonda bir modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir, iki veya daha fazla pozisyonda bir özel modifiye edilmiş nükleotit (örn., psödoüridin, N6-metiladenosin, 5-metilsitidin, 5-metilüridin) ihtiva edebilir veya iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit (örn., her biri bir veya daha fazla

aktivasyonunu ve onu takip eden istenmeyen sonuçları (örn., enjeksiyon yerinde enflamasyon, enjeksiyon yerinde tahriş, ağrı ve benzeri) azaltır. Ayrıca kendi kendini kopyalamanın bir sonucu olarak üretilen RNA moleküllerinin, sitoplazmik immün reseptörleri tarafından yabancı nükleik asitler olarak tanındığına da inanılır. Bu sebeple modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, RNA'nın bir konakçı hücrede verimli şekilde amplifiye olmasını ve CMV gB proteinlerinin eksprese olmasını ve yanı sıra adjuvan etkileri sağlar.

Burada kullanıldığı gibi, "modifiye edilmiş nükleotit", nükleosidin (örn., sitosin (C), timin (T) veya urasil (U), adenin (A) veya guanin (G)) nitrojenöz bazı içinde veya üstünde bir veya daha fazla kimyasal modifikasyon (örn., ikameler) ihtiva eden bir nükleotide karşılık gelir. Arzu edilirse, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, nükleosidin (örn., riboz, deoksiriboz, modifiye edilmiş riboz, modifiye edilmiş deoksiriboz, altı elemanlı şeker analogu veya açık zincirli şeker analogu) şeker yarımı içinde veya üstünde kimyasal modifikasyonlar ihtiva edebilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, tercihen 5' başlığının bir parçası olmayan en az bir modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir. Buna göre kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, tek bir pozisyonda bir modifiye edilmiş nükleotit ihtiva edebilir, iki veya daha fazla pozisyonda bir özel modifiye edilmiş nükleotit (örn., psödoüridin, N6-metiladenosin, 5-metilsitidin, 5-metilüridin) ihtiva edebilir veya iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit (örn., her biri bir veya daha fazla

pozisyonda) ihtiva edebilir. Tercihen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, nitrojenöz baz içinde veya üstünde bir modifikasyon ihtiva eden ancak modifiye edilmiş şeker veya fosfat yarımları ihtiva etmeyen modifiye edilmiş nükleotitler içerir.

Bazı örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %0.001 ila %99'u veya %100'ü modifiye edilmiş nükleotitlerdir. Örneğin, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %0.001 - %25, %0.01-%25, %0.1-%25 veya %1-%25'i, modifiye edilmiş nükleotitlerdir.

Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir modifiye edilmemiş nükleotidin %0.001 ila %99'u veya %100'ü, bir modifiye nükleotit ile değiştirilir. Örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA molekülü içerisinde üridin ihtiva eden nükleotitlerin yaklaşık %1'i, örn., üridinin psödoüridin ile değiştirilmesiyle modifiye edilebilir. Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki istenen miktarda (yüzde) iki, üç veya dört özel nükleotit (üridin, sitidin, guanosin veya adenin ihtiva eden nükleotitler), modifiye edilmiş nükleotitlerdir. Örneğin, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir nükleotidin %0.001 - %25, %0.01 - %25, %0.1 - %25 veya %1 - %25'i, modifiye edilmiş nükleotitleridir. Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün özel bir nükleotidinin %0.001 -% 20, %0.001 - %15, %0.001 - %10, %0.01 - %20, %0.01 - %15, %0.1 - 25, %0.01 - %10, %1 - %20, %1 ila %15, %1-%10 veya yaklaşık %5, yaklaşık %10, yaklaşık %15, yaklaşık %20'si, modifiye edilmiş nükleotitlerdir.

pozisyonda) ihtiva edebilir. Tercihen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, nitrojenöz baz içinde veya üstünde bir modifikasyon ihtiva eden ancak modifiye edilmiş şeker veya fosfat yarımları ihtiva etmeyen modifiye edilmiş nükleotitler içerir.

Bazı örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %0.001 ila %99'u veya %100'ü modifiye edilmiş nükleotitlerdir. Örneğin, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %0.001 - %25, %0.01-%25, %0.1-%25 veya %1-%25'i, modifiye edilmiş nükleotitlerdir.

Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir modifiye edilmemiş nükleotidin %0.001 ila %99'u veya %100'ü, bir modifiye nükleotit ile değiştirilir. Örneğin, kendi kendini kopyalayan RNA molekülü içerisinde üridin ihtiva eden nükleotitlerin yaklaşık %1'i, örn., üridinin psödoüridin ile değiştirilmesiyle modifiye edilebilir. Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki istenen miktarda (yüzde) iki, üç veya dört özel nükleotit (üridin, sitidin, guanosin veya adenin ihtiva eden nükleotitler), modifiye edilmiş nükleotitlerdir. Örneğin, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir nükleotidin %0.001 - %25, %0.01 - %25, %0.1 - %25 veya %1 - %25'i, modifiye edilmiş nükleotitleridir. Başka örneklerde, bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülünün özel bir nükleotidinin %0.001 -% 20, %0.001 - %15, %0.001 - %10, %0.01 - %20, %0.01 - %15, %0.1 - 25, %0.01 - %10, %1 - %20, %1 ila %15, %1-%10 veya yaklaşık %5, yaklaşık %10, yaklaşık %15, yaklaşık %20'si, modifiye edilmiş nükleotitlerdir.

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %100'ünden azının modifiye edilmiş nükleotitler olması tercih edilir. Aynı zamanda bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir nükleotidin %100'ünden azının, modifiye edilmiş nükleotitler olması da tercih edilir. Bu sebeple tercih edilen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, en azından bir miktar modifiye edilmemiş nükleotit içerir.

Memeli RNA'sında 96'dan fazla doğal yollarla meydana gelen nükleosit modifikasyonu bulunur. Bakınız, örneğin Limbach ve arkadaşları, Nucleic Acids Research, 22(12):2183-2196 (1994). Nükleotitlerin ve modifiye edilmiş nükleotitlerin ve nükleosidlerin preparasyonları, *örn.* ABD Patentleri No. 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642'den bu konuda iyi bilinir ve çoğu modifiye edilmiş nükleosid ve modifiye edilmiş nükleotit, ticari yollarla elde edilebilir.

Modifiye edilmiş nükleositler ve nükleotitler içerisine dahil edilebilecek ve kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinde bulunabilecek modifiye edilmiş nükleobazlar arasında m5C (5-metilsitidin), m5U (5-metilüridin), m6A (N6-metiladenosin), s2U (2-tiyoüridin), Um (2'-O-metilüridin), m1A (1-metiladenosin); m2A (2-metiladenosin); Am (2-1-0-metiladenosin); ms2m6A (2-metiltiyo-N6-metiladenosin); i6A (N6-izopenteniladenosin); ms2i6A (2-metiltiyo-N6izopenteniladenosin); io6A (N6-(cis-hidroksiizopentenil) adenosin); ms2io6A (2-metiltiyo-N6-(cis-hidroksiizopentenil) adenosin); g6A (N6-glisinilkarbamoiladenosin); t6A (N6-

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki nükleotitlerin %100'ünden azının modifiye edilmiş nükleotitler olması tercih edilir. Aynı zamanda bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülündeki özel bir nükleotidin %100'ünden azının, modifiye edilmiş nükleotitler olması da tercih edilir. Bu sebeple tercih edilen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, en azından bir miktar modifiye edilmemiş nükleotit içerir.

Memeli RNA'sında 96'dan fazla doğal yollarla meydana gelen nükleosit modifikasyonu bulunur. Bakınız, örneğin Limbach ve arkadaşları, Nucleic Acids Research, 22(12):2183-2196 (1994). Nükleotitlerin ve modifiye edilmiş nükleotitlerin ve nükleosidlerin preparasyonları, *örn.* ABD Patentleri No. 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642'den bu konuda iyi bilinir ve çoğu modifiye edilmiş nükleosid ve modifiye edilmiş nükleotit, ticari yollarla elde edilebilir.

Modifiye edilmiş nükleositler ve nükleotitler içerisine dahil edilebilecek ve kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinde bulunabilecek modifiye edilmiş nükleobazlar arasında m5C (5-metilsitidin), m5U (5-metilüridin), m6A (N6-metiladenosin), s2U (2-tiyoüridin), Um (2'-O-metilüridin), m1A (1-metiladenosin); m2A (2-metiladenosin); Am (2-1-0-metiladenosin); ms2m6A (2-metiltiyo-N6-metiladenosin); i6A (N6-izopenteniladenosin); ms2i6A (2-metiltiyo-N6izopenteniladenosin); io6A (N6-(cis-hidroksiizopentenil) adenosin); ms2io6A (2-metiltiyo-N6-(cis-hidroksiizopentenil) adenosin); g6A (N6-glisinilkarbamoiladenosin); t6A (N6-

treonilkarbamoiladenosin); ms2t6A (2-metiltiyo-N6-treonil karbamoiladenosin); m6t6A (N6-metil-N6-treonilkarbamoiladenosin); hn6A (N6-hidroksinorvalilkarbamoiladenosin); ms2hn6A (2-metiltiyo-N6-hidroksinorvalilkarbamoiladenosin); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosin (fosfat)); I (inosin); m11 (1-metilinosin); m'Im (1,2'-O-dimetilinosin); m3C (3-metilsitidin); Cm (2T-O-metilsitidin); s2C (2-tiyositidin); ac4C (N4-asetilsitidin); f5C (5-fonnilsitidin); m5Cm (5,2-O-dimetilsitidin); ac4Cm (N4asetil2TOmetilsitidin); k2C (lisidin); m1G (1-metilguanosin); m2G (N2-metilguanosin); m7G (7-metilguanosin); Gm (2'-O-metilguanosin); m22G (N2,N2-dimetilguanosin); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosin); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosin); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosin(fosfat)); yW (vibütosin); o2yW (peroksivibütosin); OHyW (hidroksivibütosin); OHyW* (düşük modifiye hidroksivibütosin); imG (viyosin); mimG (metilguanosin); Q (kueuosin); oQ (epoksikueuosin); galQ (galaktosil-kueuosin); manQ (mannosil-kueuosin); preQo (7-siyano-7-deazaguanosin); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosin); G (arkaeosin); D (dihidroüridin); m5Um (5,2'-O-dimetilüridin); s4U (4-tiyoüridin); m5s2U (5-metil-2-tiyoüridin); s2Um (2-tiyo-2'-O-metilüridin); acp3U (3-(3-amino-3-karboksipropil)üridin); ho5U (5-hidroksiüridin); mo5U (5-metoksiüridin); cmo5U (üridin 5-aksiasetik asit); mcmo5U (üridin 5-oksiasetik asit metil ester); chm5U (5-(karboksihidroksimetil)üridin)); mchm5U (5-(karboksihidroksimetil)üridin metil ester); mcm5U (5-metoksikarbonil metilüridin); mcm5Um (S-metoksikarbonilmetil-2-O-metilüridin); mcm5s2U (5-metoksikarbonilmetil-2-tiyoüridin); nm5s2U (5-aminometil-2-tiyoüridin); mnm5U (5-metilaminometilüridin); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiyoüridin); mnm5se2U (5-

treonilkarbamoiladenosin); ms2t6A (2-metiltiyo-N6-treonil karbamoiladenosin); m6t6A (N6-metil-N6-treonilkarbamoiladenosin); hn6A (N6-hidroksinorvalilkarbamoiladenosin); ms2hn6A (2-metiltiyo-N6-hidroksinorvalilkarbamoiladenosin); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosin (fosfat)); I (inosin); m11 (1-metilinosin); m'Im (1,2'-O-dimetilinosin); m3C (3-metilsitidin); Cm (2T-O-metilsitidin); s2C (2-tiyositidin); ac4C (N4-asetilsitidin); f5C (5-fonnilsitidin); m5Cm (5,2-O-dimetilsitidin); ac4Cm (N4asetil2TOmetilsitidin); k2C (lisidin); m1G (1-metilguanosin); m2G (N2-metilguanosin); m7G (7-metilguanosin); Gm (2'-O-metilguanosin); m22G (N2,N2-dimetilguanosin); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosin); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosin); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosin(fosfat)); yW (vibütosin); o2yW (peroksivibütosin); OHyW (hidroksivibütosin); OHyW* (düşük modifiye hidroksivibütosin); imG (viyosin); mimG (metilguanosin); Q (kueuosin); oQ (epoksikueuosin); galQ (galaktosil-kueuosin); manQ (mannosil-kueuosin); preQo (7-siyano-7-deazaguanosin); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosin); G (arkaeosin); D (dihidroüridin); m5Um (5,2'-O-dimetilüridin); s4U (4-tiyoüridin); m5s2U (5-metil-2-tiyoüridin); s2Um (2-tiyo-2'-O-metilüridin); acp3U (3-(3-amino-3-karboksipropil)üridin); ho5U (5-hidroksiüridin); mo5U (5-metoksiüridin); cmo5U (üridin 5-aksiasetik asit); mcmo5U (üridin 5-oksiasetik asit metil ester); chm5U (5-(karboksihidroksimetil)üridin)); mchm5U (5-(karboksihidroksimetil)üridin metil ester); mcm5U (5-metoksikarbonil metilüridin); mcm5Um (S-metoksikarbonilmetil-2-O-metilüridin); mcm5s2U (5-metoksikarbonilmetil-2-tiyoüridin); nm5s2U (5-aminometil-2-tiyoüridin); mnm5U (5-metilaminometilüridin); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiyoüridin); mnm5se2U (5-

metilaminometil-2-selenoüridin); ncm5U (5-karbamoilmetil üridin); ncm5Um (5-karbamoilmetil-2'-O-metilüridin); cmnm5U (5-karboksimetilaminometilüridin); cnmm5Um (5-karboksimetilaminometil-2-L-O-metilüridin); cmnm5s2U (5-karboksimetilaminometil-2-tiyoüridin); m62A (N6,N6-dimetiladenosin); Tm (2'-O-metilinosin); m4C (N4-metilsitidin); m4Cm (N4,2-O-dimetilsitidin); hm5C (5-hidroksimetilsitidin); m3U (3-metilüridin); cm5U (5-karboksimetilüridin); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosin); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosin); m2'7G (N2,7-dimetilguanosin); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosin); m3Um (3,2T-O-dimetilüridin); m5D (5-metildihidroüridin); f5Cm (5-formil-2'-O-metilsitidin); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosin); m'Am (1,2-O-dimetiladenosin)irinometilüridin); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiyoüridin)); imG-14 (4-dimetilguanosin); imG2 (izoguanosin); veya ac6A (N6-asetiladenosin), hipoksantin, inosin, 8-okso-adenin, bunların 7-ikame edilmiş türevleri, dihidrourasil, psödourasil, 2-tiyourasil, 4-tiyourasil, 5-aminourasil, 5-(C_1-C_6)-alkilurasil, 5-metilurasil, 5-(C_2-C_6)-alkenilurasil, 5-(C_2-C_6)-alkinilurasil, 5-(hidroksimetil)urasil, 5-klorourasil, 5-florourasil, 5-bromourasil, 5-hidroksisitosin, 5-(C_1-C_6)-alkilsitosin, 5-metilsitosin, 5-(C_2-C_6)-alkenilsitosin, 5-(C_2-C_6)-alkinilsitosin, 5-klorositosin, 5-florositosin, 5-bromositosin, N^2-dimetilguanin, 7-deazaguanin, 8-azaguanin, 7-deaza-7-ikame edilmiş guanin, 7-deaza-7-(C2-C6)alkinilguanin, 7-deaza-8-ikame edilmiş guanin, 8-hidroksiguanin, 6-tiyoguanin, 8-oksoguanin, 2-aminopurin, 2-amino-6-kloropurin, 2,4-diaminopurin, 2,6-diaminopurin, 8-azapurin, ikame edilmiş 7-deazapurin, 7-deaza-7-ikame edilmiş purin, 7-deaza-8-ikame edilmiş purin ve hidrojen (abazik tortu), m5C, m5U, m6A, s2U, W veya 2'-O-metil-U bulunur.

metilaminometil-2-selenoüridin); ncm5U (5-karbamoilmetil üridin); ncm5Um (5-karbamoilmetil-2'-O-metilüridin); cmnm5U (5-karboksimetilaminometilüridin); cnmm5Um (5-karboksimetilaminometil-2-L-O-metilüridin); cmnm5s2U (5-karboksimetilaminometil-2-tiyoüridin); m62A (N6,N6-dimetiladenosin); Tm (2'-O-metilinosin); m4C (N4-metilsitidin); m4Cm (N4,2-O-dimetilsitidin); hm5C (5-hidroksimetilsitidin); m3U (3-metilüridin); cm5U (5-karboksimetilüridin); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosin); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosin); m2'7G (N2,7-dimetilguanosin); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosin); m3Um (3,2T-O-dimetilüridin); m5D (5-metildihidroüridin); f5Cm (5-formil-2'-O-metilsitidin); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosin); m'Am (1,2-O-dimetiladenosin)irinometilüridin); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiyoüridin)); imG-14 (4-dimetilguanosin); imG2 (izoguanosin); veya ac6A (N6-asetiladenosin), hipoksantin, inosin, 8-okso-adenin, bunların 7-ikame edilmiş türevleri, dihidrourasil, psödourasil, 2-tiyourasil, 4-tiyourasil, 5-aminourasil, 5-(C_1-C_6)-alkilurasil, 5-metilurasil, 5-(C_2-C_6)-alkenilurasil, 5-(C_2-C_6)-alkinilurasil, 5-(hidroksimetil)urasil, 5-klorourasil, 5-florourasil, 5-bromourasil, 5-hidroksisitosin, 5-(C_1-C_6)-alkilsitosin, 5-metilsitosin, 5-(C_2-C_6)-alkenilsitosin, 5-(C_2-C_6)-alkinilsitosin, 5-klorositosin, 5-florositosin, 5-bromositosin, N^2-dimetilguanin, 7-deazaguanin, 8-azaguanin, 7-deaza-7-ikame edilmiş guanin, 7-deaza-7-(C2-C6)alkinilguanin, 7-deaza-8-ikame edilmiş guanin, 8-hidroksiguanin, 6-tiyoguanin, 8-oksoguanin, 2-aminopurin, 2-amino-6-kloropurin, 2,4-diaminopurin, 2,6-diaminopurin, 8-azapurin, ikame edilmiş 7-deazapurin, 7-deaza-7-ikame edilmiş purin, 7-deaza-8-ikame edilmiş purin ve hidrojen (abazik tortu), m5C, m5U, m6A, s2U, W veya 2'-O-metil-U bulunur.

Bu modifiye edilmiş nükleobazların herhangi biri veya herhangi bir kombinasyonu, buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA'ya dahil edilebilir. Bu modifiye edilmiş nükleobazların ve bunların karşılık gelen ribonükleositlerinin pek çoğu ticari tedarikçilerden temin edilebilir.

Arzu edilirse kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, fosforoamidat, fosforotiyoat ve/veya metilfosfat bağlantıları ihtiva edebilir.

En az bir modifiye edilmiş nükleotit içeren kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, herhangi bir uygun yöntem kullanılarak hazırlanabilir. Modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden RNA moleküllerinin üretilmesi için bu konuda birkaç uygun yöntem bilinir. Örneğin modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünü şifreleyen bir DNA'nın, uygun bir DNA bağımlı RNA polimerazı, örn., T7 faj RNA polimerazı, SP6 faj RNA polimerazı, T3 faj RNA polimerazı ve benzeri veya bu polimerazların, modifiye edilmiş nükleotitlerin RNA molekülleri içerisine verimli şekilde dahil olmasını sağlayan mutantları kullanılarak transkripte edilmesiyle (örn., in vitro transkripsiyon) hazırlanabilir. Transkripsiyon reaksiyonu, nükleotitler ve modifiye edilmiş nükleotitler ve uygun bir tampon ve uygun tuzlar gibi seçilen polimerazın aktivitesini destekleyen başka bileşenler ihtiva edecektir. Nükleotit analoglarının bir kendi kendini kopyalayan RNA içerisine dahil edilmesi değiştirilerek örneğin bu tür RNA moleküllerinin stabilitesi değiştirilebilir, RNase'lere karşı direnç arttırılabilir, uygun konakçı

Bu modifiye edilmiş nükleobazların herhangi biri veya herhangi bir kombinasyonu, buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA'ya dahil edilebilir. Bu modifiye edilmiş nükleobazların ve bunların karşılık gelen ribonükleositlerinin pek çoğu ticari tedarikçilerden temin edilebilir.

Arzu edilirse kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, fosforoamidat, fosforotiyoat ve/veya metilfosfat bağlantıları ihtiva edebilir.

En az bir modifiye edilmiş nükleotit içeren kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, herhangi bir uygun yöntem kullanılarak hazırlanabilir. Modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden RNA moleküllerinin üretilmesi için bu konuda birkaç uygun yöntem bilinir. Örneğin modifiye edilmiş nükleotitler ihtiva eden bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, kendi kendini kopyalayan RNA molekülünü şifreleyen bir DNA'nın, uygun bir DNA bağımlı RNA polimerazı, örn., T7 faj RNA polimerazı, SP6 faj RNA polimerazı, T3 faj RNA polimerazı ve benzeri veya bu polimerazların, modifiye edilmiş nükleotitlerin RNA molekülleri içerisine verimli şekilde dahil olmasını sağlayan mutantları kullanılarak transkripte edilmesiyle (örn., in vitro transkripsiyon) hazırlanabilir. Transkripsiyon reaksiyonu, nükleotitler ve modifiye edilmiş nükleotitler ve uygun bir tampon ve uygun tuzlar gibi seçilen polimerazın aktivitesini destekleyen başka bileşenler ihtiva edecektir. Nükleotit analoglarının bir kendi kendini kopyalayan RNA içerisine dahil edilmesi değiştirilerek örneğin bu tür RNA moleküllerinin stabilitesi değiştirilebilir, RNase'lere karşı direnç arttırılabilir, uygun konakçı

hücreler içerisine dahil edildikten (RNA'nın "enfektivitesi") sonra kopyalama oluşturulabilir ve/veya doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtlar indüklenebilir veya azaltılabilir.

Bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit ihtiva eden bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü üretmek için uygun sentetik yöntemler tek başlarına veya bir veya daha fazla başka yöntem (örn., rekombinant DNA veya RNA teknolojisi) ile kombinasyon halinde kullanılabilir. De novo sentez için uygun yöntemler, bu konuda iyi bilinir ve özel uygulamalara uyarlanabilir. Örnek yöntemler arasında, örneğin, uygun koruma grupları, örn., CEM kullanılan kimyasal sentez (Masuda ve arkadaşları, (2007) Nucleic Acids Symposium Series 51:3-4), β-siyanoetil fosforamidit yöntemi (Beaucage S L ve arkadaşları (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); nükleosid H-fosfonat yöntemi (Garegg P ve arkadaşları (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler B C ve arkadaşları (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg P ve arkadaşları (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffney B L ve arkadaşları (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22) yer alır. Bu kimyalar, ticari olarak temin edilebilen otomatik nükleik asit sentezleyiciler ile gerçekleştirilebilir veya bunlarla kullanım için uyarlanabilir. İlave uygun sentetik yöntemler, Uhlmann ve arkadaşları (1990) Chem Rev 90:544-84, and Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165'te açıklanmaktadır. Nükleik asit sentezi ayrıca polinükleotitlerin ve bu tür polinükleotitler tarafından şifrelenen gen ürünlerinin klonlanması, işlenmesi ve/veya eksprese edilmesi dahil olmak üzere bu konuda iyi bilinen ve geleneksel olan uygun rekombinant yöntemler kullanılarak da gerçekleştirilebilir. Rastgele fragmantasyon yoluyla DNA karma ve gen fragmanlarının ve sentetik polinükleotitlerin PCR ile tekrar birleştirmesi, polinükleotit

hücreler içerisine dahil edildikten (RNA'nın "enfektivitesi") sonra kopyalama oluşturulabilir ve/veya doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtlar indüklenebilir veya azaltılabilir.

Bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotit ihtiva eden bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü üretmek için uygun sentetik yöntemler tek başlarına veya bir veya daha fazla başka yöntem (örn., rekombinant DNA veya RNA teknolojisi) ile kombinasyon halinde kullanılabilir. De novo sentez için uygun yöntemler, bu konuda iyi bilinir ve özel uygulamalara uyarlanabilir. Örnek yöntemler arasında, örneğin, uygun koruma grupları, örn., CEM kullanılan kimyasal sentez (Masuda ve arkadaşları, (2007) Nucleic Acids Symposium Series 51:3-4), β-siyanoetil fosforamidit yöntemi (Beaucage S L ve arkadaşları (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); nükleosid H-fosfonat yöntemi (Garegg P ve arkadaşları (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler B C ve arkadaşları (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg P ve arkadaşları (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffney B L ve arkadaşları (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22) yer alır. Bu kimyalar, ticari olarak temin edilebilen otomatik nükleik asit sentezleyiciler ile gerçekleştirilebilir veya bunlarla kullanım için uyarlanabilir. İlave uygun sentetik yöntemler, Uhlmann ve arkadaşları (1990) Chem Rev 90:544-84, and Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165'te açıklanmaktadır. Nükleik asit sentezi ayrıca polinükleotitlerin ve bu tür polinükleotitler tarafından şifrelenen gen ürünlerinin klonlanması, işlenmesi ve/veya eksprese edilmesi dahil olmak üzere bu konuda iyi bilinen ve geleneksel olan uygun rekombinant yöntemler kullanılarak da gerçekleştirilebilir. Rastgele fragmantasyon yoluyla DNA karma ve gen fragmanlarının ve sentetik polinükleotitlerin PCR ile tekrar birleştirmesi, polinükleotit

sekanslarını tasarlamak ve değiştirmek için kullanılabilecek olan bilinen tekniklerin örnekleridir. Nükleik asitleri ve şifrelenmiş proteinleri değiştirmek, örneğin yeni kısıtlama sahaları eklemek, glikosilasyon paternlerini değiştirmek, kodon tercihini değiştirmek, araya ekleme varyantlar üretmek, mutasyonlar dahil etmek ve benzeri için sahaya yönelik mutajenez kullanılabilir. Nükleik asit sekanslarının transkripsiyonu, translasyonu ve ekspresyonu için uygun yöntemler, bu konuda bilinir ve klasiktir. (Bakınız genellikle Current Protocols in Molecular Biology, Cilt 2, Ed. Ausubel ve arkadaşları, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Bölüm 13, 1988; Glover, DNA Cloning, Cilt II, IRL Press, Wash., D.C., Bölüm 3, 1986; Bitter, ve arkadaşları, Methods in Enzymology 153:516-544 (1987); The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathern ve arkadaşları, Cold Spring Harbor Press, Cilt I ve II, 1982; ve Sambrook ve arkadaşları, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989.)

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülünde bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotidin varlığı ve/veya miktarı herhangi bir uygun yöntem kullanılarak belirlenebilir. Örneğin bir kendi kendini kopyalayan RNA, monofosfatlara dijest edilebilir (örn., nükleaz P1 kullanılarak) ve defosforile edilebilir (örn., uygun bir fosfataz, örn., CIAP kullanılarak) ve sonuçta elde edilen nükleosidler, ters fazlı HPLC (örn., bir YMC Pack ODS-AQ kolonu (5 mikron, 4.6 X 250 mm kullanılarak) yoluyla analiz edilir ve %30 B (0-5 dak.) ila %100 B (5-132 dak.) ve %100 B (13-40 dak.) gradyanı, akış hızı (0.7 ml/dak.), UV saptama (dalga boyu: 260 nm), kolon sıcaklığı (30°C) kullanılarak elüte edilir. Tampon A (20mM asetik asit - amonyum

sekanslarını tasarlamak ve değiştirmek için kullanılabilecek olan bilinen tekniklerin örnekleridir. Nükleik asitleri ve şifrelenmiş proteinleri değiştirmek, örneğin yeni kısıtlama sahaları eklemek, glikosilasyon paternlerini değiştirmek, kodon tercihini değiştirmek, araya ekleme varyantlar üretmek, mutasyonlar dahil etmek ve benzeri için sahaya yönelik mutajenez kullanılabilir. Nükleik asit sekanslarının transkripsiyonu, translasyonu ve ekspresyonu için uygun yöntemler, bu konuda bilinir ve klasiktir. (Bakınız genellikle Current Protocols in Molecular Biology, Cilt 2, Ed. Ausubel ve arkadaşları, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Bölüm 13, 1988; Glover, DNA Cloning, Cilt II, IRL Press, Wash., D.C., Bölüm 3, 1986; Bitter, ve arkadaşları, Methods in Enzymology 153:516-544 (1987); The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathern ve arkadaşları, Cold Spring Harbor Press, Cilt I ve II, 1982; ve Sambrook ve arkadaşları, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989.)

Bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülünde bir veya daha fazla modifiye edilmiş nükleotidin varlığı ve/veya miktarı herhangi bir uygun yöntem kullanılarak belirlenebilir. Örneğin bir kendi kendini kopyalayan RNA, monofosfatlara dijest edilebilir (örn., nükleaz P1 kullanılarak) ve defosforile edilebilir (örn., uygun bir fosfataz, örn., CIAP kullanılarak) ve sonuçta elde edilen nükleosidler, ters fazlı HPLC (örn., bir YMC Pack ODS-AQ kolonu (5 mikron, 4.6 X 250 mm kullanılarak) yoluyla analiz edilir ve %30 B (0-5 dak.) ila %100 B (5-132 dak.) ve %100 B (13-40 dak.) gradyanı, akış hızı (0.7 ml/dak.), UV saptama (dalga boyu: 260 nm), kolon sıcaklığı (30°C) kullanılarak elüte edilir. Tampon A (20mM asetik asit - amonyum

asetat pH 3.5), tampon B (20mM asetik asit - amonyum asetat pH 3.5/metanol [90/10])).

Kendi kendini kopyalayan RNA bir verme sistemi ile birleştirilebilir. Kendi kendini kopyalayan RNA, bir adjuvan ile veya olmadan uygulanabilir.

RNA Verme Sistemleri

Burada tarif edilen kendi kendini kopyalayan RNA, çıplak RNA verme gibi çeşitli modalitelerde veya hücrelere girişi kolaylaştıran lipitler, polimerler veya başka bileşikler ile kombinasyon halinde verme için uygundur. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, örn., doğrudan enjeksiyon, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, lipofeksiyon, biyolistikler ve benzeri gibi herhangi bir uygun teknik kullanılarak hedef hücrelere veya süjelere dahil edilebilir. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, reseptör aracılı endositoz yoluyla da hücreler içerisine dahil edilebilir. Bakınız, örneğin ABD Pat. No. 6,090,619; Wu ve Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); ve Curiel ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 88:8850 (1991). Örneğin ABD Pat. No. 6,083,741, bir eksogen nükleik asidin memeli hücrelerine, nükleik asidi, bir integrin reseptörü bağlayıcı yarıma (örn., Arg-Gly-Asp sekansına (SEK.KİM.NO:16) sahip bir siklik peptit) kendi başına birleşen bir polikatyon yarımına (*örn.*, 3-100 lisin tortusuna (SEK.KİM.NO:19) sahip poli-L-lisin) birleştirmek suretiyle dahil edilmesini açıklar.

Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, hücreler içerisine amfifiller vasıtasıyla verilebilir. Bakınız, örneğinABD Pat. No.

asetat pH 3.5), tampon B (20mM asetik asit - amonyum asetat pH 3.5/metanol [90/10])).

Kendi kendini kopyalayan RNA bir verme sistemi ile birleştirilebilir. Kendi kendini kopyalayan RNA, bir adjuvan ile veya olmadan uygulanabilir.

RNA Verme Sistemleri

Burada tarif edilen kendi kendini kopyalayan RNA, çıplak RNA verme gibi çeşitli modalitelerde veya hücrelere girişi kolaylaştıran lipitler, polimerler veya başka bileşikler ile kombinasyon halinde verme için uygundur. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, örn., doğrudan enjeksiyon, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, lipofeksiyon, biyolistikler ve benzeri gibi herhangi bir uygun teknik kullanılarak hedef hücrelere veya süjelere dahil edilebilir. Kendi kendini kopyalayan RNA molekülü, reseptör aracılı endositoz yoluyla da hücreler içerisine dahil edilebilir. Bakınız, örneğin ABD Pat. No. 6,090,619; Wu ve Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); ve Curiel ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 88:8850 (1991). Örneğin ABD Pat. No. 6,083,741, bir eksogen nükleik asidin memeli hücrelerine, nükleik asidi, bir integrin reseptörü bağlayıcı yarıma (örn., Arg-Gly-Asp sekansına (SEK.KİM.NO:16) sahip bir siklik peptit) kendi başına birleşen bir polikatyon yarımına (*örn.*, 3-100 lisin tortusuna (SEK.KİM.NO:19) sahip poli-L-lisin) birleştirmek suretiyle dahil edilmesini açıklar.

Kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, hücreler içerisine amfifiller vasıtasıyla verilebilir. Bakınız, örneğinABD Pat. No.

6,071,890. Tipik olarak, bir nükleik asit molekülü, katyonik amfifil ile bir kompleks oluşturabilir. Kompleks ile temas ettirilen memeli hücreleri, onu kolaylıkla yakalayabilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA, çıplak RNA olarak (örn., sadece bir RNA sulu çözeltisi olarak) verilebilir ancak hücrelere girişi ve aynı zamanda takip eden hücreler arası etkileri artırmak için kendi kendini kopyalayan RNA tercihen bir partikülat veya emülsiyon verme sistemi gibi bir verme sistemi ile kombinasyon halinde uygulanır. Çok sayıda verme sistemi, bu konuda uzman kişilerce iyi bilinir. Bu tür verme sistemleri arasında, örneğin, lipozom bazında verme (Debs ve Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino ve Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose ABD Pat. No. 5,279,833; Brigham (1991) WO 91/06309; ve Felgner ve arkadaşları (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 84: 7413-7414) ve ayrıca viral vektörlerin (*örn.,* adenoviral (bakınız, örneğin Berns ve arkadaşları (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 95-104; Ali ve arkadaşları (1994) Gene Ther. 1: 367-384; ve Haddada ve arkadaşları (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306, inceleme için), papillomaviral, retroviral (bakınız, örneğin Buchscher ve arkadaşları (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann ve arkadaşları (1992) J. Virol. 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt ve arkadaşları, (1990) Virol. 176:58-59; Wilson ve arkadaşları (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller ve arkadaşları, J. Virol. 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal ve arkadaşları, PCT/US94/05700 ve Rosenburg ve Fauci (1993), Fundamental Immunology, Üçüncü Baskı Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York ve buradaki referanslar ve Yu ve arkadaşları., Gene Therapy (1994) supra.) ve adeno ile ilişkili viral vektörlerin (bakınız, West ve

6,071,890. Tipik olarak, bir nükleik asit molekülü, katyonik amfifil ile bir kompleks oluşturabilir. Kompleks ile temas ettirilen memeli hücreleri, onu kolaylıkla yakalayabilir.

Kendi kendini kopyalayan RNA, çıplak RNA olarak (örn., sadece bir RNA sulu çözeltisi olarak) verilebilir ancak hücrelere girişi ve aynı zamanda takip eden hücreler arası etkileri artırmak için kendi kendini kopyalayan RNA tercihen bir partikülat veya emülsiyon verme sistemi gibi bir verme sistemi ile kombinasyon halinde uygulanır. Çok sayıda verme sistemi, bu konuda uzman kişilerce iyi bilinir. Bu tür verme sistemleri arasında, örneğin, lipozom bazında verme (Debs ve Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino ve Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose ABD Pat. No. 5,279,833; Brigham (1991) WO 91/06309; ve Felgner ve arkadaşları (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 84: 7413-7414) ve ayrıca viral vektörlerin (*örn.,* adenoviral (bakınız, örneğin Berns ve arkadaşları (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 95-104; Ali ve arkadaşları (1994) Gene Ther. 1: 367-384; ve Haddada ve arkadaşları (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306, inceleme için), papillomaviral, retroviral (bakınız, örneğin Buchscher ve arkadaşları (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann ve arkadaşları (1992) J. Virol. 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt ve arkadaşları, (1990) Virol. 176:58-59; Wilson ve arkadaşları (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller ve arkadaşları, J. Virol. 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal ve arkadaşları, PCT/US94/05700 ve Rosenburg ve Fauci (1993), Fundamental Immunology, Üçüncü Baskı Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York ve buradaki referanslar ve Yu ve arkadaşları., Gene Therapy (1994) supra.) ve adeno ile ilişkili viral vektörlerin (bakınız, West ve

arkadaşları (1987) Virology 160:38-47; Carter ve arkadaşları (1989) ABD Pat. No. 4,797,368; Carter ve arkadaşları WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invst. 94:1351 ve Samulski (yukarıda belirtilen), AAV vektörlerine genel bir bakış için; bakınız aynı zamanda Lebkowski, ABD Pat. No. 5,173,414; Tratschin ve arkadaşları (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin ve arkadaşları (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat ve Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 81:6466-6470; McLaughlin *ve arkadaşları* (1988) ve Samulski ve arkadaşları (1989) J. Virol., 63:03822-3828) kullanılması ve benzeri yer alır.

Özellikle yararlı olan üç verme sistemi, (i) lipozomlar, (ii) toksik olmayan ve biyo-bozunur polimer mikropartikülleri ve (iii) katyonik mikron altı su içinde yağ emülsiyonlarıdır.

Lipozomlar

Çeşitli amfifilik lipitler, bir su ortam içerisinde ikili katmanlar oluşturarak RNA içerikli sulu göbeği bir lipozom halinde kapsüle edebilirler. Bu lipitler, anyonik, katyonik ya da zwitteriyonik hidrofilik kafa grubuna sahip olabilirler. Anyonik fosfolipitlerden lipozom oluşturulmasının tarihi, 1960'lara uzanır ve katyonik lipozom oluşturan lipitler, 1990'lardan beri çalışılmaktadır. Bazı fosfolipitler, anyonik iken bazıları, zwitteriyoniktir. Uygun fosfolipit sınıfları arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere fosfatidiletanolaminler, fosfatidilkolinler, fosfatidilserinler ve fosfatidilgliseroller bulunur. Faydalı katyonik lipidler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, dioleoil

arkadaşları (1987) Virology 160:38-47; Carter ve arkadaşları (1989) ABD Pat. No. 4,797,368; Carter ve arkadaşları WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invst. 94:1351 ve Samulski (yukarıda belirtilen), AAV vektörlerine genel bir bakış için; bakınız aynı zamanda Lebkowski, ABD Pat. No. 5,173,414; Tratschin ve arkadaşları (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin ve arkadaşları (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat ve Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 81:6466-6470; McLaughlin *ve arkadaşları* (1988) ve Samulski ve arkadaşları (1989) J. Virol., 63:03822-3828) kullanılması ve benzeri yer alır.

Özellikle yararlı olan üç verme sistemi, (i) lipozomlar, (ii) toksik olmayan ve biyo-bozunur polimer mikropartikülleri ve (iii) katyonik mikron altı su içinde yağ emülsiyonlarıdır.

Lipozomlar

Çeşitli amfifilik lipitler, bir su ortam içerisinde ikili katmanlar oluşturarak RNA içerikli sulu göbeği bir lipozom halinde kapsüle edebilirler. Bu lipitler, anyonik, katyonik ya da zwitteriyonik hidrofilik kafa grubuna sahip olabilirler. Anyonik fosfolipitlerden lipozom oluşturulmasının tarihi, 1960'lara uzanır ve katyonik lipozom oluşturan lipitler, 1990'lardan beri çalışılmaktadır. Bazı fosfolipitler, anyonik iken bazıları, zwitteriyoniktir. Uygun fosfolipit sınıfları arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere fosfatidiletanolaminler, fosfatidilkolinler, fosfatidilserinler ve fosfatidilgliseroller bulunur. Faydalı katyonik lipidler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, dioleoil

trimetilamonyum propan (DOTAP), 1,2-distearíloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DSDMA), 1,2-dioleiloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DODMA), 1,2-dilinoleiloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloksi-N,N-dimetil-3-aminopropanı (DLenDMA) yer alır. Zwitteriyonik lipitler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, asil zwitteriyonik lipitleri ve eter zwitteriyonik lipitleri yer alır. Faydalı zwitteriyonik lipitlerin örnekleri, DPPC, DOPC ve dodesilfosfokolindir. Lipitler, doymuş ya da doymamış olabilir.

Lipozomlar, tek bir lipitten veya bir lipit karışımından oluşturulabilir. Bir karışım, (i) bir anyonik lipit karışımı, (ii) bir katyonik lipit karışımı, (iii) bir zwitteriyonik lipit karışımı (iv) bir anyonik lipit ve katyonik lipit karışımı (v) bir anyonik lipit ve zwitteriyonik lipit karışımı, (vi) bir zwitteriyonik lipit ve katyonik lipit karışımı veya (vii) bir anyonik lipit, katyonik lipit ve zwitteriyonik lipit karışımı içerebilir. Benzer şekilde bir karışım, hem doymuş hem de doymamış lipitler içerebilir. Örneğin bir karışım DSPC (zwitteriyonik, doymuş), DlinDMA (katyonik, doymamış) ve/veya DMPG (anyonik, doymuş) içerebilir. Bir lipit karışımı kullanılması durumunda karışımdaki bileşen lipitlerin tümünün amfifilik olması gerekmez; örn., bir veya daha fazla amfifilik lipit, kolesterol ile karıştırılmış olabilir.

Bir lipidin hidrofilik kısmı, PEGile edilmiş (yani bir polietilen glikolün kovalent olarak bağlanması vasıtasıyla modifiye edilmiş) olabilir. Bu modifikasyon, stabiliteyi arttırabilir ve lipozomların spesifik olmayan adsorpsiyonunu engelleyebilir. Örneğin lipitler,

trimetilamonyum propan (DOTAP), 1,2-distearíloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DSDMA), 1,2-dioleiloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DODMA), 1,2-dilinoleiloksi-N,N-dimetil-3-aminopropan (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloksi-N,N-dimetil-3-aminopropanı (DLenDMA) yer alır. Zwitteriyonik lipitler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, asil zwitteriyonik lipitleri ve eter zwitteriyonik lipitleri yer alır. Faydalı zwitteriyonik lipitlerin örnekleri, DPPC, DOPC ve dodesilfosfokolindir. Lipitler, doymuş ya da doymamış olabilir.

Lipozomlar, tek bir lipitten veya bir lipit karışımından oluşturulabilir. Bir karışım, (i) bir anyonik lipit karışımı, (ii) bir katyonik lipit karışımı, (iii) bir zwitteriyonik lipit karışımı (iv) bir anyonik lipit ve katyonik lipit karışımı (v) bir anyonik lipit ve zwitteriyonik lipit karışımı, (vi) bir zwitteriyonik lipit ve katyonik lipit karışımı veya (vii) bir anyonik lipit, katyonik lipit ve zwitteriyonik lipit karışımı içerebilir. Benzer şekilde bir karışım, hem doymuş hem de doymamış lipitler içerebilir. Örneğin bir karışım DSPC (zwitteriyonik, doymuş), DlinDMA (katyonik, doymamış) ve/veya DMPG (anyonik, doymuş) içerebilir. Bir lipit karışımı kullanılması durumunda karışımdaki bileşen lipitlerin tümünün amfifilik olması gerekmez; örn., bir veya daha fazla amfifilik lipit, kolesterol ile karıştırılmış olabilir.

Bir lipidin hidrofilik kısmı, PEGile edilmiş (yani bir polietilen glikolün kovalent olarak bağlanması vasıtasıyla modifiye edilmiş) olabilir. Bu modifikasyon, stabiliteyi arttırabilir ve lipozomların spesifik olmayan adsorpsiyonunu engelleyebilir. Örneğin lipitler,

PEG'ye, Heyes ve arkadaşları (2005) J Controlled Release 107:276-87'de açıklananlar gibi teknikler kullanılarak konjuge edilebilir.

Lipozomlar oluşturmak için bir DSPC, DlinDMA, PEG-DMPG ve kolesterol karışımı kullanılabilir. Buluşun ayrı bir yönü, DSPC, DlinDMA, PEG-DMG ve kolesterol içeren bir lipozomdur. Bu lipozom tercihen örn., bir immünojen şifreleyen bir kendi kendini kopyalayan RNA gibi RNA'yı kapsüle eder.

Lipozomlar genelde üç gruba ayrılır: çok katmanlı vesiküller (MLV); küçük tek katmanlı vesiküller (SUV); ve büyük tek katmanlı vesiküller (LUV). MLV'ler, her bir vesikülde birçok ikili katmana sahip olmakla birkaç ayrı sulu bölmesi oluşturur. SUV'ler ve LUVler, bir sulu göbeğini kapsüle eden tek bir ikili katmana sahiptir; SUVlerin çapı tipik olarak ≤50nm ve LUVlerin çapı ise, >50 nm'dir. Buluşla faydalı lipozomlar ideal olarak çapı, 50-220nm aralığında olan LUV'lerdir. Farklı çaplarda LUV'lerin bir popülasyonunu içeren bir kompozisyon durumunda: (i) sayıya göre en az %80'in çapı, 20-220 nm aralığında olmalıdır, (ii) popülasyonun ortalama çapı (Zav, yoğunluğa göre) ideal olarak 40-200 nm aralığındadır ve/veya (iii) çapların polidispersite indeksi, <0.2 olmalıdır.

Uygun lipozomlar hazırlama teknikleri, bu konuda iyi bilinir, *örn.*bakınız Liposomes: Methods and Protocols, Cilt 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, cilt I, II ve III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; ve Functional Polymer Colloids and Microparticles cilt 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady ve Guyot). Citus Books,

PEG'ye, Heyes ve arkadaşları (2005) J Controlled Release 107:276-87'de açıklananlar gibi teknikler kullanılarak konjuge edilebilir.

Lipozomlar oluşturmak için bir DSPC, DlinDMA, PEG-DMPG ve kolesterol karışımı kullanılabilir. Buluşun ayrı bir yönü, DSPC, DlinDMA, PEG-DMG ve kolesterol içeren bir lipozomdur. Bu lipozom tercihen örn., bir immünojen şifreleyen bir kendi kendini kopyalayan RNA gibi RNA'yı kapsüle eder.

Lipozomlar genelde üç gruba ayrılır: çok katmanlı vesiküller (MLV); küçük tek katmanlı vesiküller (SUV); ve büyük tek katmanlı vesiküller (LUV). MLV'ler, her bir vesikülde birçok ikili katmana sahip olmakla birkaç ayrı sulu bölmesi oluşturur. SUV'ler ve LUVler, bir sulu göbeğini kapsüle eden tek bir ikili katmana sahiptir; SUVlerin çapı tipik olarak ≤50nm ve LUVlerin çapı ise, >50 nm'dir. Buluşla faydalı lipozomlar ideal olarak çapı, 50-220nm aralığında olan LUV'lerdir. Farklı çaplarda LUV'lerin bir popülasyonunu içeren bir kompozisyon durumunda: (i) sayıya göre en az %80'in çapı, 20-220 nm aralığında olmalıdır, (ii) popülasyonun ortalama çapı (Zav, yoğunluğa göre) ideal olarak 40-200 nm aralığındadır ve/veya (iii) çapların polidispersite indeksi, <0.2 olmalıdır.

Uygun lipozomlar hazırlama teknikleri, bu konuda iyi bilinir, *örn.*bakınız Liposomes: Methods and Protocols, Cilt 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, cilt I, II ve III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; ve Functional Polymer Colloids and Microparticles cilt 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady ve Guyot). Citus Books,

2002. Bir faydalı yöntem, (i) lipitler içeren bir etanolik çözelti (ii) nükleik asit içeren bir sulu çözelti ve (iii) tamponun karıştırılmasını, ardından karıştırma, dengeleme, seyreltme ve saflaştırma yapılmasını kapsar (Heyes ve arkadaşları (2005) J Controlled Release 107:276-87.).

RNA tercihen lipozomlar içine kapsüle edilir ve böylece lipozom, bir sulu RNA içerikli göbeğin etrafında bir dış tabaka oluşturur. Bu kapsüllemenin, RNA'yı RNase dijesyonunundan koruduğu bulunmuştur. Lipozomlar, bir miktar harici RNA içerebilir (örn., lipozomların yüzeyi üzerinde) ancak tercihen RNA'nın en az yarısı (ve ideal olarak önemli ölçüde tamamı) kapsüle edilir.

Polimerik mikropartiküller

Çeşitli polimerler, RNA'yı kapsüle veya adsorbe etmek için mikropartiküller oluşturabilir. Önemli ölçüde toksik olmayan bir polimerin kullanılması, bir alıcının partikülleri güvenli bir şekilde alabileceği anlamına gelir ve bir biyo-bozunur polimerin kullanılması, uzun süreli kalıcılığı önlemek için partiküllerin verildikten sonra metabolize edilebileceği anlamına gelir. Yararlı polimerler ayrıca farmasötik kalitede formülasyonların hazırlanmasına yardımcı olmak için sterilize edilebilir.

Uygun toksik olmayan ve biyo-bozunur polimerler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, poli(α-hidroksi asitler), polihidroksi butirik asitler, polilaktonlar (polikaprolaktonlar dahil), polidioksanonlar, polivalerolakton, poliortoesterler, polianhidrürler, polisiyanoakrilatlar,

2002. Bir faydalı yöntem, (i) lipitler içeren bir etanolik çözelti (ii) nükleik asit içeren bir sulu çözelti ve (iii) tamponun karıştırılmasını, ardından karıştırma, dengeleme, seyreltme ve saflaştırma yapılmasını kapsar (Heyes ve arkadaşları (2005) J Controlled Release 107:276-87.).

RNA tercihen lipozomlar içine kapsüle edilir ve böylece lipozom, bir sulu RNA içerikli göbeğin etrafında bir dış tabaka oluşturur. Bu kapsüllemenin, RNA'yı RNase dijesyonunundan koruduğu bulunmuştur. Lipozomlar, bir miktar harici RNA içerebilir (örn., lipozomların yüzeyi üzerinde) ancak tercihen RNA'nın en az yarısı (ve ideal olarak önemli ölçüde tamamı) kapsüle edilir.

Polimerik mikropartiküller

Çeşitli polimerler, RNA'yı kapsüle veya adsorbe etmek için mikropartiküller oluşturabilir. Önemli ölçüde toksik olmayan bir polimerin kullanılması, bir alıcının partikülleri güvenli bir şekilde alabileceği anlamına gelir ve bir biyo-bozunur polimerin kullanılması, uzun süreli kalıcılığı önlemek için partiküllerin verildikten sonra metabolize edilebileceği anlamına gelir. Yararlı polimerler ayrıca farmasötik kalitede formülasyonların hazırlanmasına yardımcı olmak için sterilize edilebilir.

Uygun toksik olmayan ve biyo-bozunur polimerler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, poli(α-hidroksi asitler), polihidroksi butirik asitler, polilaktonlar (polikaprolaktonlar dahil), polidioksanonlar, polivalerolakton, poliortoesterler, polianhidrürler, polisiyanoakrilatlar,

tirozin türevli polikarbonatlar, polivinilpirolidinonlar veya polyester-amidler ve buların kombinasyonları bulunur.

Bazı düzeneklerde mikropartiküller, bir poli(laktit) ("PLA") gibi poli(α-hidroksi asitler), bir poli(D,L-laktit-ko-glikolit) ("PLG") gibi laktit ve glikolit kopolimerleri ve D,L-laktit ve kaprolakton kopolimerlerinden oluşturulur. Yararlı PLG polimerleri arasında laktit/glikolit molar oranı, örneğin 20:80 ila 80:20 aralığında, örn., 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25 olanlar yer alır. Faydalı PLG polimerleri arasında, moleküler ağırlığı örneğin 5,000-200,000 Da arasında, örn., 10,000-100,000, 20,000-70,000 ya da 40,000-50,000 Da arasında olanlar bulunur.

Mikropartiküllerin çapı ideal olarak 0.02 μm ila 8 μm aralığındadır. Farklı çaplara sahip bir mikropartikül popülasyonu içeren bir kompozisyonun durumunda sayıya göre en az %80'in çapı, 0.03-7 μm aralığında olmalıdır.

Uygun mikropartikülleri hazırlama teknikleri, bu konuda iyi bilinir, *örn.,*bakınız Functional Polymer Colloids and Microparticles cilt 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002; Polymers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006. (Özellikle bölüm 7) ve Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996. RNA adsorpsiyonunu kolaylaştırmak için bir mikropartikül, *örn.* O'Hagan ve arkadaşları (2001) J Virology75:9037-9043; ve Singh ve arkadaşları (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251'de açıklandığı gibi bir katyonik surfektan ve/veya lipit içerebilir. Polimerik mikropartiküller yapmanın

tirozin türevli polikarbonatlar, polivinilpirolidinonlar veya polyester-amidler ve buların kombinasyonları bulunur.

Bazı düzeneklerde mikropartiküller, bir poli(laktit) ("PLA") gibi poli(α-hidroksi asitler), bir poli(D,L-laktit-ko-glikolit) ("PLG") gibi laktit ve glikolit kopolimerleri ve D,L-laktit ve kaprolakton kopolimerlerinden oluşturulur. Yararlı PLG polimerleri arasında laktit/glikolit molar oranı, örneğin 20:80 ila 80:20 aralığında, örn., 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25 olanlar yer alır. Faydalı PLG polimerleri arasında, moleküler ağırlığı örneğin 5,000-200,000 Da arasında, örn., 10,000-100,000, 20,000-70,000 ya da 40,000-50,000 Da arasında olanlar bulunur.

Mikropartiküllerin çapı ideal olarak 0.02 μm ila 8 μm aralığındadır. Farklı çaplara sahip bir mikropartikül popülasyonu içeren bir kompozisyonun durumunda sayıya göre en az %80'in çapı, 0.03-7 μm aralığında olmalıdır.

Uygun mikropartikülleri hazırlama teknikleri, bu konuda iyi bilinir, *örn.,*bakınız Functional Polymer Colloids and Microparticles cilt 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002; Polymers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006. (Özellikle bölüm 7) ve Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996. RNA adsorpsiyonunu kolaylaştırmak için bir mikropartikül, *örn.* O'Hagan ve arkadaşları (2001) J Virology75:9037-9043; ve Singh ve arkadaşları (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251'de açıklandığı gibi bir katyonik surfektan ve/veya lipit içerebilir. Polimerik mikropartiküller yapmanın

alternatif bir yolu, *örn.* WO2009/132206'da açıklandığı gibi kalıplama ve kürlemedir.

Buluşa ait mikropartiküllerin zeta potansiyeli, 40-100 mV arasında sahip olabilir. RNA, mikropartiküllere adsorbe edilebilir ve adsorpsiyon, mikropartiküle katyonik materyaller (örn., katyonik lipitler) dahil etmek suretiyle kolaylaştırılır.

Su içinde yağ katyonik emülsiyonları

Su içinde yağ emülsiyonları, grip aşılarının adjuvane edilmesinde, örn., FLUAD™ ürünündeki MF59™ adjuvanı ve PREPANDRIX™ ürünündeki AS03 adjuvanında bilinmektedir. RNA verme, emülsiyonun bir veya daha fazla katyonik molekül içermesi koşuluyla bir su içinde yağ emülsiyonu kullanılarak yapılabilir. Örneğin negatif yüklü RNA'nın bağlanabileceği bir pozitif yüklü damlacık yüzeyi temin etmek için emülsiyona bir katyonik lipit dahil edilebilir.

Emülsiyon, bir veya daha fazla yağ içerir. Uygun yağ(lar) arasında örneğin bir hayvan (örn., balık) veya bir bitki kaynağından gelenler bulunur. Yağ ideal olarak biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyo-uyumludur. Bitkisel yağ kaynakları arasında kabuklu yemişler, tohumlar ve tahıllar bulunur. Yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, hindistancevizi yağı ve en yaygın olarak bulunan zeytinyağı, kabuklu yemiş yağlarının örnekleridir. Örn., jojoba tanesinden elde edilen jojoba yağı kullanılabilir. Tohum yağları arasında yalancı safran yağı, pamuk tohumu yağı, ayçiçeği tohumu yağı, susam tohumu yağı ve benzerleri yer alır. Tahıl grubunda mısır yağı en kolay bulunanıdır ancak buğday, yulaf, çavdar, pirinç, tef, tritikale ve benzerleri gibi

alternatif bir yolu, *örn.* WO2009/132206'da açıklandığı gibi kalıplama ve kürlemedir.

Buluşa ait mikropartiküllerin zeta potansiyeli, 40-100 mV arasında sahip olabilir. RNA, mikropartiküllere adsorbe edilebilir ve adsorpsiyon, mikropartiküle katyonik materyaller (örn., katyonik lipitler) dahil etmek suretiyle kolaylaştırılır.

Su içinde yağ katyonik emülsiyonları

Su içinde yağ emülsiyonları, grip aşılarının adjuvane edilmesinde, örn., FLUAD™ ürünündeki MF59™ adjuvanı ve PREPANDRIX™ ürünündeki AS03 adjuvanında bilinmektedir. RNA verme, emülsiyonun bir veya daha fazla katyonik molekül içermesi koşuluyla bir su içinde yağ emülsiyonu kullanılarak yapılabilir. Örneğin negatif yüklü RNA'nın bağlanabileceği bir pozitif yüklü damlacık yüzeyi temin etmek için emülsiyona bir katyonik lipit dahil edilebilir.

Emülsiyon, bir veya daha fazla yağ içerir. Uygun yağ(lar) arasında örneğin bir hayvan (örn., balık) veya bir bitki kaynağından gelenler bulunur. Yağ ideal olarak biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyo-uyumludur. Bitkisel yağ kaynakları arasında kabuklu yemişler, tohumlar ve tahıllar bulunur. Yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, hindistancevizi yağı ve en yaygın olarak bulunan zeytinyağı, kabuklu yemiş yağlarının örnekleridir. Örn., jojoba tanesinden elde edilen jojoba yağı kullanılabilir. Tohum yağları arasında yalancı safran yağı, pamuk tohumu yağı, ayçiçeği tohumu yağı, susam tohumu yağı ve benzerleri yer alır. Tahıl grubunda mısır yağı en kolay bulunanıdır ancak buğday, yulaf, çavdar, pirinç, tef, tritikale ve benzerleri gibi

diğer tahıl tanelerinin yağı da kullanılabilir. Gliserol ve 1,2-propandiolün 6-10 karbonlı yağlı asit esterleri, tohum yağlarında doğal yollarla meydana gelmezken sert kabuklu yemiş ve tohum yağlarından başlayarak uygun materyallerin hidrolizi, ayrılması ve esterlenmesi yoluyla hazırlanabilir. Memelilerin sütlerinden gelen katı yağlar ve sıvı yağlar metabolize edilebilir ve bu şekilde kullanılabilir. Ayrıma, saflaştırma, sabunlaştırma prosedürleri ve hayvansal kaynaklardan saf yağlar elde etmek için gereken diğer yöntemler, bu konuda iyi bilinir.

Çoğu balıkta, kolaylıkla geri kazanılabilen metabolize olabilir yağlar bulunur. Örneğin, morina balığı yağı, köpek balığı yağları ve ispermeçet gibi balina yağı, burada kullanılabilecek balık yağlarının birkaçına örnektir. Birçok dallı zincirli yağ, 5-karbon izopren birimleri halinde biyokimyasal olarak sentezlenir ve genellikle terpenoitler olarak anılır. Skualenin doymuş analogu olan skualan da kullanılabilir. Skualen ve skualan da dahil olmak üzere balık yağları, ticari kaynaklardan kolayca temin edilebilir veya bu konuda bilinen yöntemlerle elde edilebilir.

Diğer faydalı yağlar, özellikle skualen ile kombinasyon halinde tokoferollerdir. Bir emülsiyonun yağ fazının bir tokoferol içermesi durumda α, β, γ, δ, ε veya ξ tokoferollerinden herhangi biri kullanılabilir ancak α-tokoferoller tercih edilir. D-α-tokoferol ve DL-α-tokoferolün her ikisi de kullanılabilir. Bir tercih edilen α-tokoferol, DL-α-tokoferoldür. Skualen ve bir tokoferol (örn., DL-α-tokoferol) içeren bir yağ kombinasyonu kullanılabilir.

diğer tahıl tanelerinin yağı da kullanılabilir. Gliserol ve 1,2-propandiolün 6-10 karbonlı yağlı asit esterleri, tohum yağlarında doğal yollarla meydana gelmezken sert kabuklu yemiş ve tohum yağlarından başlayarak uygun materyallerin hidrolizi, ayrılması ve esterlenmesi yoluyla hazırlanabilir. Memelilerin sütlerinden gelen katı yağlar ve sıvı yağlar metabolize edilebilir ve bu şekilde kullanılabilir. Ayrıma, saflaştırma, sabunlaştırma prosedürleri ve hayvansal kaynaklardan saf yağlar elde etmek için gereken diğer yöntemler, bu konuda iyi bilinir.

Çoğu balıkta, kolaylıkla geri kazanılabilen metabolize olabilir yağlar bulunur. Örneğin, morina balığı yağı, köpek balığı yağları ve ispermeçet gibi balina yağı, burada kullanılabilecek balık yağlarının birkaçına örnektir. Birçok dallı zincirli yağ, 5-karbon izopren birimleri halinde biyokimyasal olarak sentezlenir ve genellikle terpenoitler olarak anılır. Skualenin doymuş analogu olan skualan da kullanılabilir. Skualen ve skualan da dahil olmak üzere balık yağları, ticari kaynaklardan kolayca temin edilebilir veya bu konuda bilinen yöntemlerle elde edilebilir.

Diğer faydalı yağlar, özellikle skualen ile kombinasyon halinde tokoferollerdir. Bir emülsiyonun yağ fazının bir tokoferol içermesi durumda α, β, γ, δ, ε veya ξ tokoferollerinden herhangi biri kullanılabilir ancak α-tokoferoller tercih edilir. D-α-tokoferol ve DL-α-tokoferolün her ikisi de kullanılabilir. Bir tercih edilen α-tokoferol, DL-α-tokoferoldür. Skualen ve bir tokoferol (örn., DL-α-tokoferol) içeren bir yağ kombinasyonu kullanılabilir.

Tercih edilen emülsiyonlar, bir köpek balığı karaciğeri yağı, yani bir dallı doymamış terpenoid ($C_{30}H_{50}$;$[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-]_2$;2,6,10,15,19, 23-heksametil-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen; CAS RN 7683-64-9) olan skualen içerir.

Emülsiyondaki yağ, yağlar, örn., skualen ve en az bir başka yağ içeren bir kombinasyonu kapsayabilir.

Emülsiyonun sulu bileşeni sade su (örn., enjeksiyonluk su) olabilir veya başka bileşenler, örn., solütler içerebilir. Örneğin bu, bir tampon oluşturma amaçlı tuzları, örn., sitrat veya fosfat tuzlarını, örn., sodyum tuzlarını kapsayabilir. Tipik tamponlar arasında bir fosfat tamponu, bir Tris tamponu, bir borat tamponu, bir suksinat tamponu, bir histidin tamponu veya bir sitrat tamponu bulunur. Bir tamponlanmış sulu faz tercih edilir ve tamponlar tipik olarak 5-20 mM aralığında dahil edilecektir.

Emülsiyon, bir katyonik lipit de içerir. Tercihen bu lipit, emülsiyonun oluşturulmasını ve stabilze edilmesini kolaylaştırabilecek bir surfektandır. Faydalı katyonik lipitler genel olarak fizyolojik koşullar altında pozitif yüklü olan bir nitrojen atomu, örn., bir üçüncül veya dördüncül amin ihtiva eder. Bu nitrojen, bir amfifilik surfektanın hidrofilik kafa grubunda olabilir. Faydalı katyonik lipitler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır: 1,2-dioleoiloksi-3-(trimetilamonyp)propan (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-Dimetilaminoetan)-karbamoil] Kolesterol (DC Kolesterol), dimetildioktadesil-amonyum

Tercih edilen emülsiyonlar, bir köpek balığı karaciğeri yağı, yani bir dallı doymamış terpenoid ($C_{30}H_{50}$;$[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-]_2$;2,6,10,15,19, 23-heksametil-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen; CAS RN 7683-64-9) olan skualen içerir.

Emülsiyondaki yağ, yağlar, örn., skualen ve en az bir başka yağ içeren bir kombinasyonu kapsayabilir.

Emülsiyonun sulu bileşeni sade su (örn., enjeksiyonluk su) olabilir veya başka bileşenler, örn., solütler içerebilir. Örneğin bu, bir tampon oluşturma amaçlı tuzları, örn., sitrat veya fosfat tuzlarını, örn., sodyum tuzlarını kapsayabilir. Tipik tamponlar arasında bir fosfat tamponu, bir Tris tamponu, bir borat tamponu, bir suksinat tamponu, bir histidin tamponu veya bir sitrat tamponu bulunur. Bir tamponlanmış sulu faz tercih edilir ve tamponlar tipik olarak 5-20 mM aralığında dahil edilecektir.

Emülsiyon, bir katyonik lipit de içerir. Tercihen bu lipit, emülsiyonun oluşturulmasını ve stabilze edilmesini kolaylaştırabilecek bir surfektandır. Faydalı katyonik lipitler genel olarak fizyolojik koşullar altında pozitif yüklü olan bir nitrojen atomu, örn., bir üçüncül veya dördüncül amin ihtiva eder. Bu nitrojen, bir amfifilik surfektanın hidrofilik kafa grubunda olabilir. Faydalı katyonik lipitler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır: 1,2-dioleoiloksi-3-(trimetilamonyp)propan (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-Dimetilaminoetan)-karbamoil] Kolesterol (DC Kolesterol), dimetildioktadesil-amonyum

(DDA, örn., bromür)), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetil-AmonyumPropan (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil amonyum propan (DPTAP), distearoiltrimetilamonyum propan (DSTAP). Diğer faydalı katyonik lipitler arasında şunlar bulunur: benzalkonyum klorür (BAK), benzotonyum klorür, setramid (tetradesiltrimetilamonyum bromür ve muhtemelen küçük miktarlarda dedesiltrimetilamonyum bromür ve heksadesiltrimetil amonyum bromür ihtiva eder), setilpiridinyum klorür (CPC), setil trimetilamonyum klorür (CTAC), N,N',N'-polioksietilen (10)-N-iç yağı-1,3-diaminopropan, dodesiltrimetilamonyum bromür, heksadesiltrimetil-amonyum bromür, karışık alkil-trimetil-amonyum bromür, benzildimetildodesilamonyum klorür, benzildimetilheksa-desilamonyum klorür, benziltrimetilamonyum metoksid, setildimetiletilamonyum bromür, dimetildioktadesil amonyum bromür (DDAB), metilbenzetonyum klorür, dekametonyum klorür, metil karışık trialkil amonyum klorür, metil trioktilamonyum klorür, N,N-dimetil-N[2(2-metil -4-(1,1,3,3tetrametilbütil)-fenoksi-etoksi)etil]-benzenmetanaminyum klorür (DEBDA), dialkildimetilamonyum tuzları, [l-(2,3-dioleiloksi)-propil]-N,N,N,trimetilamonyumklorür,1,2-diasil-3-(trimetilamonyo)propan (asil grubu=dimiristoil, dipalmitoil, distearoil, dioleoil), 1,2-diasil-3 (dimetilamonyo)propan (asil grubu=dimiristoil, dipalmitoil, distearoil, dioleoil), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonyo)butanoil-sn-gliserol, 1,2-dioleoil 3-sukinil-sn-gliserol kolin ester, kolesteril (4'-trimetilamonyo)butanoat), N-alkil piridinyum tuzları (örn., setilpiridinyum bromür ve setilpiridinyum klorür), N-alkilpiperidinyum tuzları, dikatyonik bolaform elektrolitleri (C12Me6, C12BU6), dialkilglisetilfosforilkolin, lisolesitin, L-α dioleoilfosfatidiletanolamin, kolesterol hemisuksinat kolin ester,

(DDA, örn., bromür)), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetil-AmonyumPropan (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil amonyum propan (DPTAP), distearoiltrimetilamonyum propan (DSTAP). Diğer faydalı katyonik lipitler arasında şunlar bulunur: benzalkonyum klorür (BAK), benzotonyum klorür, setramid (tetradesiltrimetilamonyum bromür ve muhtemelen küçük miktarlarda dedesiltrimetilamonyum bromür ve heksadesiltrimetil amonyum bromür ihtiva eder), setilpiridinyum klorür (CPC), setil trimetilamonyum klorür (CTAC), N,N',N'-polioksietilen (10)-N-iç yağı-1,3-diaminopropan, dodesiltrimetilamonyum bromür, heksadesiltrimetil-amonyum bromür, karışık alkil-trimetil-amonyum bromür, benzildimetildodesilamonyum klorür, benzildimetilheksa-desilamonyum klorür, benziltrimetilamonyum metoksid, setildimetiletilamonyum bromür, dimetildioktadesil amonyum bromür (DDAB), metilbenzetonyum klorür, dekametonyum klorür, metil karışık trialkil amonyum klorür, metil trioktilamonyum klorür, N,N-dimetil-N[2(2-metil -4-(1,1,3,3tetrametilbütil)-fenoksi-etoksi)etil]-benzenmetanaminyum klorür (DEBDA), dialkildimetilamonyum tuzları, [l-(2,3-dioleiloksi)-propil]-N,N,N,trimetilamonyumklorür,1,2-diasil-3-(trimetilamonyo)propan (asil grubu=dimiristoil, dipalmitoil, distearoil, dioleoil), 1,2-diasil-3 (dimetilamonyo)propan (asil grubu=dimiristoil, dipalmitoil, distearoil, dioleoil), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonyo)butanoil-sn-gliserol, 1,2-dioleoil 3-sukinil-sn-gliserol kolin ester, kolesteril (4'-trimetilamonyo)butanoat), N-alkil piridinyum tuzları (örn., setilpiridinyum bromür ve setilpiridinyum klorür), N-alkilpiperidinyum tuzları, dikatyonik bolaform elektrolitleri (C12Me6, C12BU6), dialkilglisetilfosforilkolin, lisolesitin, L-α dioleoilfosfatidiletanolamin, kolesterol hemisuksinat kolin ester,

lipopoliaminler, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, dioktadesilamidoglisilspermin (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanolamidospermin (DPPES), lipopoli-L (veya D)-lisin (LPLL, LPDL), N-glutarilfosfatidiletanolamine konjuge edilmiş poli-L (veya D)-lisin, asılı amino grubu bulunan didodesil glutamat ester (C^GluPhCnN), asılı amino grubu bulunan ditetradesil glutamat ester (Cl4GIuCnN+), kolesterolün katyonik türevleri, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, kolesteril-3 β-oksisüksinamidoetilen-trimetilamonyum tuzu, kolesteril-3 β-oksisukinamidoetilen-dimetilamin, kolesteril-3 β-karboksiamidoetilentrimetilamonyum tuzu ve kolesteril-3 β-karboksiamidoetilendimetilamin. Diğer faydalı katyonik lipitler, US 2008/0085870 ve US 2008/0057080'de tarif edilir. Katyonik lipit tercihen biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyo-uyumludur.

Yağ ve katyonik lipide ek olarak bir emülsiyon, bir iyonik olmayan surfektan ve/veya bir zwitteriyonik surfektan da içerebilir. Bu surfektanlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, şunlar bulunur: polioksietilen sorbitan ester surfektanları (genellikle Tweens olarak anılır), özellikle polisorbat 20 ve polisorbat 80; DOWFAX™ ticari adı altında satılan etilen oksid (EO), propilen oksid (PO) ve/veya butilen oksid (BO) kopolimerleri, örn., lineer EO/PO blok kopolimerleri; oktoksinol-9 (Triton X-100 veya t-oktilfenoksipolietoksietanol) özel ilgi konusu olmak üzere tekrarlayan etoksi (oksi-l,2-etandiil) gruplarının sayısı değişebilen oktoksinoller; (oktilfenoksi)polietoksietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfatidilkolin (lesitin) gibi fosfolipitler; trietilenglikol monolauril eter (Brij 30) gibi lauril, setil, stearil ve oleil alkollerden türetilen

lipopoliaminler, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, dioktadesilamidoglisilspermin (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanolamidospermin (DPPES), lipopoli-L (veya D)-lisin (LPLL, LPDL), N-glutarilfosfatidiletanolamine konjuge edilmiş poli-L (veya D)-lisin, asılı amino grubu bulunan didodesil glutamat ester (C^GluPhCnN), asılı amino grubu bulunan ditetradesil glutamat ester (Cl4GIuCnN+), kolesterolün katyonik türevleri, örneğin ve bunlarla sınırlı olmaksızın, kolesteril-3 β-oksisüksinamidoetilen-trimetilamonyum tuzu, kolesteril-3 β-oksisukinamidoetilen-dimetilamin, kolesteril-3 β-karboksiamidoetilentrimetilamonyum tuzu ve kolesteril-3 β-karboksiamidoetilendimetilamin. Diğer faydalı katyonik lipitler, US 2008/0085870 ve US 2008/0057080'de tarif edilir. Katyonik lipit tercihen biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyo-uyumludur.

Yağ ve katyonik lipide ek olarak bir emülsiyon, bir iyonik olmayan surfektan ve/veya bir zwitteriyonik surfektan da içerebilir. Bu surfektanlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, şunlar bulunur: polioksietilen sorbitan ester surfektanları (genellikle Tweens olarak anılır), özellikle polisorbat 20 ve polisorbat 80; DOWFAX™ ticari adı altında satılan etilen oksid (EO), propilen oksid (PO) ve/veya butilen oksid (BO) kopolimerleri, örn., lineer EO/PO blok kopolimerleri; oktoksinol-9 (Triton X-100 veya t-oktilfenoksipolietoksietanol) özel ilgi konusu olmak üzere tekrarlayan etoksi (oksi-l,2-etandiil) gruplarının sayısı değişebilen oktoksinoller; (oktilfenoksi)polietoksietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfatidilkolin (lesitin) gibi fosfolipitler; trietilenglikol monolauril eter (Brij 30) gibi lauril, setil, stearil ve oleil alkollerden türetilen

polioksietilen yağlı eterleri (Brij surfektanları olarak bilinir); polioksietilen-9-lauril eter; ve sorbitan trioleat (Span 85) ve sorbitan monolaurat gibi sorbitan esterler (genellikle Spanlar olarak bilinir). Emülsiyona dahil edilmek üzere tercih edilen surfaktanlar, polisorbat 80 (Tween 80; polioksietilen sorbitan monooleat), Span 85 (sorbitan trioleat), lesitin ve Triton X-100'dür.

Emülsiyona, bu surfektanların karışımları, örn.,Tween 80/Span 85 karışımları veya Tween 80/Triton-X100 karışımları dahil edilebilir. Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80) gibi bir polioksietilen sorbitan ester ile t-oktilfenoksi-polietoksietanol (Triton X-100) gibi bir oktoksinolün bir kombinasyonu da uygundur. Bir başka faydalı kombinasyon, lauret 9 artı bir polioksietilen sorbitan ester ve/veya bir oktoksinol içerir. Faydalı karışımlar, HLB değeri 10-20 aralığında olan bir surfektan (örn., HLB'si 15.0 olan bir polisorbat 80) ve HLB değeri 1-10 aralığında olan bir surfektan (örn., HLB'si 1.8 olan sorbitan trioleat) içerebilir.

Nihai emülsiyondaki yağın tercih edilen miktarları (hacme göre %), % 2-20, örn., %5-15, %6-14, %7-13, %8-12 arasındadır. Yaklaşık %4-6 veya yaklaşık %9-11 arasında bir skualen içeriği özellikle faydalıdır.

Nihai emülsiyondaki surfektanların tercih edilen miktarları (ağırlığa göre %), %0.001 ile %8 arasındadır. Örneğin, polioksietilen sorbitan esterler (örn., polisorbat 80) %0.2 ila %4, özellikle %0.4-0.6 arasında, %0.45-0.55 arasında, yaklaşık %0.5 veya %1.5-2 arasında, %1.8-2.2 arasında, %1.9-2.1 arasında, yaklaşık %2 veya %0.85-0.95 arasında veya yaklaşık %1; sorbitan esterler (örn., sorbitan trioleat) %0.02 ila

polioksietilen yağlı eterleri (Brij surfektanları olarak bilinir); polioksietilen-9-lauril eter; ve sorbitan trioleat (Span 85) ve sorbitan monolaurat gibi sorbitan esterler (genellikle Spanlar olarak bilinir). Emülsiyona dahil edilmek üzere tercih edilen surfaktanlar, polisorbat 80 (Tween 80; polioksietilen sorbitan monooleat), Span 85 (sorbitan trioleat), lesitin ve Triton X-100'dür.

Emülsiyona, bu surfektanların karışımları, örn.,Tween 80/Span 85 karışımları veya Tween 80/Triton-X100 karışımları dahil edilebilir. Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80) gibi bir polioksietilen sorbitan ester ile t-oktilfenoksi-polietoksietanol (Triton X-100) gibi bir oktoksinolün bir kombinasyonu da uygundur. Bir başka faydalı kombinasyon, lauret 9 artı bir polioksietilen sorbitan ester ve/veya bir oktoksinol içerir. Faydalı karışımlar, HLB değeri 10-20 aralığında olan bir surfektan (örn., HLB'si 15.0 olan bir polisorbat 80) ve HLB değeri 1-10 aralığında olan bir surfektan (örn., HLB'si 1.8 olan sorbitan trioleat) içerebilir.

Nihai emülsiyondaki yağın tercih edilen miktarları (hacme göre %), % 2-20, örn., %5-15, %6-14, %7-13, %8-12 arasındadır. Yaklaşık %4-6 veya yaklaşık %9-11 arasında bir skualen içeriği özellikle faydalıdır.

Nihai emülsiyondaki surfektanların tercih edilen miktarları (ağırlığa göre %), %0.001 ile %8 arasındadır. Örneğin, polioksietilen sorbitan esterler (örn., polisorbat 80) %0.2 ila %4, özellikle %0.4-0.6 arasında, %0.45-0.55 arasında, yaklaşık %0.5 veya %1.5-2 arasında, %1.8-2.2 arasında, %1.9-2.1 arasında, yaklaşık %2 veya %0.85-0.95 arasında veya yaklaşık %1; sorbitan esterler (örn., sorbitan trioleat) %0.02 ila

2, özellikle yaklaşık %0.5 veya yaklaşık %1; oktil- veya nonilfenoksi polioksietanoller (örn., Triton X-100) %0.001 ila 0.1, özellikle %0.005 ila 0.02; polioksietilen eterler (örn., lauret 9) %0.1 ila 8, tercihen %0.1 ila 10 ve özellikle %0.1 ila 1 veya yaklaşık %0.5.

Yağ ve surfektanın mutlak miktarları ve bunların oranı, halen bir emülsiyon meydana getirirken geniş sınırlar içinde değişebilir. Uzman bir kimse, bir arzu edilen emülsiyonu elde etmek için bileşenlerin göreli oranlarını kolaylıkla değiştirebilir fakat yağ ve surfektan için 4:1 ile 5:1 arasındaki bir ağırlık oranı tipiktir (fazla yağ).

Özellikle büyük hayvanlarda bir emülsiyonda immünouyarıcı aktivite temin etmek için önemli bir parametre, yağ damlacığının büyüklüğüdür (çapıdır). En etkili emülsiyonların damlacık büyüklüğü, mikron altı aralıktadır. Uygun şekilde damlacık büyüklükleri, 50-750 nm aralığında olacaktır. En faydalı şekilde ortalama damlacık büyüklüğü, 250 nm'nin altında, örn., 200 nm'nin altında, 150 nm'nin altındadır. Ortalama damlacık büyüklüğü yararlı bir şekilde 80-180 nm aralığındadır. İdeal olarak emülsiyonun yağ damlacıklarının en az %80'inin (sayıya göre) ve tercihen en az %90'ının çapı, 250 nm'nin altındadır. Bir emülsiyonda ortalama damlacık büyüklüğünü ve büyüklük dağılımını belirleme amaçlı arapartlar, ticari olarak temin edilebilir. Bunlar tipik olarak dinamik ışık saçma ve/veya tek partiküllü optik algılama tekniklerini, örn., Particle Sizing Systems (Santa Barbara, ABD)'den temin edilebilen Accusizer™ ve Nicomp™ serisi cihazlar veya Malvern Instruments (Birleşik Krallık)'tan Zetasizer™ cihazları ya da Horiba (Kyoto, Japonya)'dan Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analiz cihazlarını kullanır.

2, özellikle yaklaşık %0.5 veya yaklaşık %1; oktil- veya nonilfenoksi polioksietanoller (örn., Triton X-100) %0.001 ila 0.1, özellikle %0.005 ila 0.02; polioksietilen eterler (örn., lauret 9) %0.1 ila 8, tercihen %0.1 ila 10 ve özellikle %0.1 ila 1 veya yaklaşık %0.5.

Yağ ve surfektanın mutlak miktarları ve bunların oranı, halen bir emülsiyon meydana getirirken geniş sınırlar içinde değişebilir. Uzman bir kimse, bir arzu edilen emülsiyonu elde etmek için bileşenlerin göreli oranlarını kolaylıkla değiştirebilir fakat yağ ve surfektan için 4:1 ile 5:1 arasındaki bir ağırlık oranı tipiktir (fazla yağ).

Özellikle büyük hayvanlarda bir emülsiyonda immünouyarıcı aktivite temin etmek için önemli bir parametre, yağ damlacığının büyüklüğüdür (çapıdır). En etkili emülsiyonların damlacık büyüklüğü, mikron altı aralıktadır. Uygun şekilde damlacık büyüklükleri, 50-750 nm aralığında olacaktır. En faydalı şekilde ortalama damlacık büyüklüğü, 250 nm'nin altında, örn., 200 nm'nin altında, 150 nm'nin altındadır. Ortalama damlacık büyüklüğü yararlı bir şekilde 80-180 nm aralığındadır. İdeal olarak emülsiyonun yağ damlacıklarının en az %80'inin (sayıya göre) ve tercihen en az %90'ının çapı, 250 nm'nin altındadır. Bir emülsiyonda ortalama damlacık büyüklüğünü ve büyüklük dağılımını belirleme amaçlı arapartlar, ticari olarak temin edilebilir. Bunlar tipik olarak dinamik ışık saçma ve/veya tek partiküllü optik algılama tekniklerini, örn., Particle Sizing Systems (Santa Barbara, ABD)'den temin edilebilen Accusizer™ ve Nicomp™ serisi cihazlar veya Malvern Instruments (Birleşik Krallık)'tan Zetasizer™ cihazları ya da Horiba (Kyoto, Japonya)'dan Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analiz cihazlarını kullanır.

İdeal olarak damlacık büyüklüklerinin dağılımı (sayısal olarak), sadece bir maksimuma sahiptir, yani iki maksimum olmasından çok bir ortalama etrafına dağılmış tek bir damlacık popülasyonu (mod) vardır. Tercih edilen emülsiyonların polidispersitesi, <0.4, örn., 0.3, 0.2 veya daha küçüktür.

Mikron altı damlacıkların ve bir dar büyüklük dağılımının olduğu uygun emülsiyonlar, mikro akışkanlaştırma kullanılarak elde edilebilir. Bu teknik, girdi bileşenlerinin akışlarını yüksek basınçta ve yüksek hızda geometrik olarak sabitlenmiş kanallar içinden itmek suretiyle ortalama yağ damlacığı büyüklüğünü azaltır. Bu akışlar, kanal çeperleri, bölme çeperleri ve birbirleri ile temas eder. Sonuçta meydana gelen kesme, çarpma ve kavitasyon kuvvetleri, damlacık büyüklüğünde azalmaya neden olur. İstenen damlacık büyüklüğü ortalaması ve dağılımının olduğu bir emülsiyona ulaşılana kadar tekrarlanan mikro-akışkanlaştırma adımları gerçekleştirilebilir.

Mikro-akışkanlaştırmaya bir alternatif olarak, faz inversiyonu yaratmak için termal yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler aynı zamanda sıkı bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip bir mikron altı emülsiyon da sağlayabilir.

Tercih edilen emülsiyonlara, filtreli sterilizasyon yapılabilir, yani bunların damlacıkları, 220 nm'lik bir filtreden geçebilir. Bir sterilizasyon sağlamanın yanı sıra bu prosedür, emülsiyon içindeki büyük damlacıkları da giderir.

İdeal olarak damlacık büyüklüklerinin dağılımı (sayısal olarak), sadece bir maksimuma sahiptir, yani iki maksimum olmasından çok bir ortalama etrafına dağılmış tek bir damlacık popülasyonu (mod) vardır. Tercih edilen emülsiyonların polidispersitesi, <0.4, örn., 0.3, 0.2 veya daha küçüktür.

Mikron altı damlacıkların ve bir dar büyüklük dağılımının olduğu uygun emülsiyonlar, mikro akışkanlaştırma kullanılarak elde edilebilir. Bu teknik, girdi bileşenlerinin akışlarını yüksek basınçta ve yüksek hızda geometrik olarak sabitlenmiş kanallar içinden itmek suretiyle ortalama yağ damlacığı büyüklüğünü azaltır. Bu akışlar, kanal çeperleri, bölme çeperleri ve birbirleri ile temas eder. Sonuçta meydana gelen kesme, çarpma ve kavitasyon kuvvetleri, damlacık büyüklüğünde azalmaya neden olur. İstenen damlacık büyüklüğü ortalaması ve dağılımının olduğu bir emülsiyona ulaşılana kadar tekrarlanan mikro-akışkanlaştırma adımları gerçekleştirilebilir.

Mikro-akışkanlaştırmaya bir alternatif olarak, faz inversiyonu yaratmak için termal yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler aynı zamanda sıkı bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip bir mikron altı emülsiyon da sağlayabilir.

Tercih edilen emülsiyonlara, filtreli sterilizasyon yapılabilir, yani bunların damlacıkları, 220 nm'lik bir filtreden geçebilir. Bir sterilizasyon sağlamanın yanı sıra bu prosedür, emülsiyon içindeki büyük damlacıkları da giderir.

Belirli düzeneklerde emülsiyon içindeki katyonik lipit, DOTAP'tır. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.5 mg/ml ila yaklaşık 25 mg/ml DOTAP içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,9 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,0 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,1 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,2 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/ml, yaklaşık 1,3 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,4 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,5 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,6 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,7 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 24 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 22 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 20 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 18 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 15 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 12 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 10 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 5 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,9 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,8 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,7 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL, yaklaşık 0,9 mg/mL, yaklaşık 1,0 mg/mL, yaklaşık 1,1 mg/mL, yaklaşık 1,2 mg/mL, yaklaşık 1,3 mg/mL, yaklaşık 1,4 mg/mL, yaklaşık 1,5

Belirli düzeneklerde emülsiyon içindeki katyonik lipit, DOTAP'tır. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.5 mg/ml ila yaklaşık 25 mg/ml DOTAP içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,9 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,0 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,1 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,2 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/ml, yaklaşık 1,3 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,4 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,5 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,6 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 1,7 mg/mL ila yaklaşık 25 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 24 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 22 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 20 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 18 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 15 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 12 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 10 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 5 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,9 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,8 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,7 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 0,5 mg/mL, yaklaşık 0,6 mg/mL, yaklaşık 0,7 mg/mL, yaklaşık 0,8 mg/mL, yaklaşık 0,9 mg/mL, yaklaşık 1,0 mg/mL, yaklaşık 1,1 mg/mL, yaklaşık 1,2 mg/mL, yaklaşık 1,3 mg/mL, yaklaşık 1,4 mg/mL, yaklaşık 1,5

mg/mL, yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 12 mg/mL, yaklaşık 18 mg/mL, yaklaşık 20 mg/mL, yaklaşık 21,8 mg/mL, yaklaşık 24 mg/mL, vb. DOTAP içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, örn., 0,8 mg/mL, 1,2 mg/mL, 1,4 mg/mL ya da 1,6 mg/ml DOTAP içerir.

Belirli düzeneklerde katyonik lipit, DC Kolesteroldür. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml arasında DC Kolesterol olmak üzere DC Kolesterol içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,1 mg/mL ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,62 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2,46 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4,92 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 3,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 3 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 2,46 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 1,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 1 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 0,62 mg/ml, yaklaşık 0,15 mg/ml, yaklaşık 0,3 mg/ml, yaklaşık 0,6 mg/ml, yaklaşık 0,62 mg/ml, yaklaık 0,9 mg/ml, yaklaşık 1,2 mg/ml, yaklaşık 2,46 mg/ml, yaklaşık 4,92 mg/ml, vb. DC Kolesterol içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su

mg/mL, yaklaşık 1,6 mg/mL, yaklaşık 12 mg/mL, yaklaşık 18 mg/mL, yaklaşık 20 mg/mL, yaklaşık 21,8 mg/mL, yaklaşık 24 mg/mL, vb. DOTAP içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,8 mg/mL ila yaklaşık 1,6 mg/mL, örn., 0,8 mg/mL, 1,2 mg/mL, 1,4 mg/mL ya da 1,6 mg/ml DOTAP içerir.

Belirli düzeneklerde katyonik lipit, DC Kolesteroldür. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml arasında DC Kolesterol olmak üzere DC Kolesterol içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,1 mg/mL ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,62 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2,46 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4,5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4,92 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ile yaklaşık 4 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 3,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 3 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 2,46 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 1,5 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 1 mg/ml, yaklaşık 0,1 mg/ml ila yaklaşık 0,62 mg/ml, yaklaşık 0,15 mg/ml, yaklaşık 0,3 mg/ml, yaklaşık 0,6 mg/ml, yaklaşık 0,62 mg/ml, yaklaık 0,9 mg/ml, yaklaşık 1,2 mg/ml, yaklaşık 2,46 mg/ml, yaklaşık 4,92 mg/ml, vb. DC Kolesterol içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su

içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,62 mg/ml ila yaklaşık 4,92 mg/ml arasında, örn., 2,46 mg/ml DC Kolesterol içerir.

Belirli düzeneklerde katyonik lipit, DDA'dır. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml arasında DDA içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 4.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 4 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 3.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 3 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 2.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 1.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 1.45 mg/ml, yaklaşık 0.2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.6 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.73 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.8 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.9 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.0 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.45 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.2 mg/ml, yaklaşık 1.45 mg/ml, vb. DDA içerebilir. Alternatif olarak, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 20 mg/ml, yaklaşık 21 mg/ml, yaklaşık 21.5 mg/ml, yaklaşık 21.6 mg/ml, yaklaşık 25 mg/ml DDA içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.73 mg/ml ila yaklaşık 1.45 mg/ml, örn., 1.45 mg/ml DDA içerir.

içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0,62 mg/ml ila yaklaşık 4,92 mg/ml arasında, örn., 2,46 mg/ml DC Kolesterol içerir.

Belirli düzeneklerde katyonik lipit, DDA'dır. Katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml arasında DDA içerebilir. Örneğin, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 4.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 4 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 3.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 3 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 2.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 2 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 1.5 mg/ml, yaklaşık 0.1 mg/ml ila yaklaşık 1.45 mg/ml, yaklaşık 0.2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.6 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.73 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.8 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 0.9 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.0 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.45 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 2.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 3.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 4.5 mg/ml ila yaklaşık 5 mg/ml, yaklaşık 1.2 mg/ml, yaklaşık 1.45 mg/ml, vb. DDA içerebilir. Alternatif olarak, katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 20 mg/ml, yaklaşık 21 mg/ml, yaklaşık 21.5 mg/ml, yaklaşık 21.6 mg/ml, yaklaşık 25 mg/ml DDA içerebilir. Bir örnek düzenekte katyonik su içinde yağ emülsiyonu, yaklaşık 0.73 mg/ml ila yaklaşık 1.45 mg/ml, örn., 1.45 mg/ml DDA içerir.

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerini, çıplak RNA olarak veya bir verme sistemi ile kombinasyon halinde bir hedef organa veya dokuya vermek için kateterler veya benzeri cihazlar kullanılabilir. Uygun kateterler, *örn.,* ABD Pat. No. 4,186,745; 5,397,307; 5,547,472; 5,674,192; ve 6,129,705'te açıklanır.

Mevcut buluş, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü vermek, örneğin bir immün yanıt ortaya çıkarmak için uygun verme sistemlerinin, örn., kapsüle edilmiş veya adsorbe edilmiş kendi kendini kopyalayan RNA'nın bulunduğu lipozomlar, polimer mikropartikülleri veya mikron altı emülsiyon mikropartiküllerinin tek başlarına veya bir başka makromolekül ile kombinasyon halinde kullanılmasını kapsar. Buluş, adsorbe edilmiş ve/veya kapsüle edilmiş kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinin bulunduğu lipozomlar, mikropartiküller ve mikron altı emülsiyonlar ve bunların kombinasyonlarını kapsar.

Lipozomlar ve mikron altı emülsiyon mikropartikülleriyle bağlantılı kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, bir konakçı hücreye etkili bir şekilde verilebilir ve kendi kendini kopyalayan RNA'nın şifrelediği proteine bir immün yanıt indükleyebilir.

RSV proteinlerini şifreleyen polisistronik kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri ve polisistronik alfavirüsü replikonları kullanılarak üretilen VRPler, bir hücrede RSV proteini kompleksleri oluşturmak için kullanılabilir. Bazı düzeneklerde bir hücreye, VRPlerin veya iki veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen sekanslar ihtiva eden VRPlerin kombinasyonları verilir. Bazı düzeneklerde bir

Buluşa ait kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerini, çıplak RNA olarak veya bir verme sistemi ile kombinasyon halinde bir hedef organa veya dokuya vermek için kateterler veya benzeri cihazlar kullanılabilir. Uygun kateterler, *örn.,* ABD Pat. No. 4,186,745; 5,397,307; 5,547,472; 5,674,192; ve 6,129,705'te açıklanır.

Mevcut buluş, iki veya daha fazla RSV proteinini şifreleyen bir kendi kendini kopyalayan RNA molekülü vermek, örneğin bir immün yanıt ortaya çıkarmak için uygun verme sistemlerinin, örn., kapsüle edilmiş veya adsorbe edilmiş kendi kendini kopyalayan RNA'nın bulunduğu lipozomlar, polimer mikropartikülleri veya mikron altı emülsiyon mikropartiküllerinin tek başlarına veya bir başka makromolekül ile kombinasyon halinde kullanılmasını kapsar. Buluş, adsorbe edilmiş ve/veya kapsüle edilmiş kendi kendini kopyalayan RNA moleküllerinin bulunduğu lipozomlar, mikropartiküller ve mikron altı emülsiyonlar ve bunların kombinasyonlarını kapsar.

Lipozomlar ve mikron altı emülsiyon mikropartikülleriyle bağlantılı kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri, bir konakçı hücreye etkili bir şekilde verilebilir ve kendi kendini kopyalayan RNA'nın şifrelediği proteine bir immün yanıt indükleyebilir.

RSV proteinlerini şifreleyen polisistronik kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri ve polisistronik alfavirüsü replikonları kullanılarak üretilen VRPler, bir hücrede RSV proteini kompleksleri oluşturmak için kullanılabilir. Bazı düzeneklerde bir hücreye, VRPlerin veya iki veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen sekanslar ihtiva eden VRPlerin kombinasyonları verilir. Bazı düzeneklerde bir

hücreye, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya iki veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri verilir.

Anti-RSV immün yanıt indükleyici kompozisyon

Anti-RSV immün yanıt indükleyici kompozisyonlar, bir veya daha fazla immünoregüle edici ajan içerebilir. Tercihen immünoregüle edici ajanlardan biri veya daha fazlası, bir veya daha fazla adjuvan, örneğin iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan içerir. Adjuvanlar, aşağıda da tartışılan bir TH1 adjuvanı ve/veya bir TH2 adjuvanını kapsayabilir.

Buluşa ait kompozisyonlar, adjuvanlar da dahil olmak üzere, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve/veya eksipiyan içerebilir. Bu tür bileşenlerle ilgili kapsamlı bir tartışma, Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20Nci baskı, ISBN: 0683306472'de bulunabilir. Kompozisyonlar genel olarak sulu formda bulunacaktır.

Kompozisyon, tiyomersal veya 2-fenoksietanol gibi prezervatifler içerebilir. Bununla birlikte aşının, cıvalı materyallerden önemli ölçüde muaf (yani 5µg/ml'den az) olması, örn., tiyomersal içermemesi tercih edilir. Hiç cıva ihtiva etmeyen immünojenik kompozisyonlar daha çok tercih edilir. Prezervatif içermeyen immünojenik kompozisyonlar özellikle tercih edilir.

Tonikliğin kontrol edilmesi için bir sodyum tuzu gibi bir fizyolojik tuz dahil edilmesi tercih edilir. 1 ile 20 mg/mL arasında mevcut

hücreye, kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri veya iki veya daha fazla RSV proteinini veya fragmanını şifreleyen kendi kendini kopyalayan RNA molekülleri verilir.

Anti-RSV immün yanıt indükleyici kompozisyon

Anti-RSV immün yanıt indükleyici kompozisyonlar, bir veya daha fazla immünoregüle edici ajan içerebilir. Tercihen immünoregüle edici ajanlardan biri veya daha fazlası, bir veya daha fazla adjuvan, örneğin iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan içerir. Adjuvanlar, aşağıda da tartışılan bir TH1 adjuvanı ve/veya bir TH2 adjuvanını kapsayabilir.

Buluşa ait kompozisyonlar, adjuvanlar da dahil olmak üzere, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ve/veya eksipiyan içerebilir. Bu tür bileşenlerle ilgili kapsamlı bir tartışma, Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20Nci baskı, ISBN: 0683306472'de bulunabilir. Kompozisyonlar genel olarak sulu formda bulunacaktır.

Kompozisyon, tiyomersal veya 2-fenoksietanol gibi prezervatifler içerebilir. Bununla birlikte aşının, cıvalı materyallerden önemli ölçüde muaf (yani 5µg/ml'den az) olması, örn., tiyomersal içermemesi tercih edilir. Hiç cıva ihtiva etmeyen immünojenik kompozisyonlar daha çok tercih edilir. Prezervatif içermeyen immünojenik kompozisyonlar özellikle tercih edilir.

Tonikliğin kontrol edilmesi için bir sodyum tuzu gibi bir fizyolojik tuz dahil edilmesi tercih edilir. 1 ile 20 mg/mL arasında mevcut

olabilecek sodyum klorür (NaCl) tercih edilir. Mevcut olabilecek diğer tuzlar arasında, potasyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat, disodyum fosfat dihidrat, magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve benzeri bulunur.

Kompozisyonların ozmolalitesi genel olarak 200 mOsm/kg ile 400 mOsm/kg arasında, tercihen 240-360 mOsm/kg arasında olacak ve daha tercihen 290-310 mOsm/kg aralığında yer alacaktır.

Kompozisyonlar, bir veya daha fazla tampon içerebilir. Tipik tamponlar arasında bir fosfat tamponu, bir Tris tamponu, bir borat tamponu, bir sukinat tamponu, bir histidin tamponu (özellikle bir alüminyum hidroksit adjuvan ile) veya bir sitrat tamponu yer alır. Tamponlar tipik olarak 5-20mM aralığında yer alacaktır. Bir kompozisyonun pH'si genel olarak 5,0 ile 8,1 arasında ve daha tipik olarak 6,0 ile 8,0 arasında, örn., 6,5 ile 7,5 arasnda veya 7,0 ile 7,8 arasında olacaktır. Bu yüzden buluşa ait bir proses, ambalajlanmadan önce yığın aşının pH'sinin ayarlandığı bir adım içerebilir.

Kompozisyon tercihen sterildir. Kompozisyon tercihen pirojenik değildir, örn., doz başına < 1 EU (endotoksin birimi, bir standart ölçü) ve tercihen < 0,1 EU ihtiva eder. Kompozisyon tercihen gluten içermez. İnsan aşıları tipik olarak yaklaşık 0,5 mL'lik bir dozaj hacminde uygulanır; bununla birlikte çocuklara, yarım doz (yani yaklaşık 0,25 mL) uygulanabilir.

RSV-F polipeptitleri veya RSV-F polipeptidlerini şifreleyen nükleik asitler ihtiva eden buluşa ait kompozisyonlar ayrıca kompozisyonu

olabilecek sodyum klorür (NaCl) tercih edilir. Mevcut olabilecek diğer tuzlar arasında, potasyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat, disodyum fosfat dihidrat, magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve benzeri bulunur.

Kompozisyonların ozmolalitesi genel olarak 200 mOsm/kg ile 400 mOsm/kg arasında, tercihen 240-360 mOsm/kg arasında olacak ve daha tercihen 290-310 mOsm/kg aralığında yer alacaktır.

Kompozisyonlar, bir veya daha fazla tampon içerebilir. Tipik tamponlar arasında bir fosfat tamponu, bir Tris tamponu, bir borat tamponu, bir sukinat tamponu, bir histidin tamponu (özellikle bir alüminyum hidroksit adjuvan ile) veya bir sitrat tamponu yer alır. Tamponlar tipik olarak 5-20mM aralığında yer alacaktır. Bir kompozisyonun pH'si genel olarak 5,0 ile 8,1 arasında ve daha tipik olarak 6,0 ile 8,0 arasında, örn., 6,5 ile 7,5 arasnda veya 7,0 ile 7,8 arasında olacaktır. Bu yüzden buluşa ait bir proses, ambalajlanmadan önce yığın aşının pH'sinin ayarlandığı bir adım içerebilir.

Kompozisyon tercihen sterildir. Kompozisyon tercihen pirojenik değildir, örn., doz başına < 1 EU (endotoksin birimi, bir standart ölçü) ve tercihen < 0,1 EU ihtiva eder. Kompozisyon tercihen gluten içermez. İnsan aşıları tipik olarak yaklaşık 0,5 mL'lik bir dozaj hacminde uygulanır; bununla birlikte çocuklara, yarım doz (yani yaklaşık 0,25 mL) uygulanabilir.

RSV-F polipeptitleri veya RSV-F polipeptidlerini şifreleyen nükleik asitler ihtiva eden buluşa ait kompozisyonlar ayrıca kompozisyonu

alan bir hastada ortaya çıkan immün yanıtları (hümoral ve/veya hücresel) güçlendirme görevi görebilen bir veya daha fazla adjuvan, örneğin iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan da içerebilir. Adjuvanlar arasında bir TH1 adjuvanı ve/veya bir TH2 adjuvanı bulunabilir. Buluşa ait kompozisyonlarda kullanılabilecek adjuvanlar arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, şunlar bulunur:

- Mineral içerikli kompozisyonlar. Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun mineral içerikli kompozisyonlar araısnda kalsiyum tuzları ve alüminyum tuzları (ya da bunların karışımları) gibi mineral tuzları bulunur. Buluş, hidroksitler (örn., oksihidroksitler), fosfatlar (örn., hidroksifosfatlar, ortofosfatlar), sülfatlar, vb. gibi mineral tuzları ya da farklı mineral bileşiklerinin karışımlarını kapsar, söz konusu bileşikler, uygun herhangi bir form (örn., jel, kristal, amorf vb.) alabilirler ve adsorpsiyon tercih edilir. Kalsiyum tuzları arasında kalsiyum fosfat (*örn.,* ABD Patenti No.6355271'de açıklanan "CAP" partikülleri) bulunur. Alüminyum tuzları arasında hidroksitler, fosfatlar, sülfatlar ve benzeri bulunur. Mineral içerikli kompozisyonlar. Ayrıca bir metal tuzu partikülü şeklinde de formüle edilebilir (WO00/23105). Alüminyum tuzu adjuvanları aşağıda daha ayrıntılı olarak tarif edilmektedir.
- Yağ emülsiyon kompozisyonları (daha fazla detayl için aşağı bakınız). Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun yağ emülsiyonu kompozisyonları arasında MF59 (bir mikro-akışkanlaştırıcı kullanılarak mikron altı partiküller halinde formüle edilen, %5, Skualen, %0,5 Tween 80 ve %0,5 Span) gibi skualen-su emülsiyonları bulunur.

alan bir hastada ortaya çıkan immün yanıtları (hümoral ve/veya hücresel) güçlendirme görevi görebilen bir veya daha fazla adjuvan, örneğin iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan da içerebilir. Adjuvanlar arasında bir TH1 adjuvanı ve/veya bir TH2 adjuvanı bulunabilir. Buluşa ait kompozisyonlarda kullanılabilecek adjuvanlar arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, şunlar bulunur:

- Mineral içerikli kompozisyonlar. Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun mineral içerikli kompozisyonlar araısnda kalsiyum tuzları ve alüminyum tuzları (ya da bunların karışımları) gibi mineral tuzları bulunur. Buluş, hidroksitler (örn., oksihidroksitler), fosfatlar (örn., hidroksifosfatlar, ortofosfatlar), sülfatlar, vb. gibi mineral tuzları ya da farklı mineral bileşiklerinin karışımlarını kapsar, söz konusu bileşikler, uygun herhangi bir form (örn., jel, kristal, amorf vb.) alabilirler ve adsorpsiyon tercih edilir. Kalsiyum tuzları arasında kalsiyum fosfat (*örn.,* ABD Patenti No.6355271'de açıklanan "CAP" partikülleri) bulunur. Alüminyum tuzları arasında hidroksitler, fosfatlar, sülfatlar ve benzeri bulunur. Mineral içerikli kompozisyonlar. Ayrıca bir metal tuzu partikülü şeklinde de formüle edilebilir (WO00/23105). Alüminyum tuzu adjuvanları aşağıda daha ayrıntılı olarak tarif edilmektedir.
- Yağ emülsiyon kompozisyonları (daha fazla detayl için aşağı bakınız). Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun yağ emülsiyonu kompozisyonları arasında MF59 (bir mikro-akışkanlaştırıcı kullanılarak mikron altı partiküller halinde formüle edilen, %5, Skualen, %0,5 Tween 80 ve %0,5 Span) gibi skualen-su emülsiyonları bulunur.

- Sitokin indükleyici ajanlar (daha fazla detay için aşağı bakınız). Buluşta kullanıma uygun sitokin indükleyici ajanlar araısnda çan benzeri reseptör 7 (TLR7) agonistleri (*örn.* WO 2009/111337.
- Saponins (bölüm 22, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)'te açıklanan benzonaftiridin bileşikleri) yer alır ki bunlar, geniş bir aralıkta bitki türlerinin kabuğu, yaprakları, sapları, kökleri ve hatta çiçeklerinde bulunan sterol glikosidler ve triterpenoid glikosidler içeren bir heterolog gruptur. *Quillaia saponaria* Molina ağacının kabuğundan gelen saponin, adjuvanlar olarak kapsamlı biçimde incelenmiştir. Ayrıca *Smilax ornata* (saparna), *Gypsophilla paniculata* (gelin duvağı) ve *Saponaria officianalis* (çöven) kökenli saponin de ticari olarak temin edilebilir. Saponin adjuvan formülasyonları arasında QS21 gibi saflaştırılmış formülasyonlar ve ayrıca ISCOMlar gibi lipit formülasyonları bulunur. QS21, STIMULON(TM) olarak satılır. Saponin kompozisyonları, HPLC ve RP-HPLC kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu teknikler kullanılarak saflaştırılmış spesifik fraksiyonlar, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B ve QH-C de dahil olmak üzere tanımlanmıştır.Tercihen saponi,n QS21'dir. Bit QS21 üretme yöntemi, ABD Patenti No. 5,057,540'ta açıklanmıştır. Saponin formülasyonları ayrıca kolesterol gibi bir sterol de içerebilir (WO96/33739). Saponinler ve kolesteroller içeren kombinasyonlar, immünouyarıcı kompleksler (ISCOMlar) adıyla anılan eşsiz partiküller oluşturmak için kullanılabilir (bölüm 23, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). ISCOM'lar tipik olarak ayrıca fosfatidiletanolamin veya fosfatidilkolin gibi bir fosfolipid de içerir.

- Sitokin indükleyici ajanlar (daha fazla detay için aşağı bakınız). Buluşta kullanıma uygun sitokin indükleyici ajanlar araısnda çan benzeri reseptör 7 (TLR7) agonistleri (*örn.* WO 2009/111337.
- Saponins (bölüm 22, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)'te açıklanan benzonaftiridin bileşikleri) yer alır ki bunlar, geniş bir aralıkta bitki türlerinin kabuğu, yaprakları, sapları, kökleri ve hatta çiçeklerinde bulunan sterol glikosidler ve triterpenoid glikosidler içeren bir heterolog gruptur. *Quillaia saponaria* Molina ağacının kabuğundan gelen saponin, adjuvanlar olarak kapsamlı biçimde incelenmiştir. Ayrıca *Smilax ornata* (saparna), *Gypsophilla paniculata* (gelin duvağı) ve *Saponaria officianalis* (çöven) kökenli saponin de ticari olarak temin edilebilir. Saponin adjuvan formülasyonları arasında QS21 gibi saflaştırılmış formülasyonlar ve ayrıca ISCOMlar gibi lipit formülasyonları bulunur. QS21, STIMULON(TM) olarak satılır. Saponin kompozisyonları, HPLC ve RP-HPLC kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu teknikler kullanılarak saflaştırılmış spesifik fraksiyonlar, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B ve QH-C de dahil olmak üzere tanımlanmıştır.Tercihen saponi,n QS21'dir. Bit QS21 üretme yöntemi, ABD Patenti No. 5,057,540'ta açıklanmıştır. Saponin formülasyonları ayrıca kolesterol gibi bir sterol de içerebilir (WO96/33739). Saponinler ve kolesteroller içeren kombinasyonlar, immünouyarıcı kompleksler (ISCOMlar) adıyla anılan eşsiz partiküller oluşturmak için kullanılabilir (bölüm 23, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). ISCOM'lar tipik olarak ayrıca fosfatidiletanolamin veya fosfatidilkolin gibi bir fosfolipid de içerir.

ISCOMlarda herhangi bir bilinen saponin kullanılabilir. Tercihen ISCOM, QuilA, QHA ve QHC'den birini veya daha fazlasını içerir. ISCOMlar ayrıca WO96/337391, EP-A-0109942 ve WO96/11711'de de tarif edilir. İsteğe bağlı olarak ISCOMLAR, ilave deterjandan yoksun olabilir (WO00/07621). Saponin bazlı adjuvanların geliştirilmesi ile ilgili bir inceleme, Barr ve arkadaşları (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271 ve Sjolanderet ve arkadaşları (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338'de bulunabilir.

- Enterobakteriyel lipopolisakaritler, fosfolipit bileşikleri (örn., sentetik fosfolipit dimeri, E6020) ve benzerinden türetilen modifiye edilmiş doğal lipit A'lar olan su içinde yağ emülsiyonları da dahil olmak üzere yağlı adjuvanlar (daha fazla detay için aşağı bakınız).
- Bakteriyel ADP ribosile edici toksinler (*örn.*, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksin "LT", kolera toksini "CT" veya boğmaca toksini "PT") ve bunların detoksifye edilmiş türevleri, örn., LT-K63 ve LT-R72 olarak bilinen mutant toksinler (Pizza ve arkadaşları (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461). Detoksifiye edilmiş ADP ribosile edici toksinlerin mukozal adjuvanlar olarak kullanımı, WO95/17211'de ve parenteral adjuvanlar olarak kullanımı, WO98/42375'te tarif edilir.
- Biyo-adhesifler ve muko-adhesifler, örn., esterlenmiş hiyaluronik asit mikrosferleri (Singh ve arkadaşları (2001) J Cont Release 70:267-276) veya çitosan ve bunun türevleri (WO99/27960).
- Biyo-bozunur ve toksik olmayan materyallerden (*örn.*, bir poli(α-hidroksi asit), bir polihidroksibutirik asit, bir poliortoester, bir polianhidrid, bir polikaprolakton ve benzeri) oluşturulan, poli(laktit-ko-glikolid) tercih edilmekle birlikte, bir negatif yüklü yüzeye (örn., SDS ile) veya bir pozitif yüklü yüzeye (örn., CTAB gibi bir katyonik

ISCOMlarda herhangi bir bilinen saponin kullanılabilir. Tercihen ISCOM, QuilA, QHA ve QHC'den birini veya daha fazlasını içerir. ISCOMlar ayrıca WO96/337391, EP-A-0109942 ve WO96/11711'de de tarif edilir. İsteğe bağlı olarak ISCOMLAR, ilave deterjandan yoksun olabilir (WO00/07621). Saponin bazlı adjuvanların geliştirilmesi ile ilgili bir inceleme, Barr ve arkadaşları (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271 ve Sjolanderet ve arkadaşları (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338'de bulunabilir.

- Enterobakteriyel lipopolisakaritler, fosfolipit bileşikleri (örn., sentetik fosfolipit dimeri, E6020) ve benzerinden türetilen modifiye edilmiş doğal lipit A'lar olan su içinde yağ emülsiyonları da dahil olmak üzere yağlı adjuvanlar (daha fazla detay için aşağı bakınız).
- Bakteriyel ADP ribosile edici toksinler (*örn.*, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksin "LT", kolera toksini "CT" veya boğmaca toksini "PT") ve bunların detoksifye edilmiş türevleri, örn., LT-K63 ve LT-R72 olarak bilinen mutant toksinler (Pizza ve arkadaşları (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461). Detoksifiye edilmiş ADP ribosile edici toksinlerin mukozal adjuvanlar olarak kullanımı, WO95/17211'de ve parenteral adjuvanlar olarak kullanımı, WO98/42375'te tarif edilir.
- Biyo-adhesifler ve muko-adhesifler, örn., esterlenmiş hiyaluronik asit mikrosferleri (Singh ve arkadaşları (2001) J Cont Release 70:267-276) veya çitosan ve bunun türevleri (WO99/27960).
- Biyo-bozunur ve toksik olmayan materyallerden (*örn.*, bir poli(α-hidroksi asit), bir polihidroksibutirik asit, bir poliortoester, bir polianhidrid, bir polikaprolakton ve benzeri) oluşturulan, poli(laktit-ko-glikolid) tercih edilmekle birlikte, bir negatif yüklü yüzeye (örn., SDS ile) veya bir pozitif yüklü yüzeye (örn., CTAB gibi bir katyonik

deterjan ile) sahip olması için isteğe bağlı olarak işleme tabi tutulan mikropartiküller (yani çapı ~100 nm ila ~150 µm arasında, daha tercihen çapı ~200 nm ila ~30 µm arasında veya çapı ~500 nm ila ~10 µm arasında olan bir partikül).

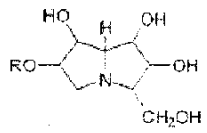
- Lipozomlar (Bölüm 13 ve 14, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Adjuvanlar olarak kullanıma uygun lipozom formülasyonlarının örnekleri, ABD Patenti No. 6,090,406, ABD Patenti No. 5,916,588 ve EP-A-0626169'da tarif edilir.
- Polioksietilen eterler ve polioksietilen esterler (WO99/52549). Bu tür formülasyonlar ayrıca polioksietilen sorbitan ester surfektanlarını bir oktoksinol ile kombinasyon halinde (WO01/21207) ve ayrıca polioksietilen alkil eterler veya ester surfektanlarını bir oktoksinol gibi en az bir ilave iyonik olmayan surfektan ile kombinasyon halinde içerir. Tercih edilen polioksietilen eterler, aşağıdaki gruptan seçilir: polioksietilen-9-lauril eter (lauret 9), polioksietilen-9-steoril eter, polioksietilen-8-steoril eter, polioksietilen-4-lauril eter, polioksietilen-35-lauril eter ve polioksietilen-23-lauril eter.
- Muramil peptitler, örn., N-asetilmuramil-L-treonil-D-izoglutamin ("thr-MDP"), N-asetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamin (nor-MDP), N-asetilgluksaminil -N-asetilmuramil-L-Al-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksi propilamid ("DTP-DPP" ya da "Theramide™"), N-asetilmuramil-L-alanil -D-izoglutaminil-L-alanin -2-(1'-2'dipal-mitoil-sn-glisero-3-hidroksifosforiloksi)-etilamin ("MTP-PE").
- Bir birinci Gram-negatif bakteriden hazırlanmış bir dış membran protein proteozom preparasyonu ile kombinasyon halinde

deterjan ile) sahip olması için isteğe bağlı olarak işleme tabi tutulan mikropartiküller (yani çapı ~100 nm ila ~150 µm arasında, daha tercihen çapı ~200 nm ila ~30 µm arasında veya çapı ~500 nm ila ~10 µm arasında olan bir partikül).

- Lipozomlar (Bölüm 13 ve 14, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Adjuvanlar olarak kullanıma uygun lipozom formülasyonlarının örnekleri, ABD Patenti No. 6,090,406, ABD Patenti No. 5,916,588 ve EP-A-0626169'da tarif edilir.
- Polioksietilen eterler ve polioksietilen esterler (WO99/52549). Bu tür formülasyonlar ayrıca polioksietilen sorbitan ester surfektanlarını bir oktoksinol ile kombinasyon halinde (WO01/21207) ve ayrıca polioksietilen alkil eterler veya ester surfektanlarını bir oktoksinol gibi en az bir ilave iyonik olmayan surfektan ile kombinasyon halinde içerir. Tercih edilen polioksietilen eterler, aşağıdaki gruptan seçilir: polioksietilen-9-lauril eter (lauret 9), polioksietilen-9-steoril eter, polioksietilen-8-steoril eter, polioksietilen-4-lauril eter, polioksietilen-35-lauril eter ve polioksietilen-23-lauril eter.
- Muramil peptitler, örn., N-asetilmuramil-L-treonil-D-izoglutamin ("thr-MDP"), N-asetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamin (nor-MDP), N-asetilgluksaminil -N-asetilmuramil-L-Al-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksi propilamid ("DTP-DPP" ya da "Theramide™"), N-asetilmuramil-L-alanil -D-izoglutaminil-L-alanin -2-(1'-2'dipal-mitoil-sn-glisero-3-hidroksifosforiloksi)-etilamin ("MTP-PE").
- Bir birinci Gram-negatif bakteriden hazırlanmış bir dış membran protein proteozom preparasyonu ile kombinasyon halinde

bir ikinci Gram-negatif bakteriden türetilmiş bir lipopolisakarit preparasyonu; burada dış membran protein proteozom ve liposakarit preparasyonları, bir stabil kovalent olmayan adjuvan kompleksi oluşturur. Bu tür kompleksler arasında *Neisseria meningitidis* dış membranı ve lipopolisakaritlerden oluşan bir kompleks olan "IVX-908" bulunur.

- Bir polioksidonyum polimeri (Dyakonova ve arkadaşları (2004) Int Immunopharmacol 4(13): 1615-23, FR-2859633) veya başka N-oksidize edilmiş polietilen-piperazin türevi.
- Metil inosin 5'-monofosfat ("MIMP") (Signorelli ve Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86).
- Bir polihdroksile edilmiş pirolizidin bileşiği (WO2004/064715), örn., şu formüle sahip olan:

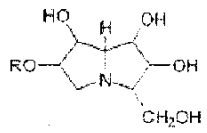


burada R, hidrojen, düz veya dallı, ikame edilmemiş veya ikame edilmiş, doymuş veya doymamış asil, alkil (*örn.,* sikloalkil), alkenil, alkinil ve aril gruplarını veya bunların farmasötik açıdan kabul edilebilir bir tuzu veya türevini kapsayan gruptan seçilir. Örnekler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, kasuarin, kasuarin-6-α-D-glukopiranoz, 3-*epi*-kasuarin, 7-*epi*-kasuarin, 3,7-di*epi*-kasuarin ve benzeri bulunur.

- Bir CD1d ligandı, örn., bir α-glikosilseramid (De Libero ve arkadaşları, (2005) Nature Reviews Immunology 5:485-496; ABD Patenti No.5,936,076; Old ve arkadaşları, J Clin Investig, 113:1631-

bir ikinci Gram-negatif bakteriden türetilmiş bir lipopolisakarit preparasyonu; burada dış membran protein proteozom ve liposakarit preparasyonları, bir stabil kovalent olmayan adjuvan kompleksi oluşturur. Bu tür kompleksler arasında *Neisseria meningitidis* dış membranı ve lipopolisakaritlerden oluşan bir kompleks olan "IVX-908" bulunur.

- Bir polioksidonyum polimeri (Dyakonova ve arkadaşları (2004) Int Immunopharmacol 4(13): 1615-23, FR-2859633) veya başka N-oksidize edilmiş polietilen-piperazin türevi.
- Metil inosin 5'-monofosfat ("MIMP") (Signorelli ve Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86).
- Bir polihdroksile edilmiş pirolizidin bileşiği (WO2004/064715), örn., şu formüle sahip olan:



burada R, hidrojen, düz veya dallı, ikame edilmemiş veya ikame edilmiş, doymuş veya doymamış asil, alkil (*örn.,* sikloalkil), alkenil, alkinil ve aril gruplarını veya bunların farmasötik açıdan kabul edilebilir bir tuzu veya türevini kapsayan gruptan seçilir. Örnekler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, kasuarin, kasuarin-6-α-D-glukopiranoz, 3-*epi*-kasuarin, 7-*epi*-kasuarin, 3,7-di*epi*-kasuarin ve benzeri bulunur.

- Bir CD1d ligandı, örn., bir α-glikosilseramid (De Libero ve arkadaşları, (2005) Nature Reviews Immunology 5:485-496; ABD Patenti No.5,936,076; Old ve arkadaşları, J Clin Investig, 113:1631-

1640; US2005/0192248; Yang ve arkadaşları (2004) Angew Chem Int Ed 43:3818-3822; WO2005/102049; Goffet ve arkadaşları (2004) Am Chem Soc 126:13602-13603; WO03/105769) (*örn.*, α-galaktosilseramid), fitosfingosin içerikli α-glikosilseramidler, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galaktopiranosil)-2-(N-heksakosanoilamino)-1,3,4-oktadekantriol], CRONY-101, 3"-O-sülfogalaktosilseramid, *vb.*

- Bir gamma inulin (Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80) veya bunun türevi, örn., algammulin.
- Virozomlar ve virüs benzeri partiküller (VLPler). Bu yapılar genellikle isteğe bağlı olarak bir fosfolipid ile birleştirilmiş veya formüle edilmiş bir virüsten bir veya daha fazla protein ihtiva eder. Bunlar genellikle patojenik değildir, kopylanmaz ve genellikle herhangi bir doğal viral genom ihtiva etmez. Viral proteinler, tam virüslerden rekombinant şekilde üretilebilir veya izole edilebilir. Virozomlar veya VLPlerde kullanıma uygun olan bu viral proteinler arasında influenza virüsü (örn., HA veya NA), Hepatit B virüsü (örn., nüve veya kapsid proteinleri), Hepatit E virüsü, kızamık virüsü, Sindbis virüsü, Rotavirüsü, Ayak ve Ağız Hastalığı virüsü, Retrovirüs, Norwalk virüsü, insan Papilloma virüsü, HIV, RNA-fajları, Qβ-fajı (örn., kılıf proteinleri), GA-fajı, fr-fajı, AP205 fajı ve Ty'den (örn., retrotransposon Ty proteini p1) türetilen proteinler bulunur.

Bu ve diğer adjuvan aktif maddeler, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) ve Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine

1640; US2005/0192248; Yang ve arkadaşları (2004) Angew Chem Int Ed 43:3818-3822; WO2005/102049; Goffet ve arkadaşları (2004) Am Chem Soc 126:13602-13603; WO03/105769) (*örn.*, α-galaktosilseramid), fitosfingosin içerikli α-glikosilseramidler, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galaktopiranosil)-2-(N-heksakosanoilamino)-1,3,4-oktadekantriol], CRONY-101, 3"-O-sülfogalaktosilseramid, *vb.*

- Bir gamma inulin (Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80) veya bunun türevi, örn., algammulin.
- Virozomlar ve virüs benzeri partiküller (VLPler). Bu yapılar genellikle isteğe bağlı olarak bir fosfolipid ile birleştirilmiş veya formüle edilmiş bir virüsten bir veya daha fazla protein ihtiva eder. Bunlar genellikle patojenik değildir, kopylanmaz ve genellikle herhangi bir doğal viral genom ihtiva etmez. Viral proteinler, tam virüslerden rekombinant şekilde üretilebilir veya izole edilebilir. Virozomlar veya VLPlerde kullanıma uygun olan bu viral proteinler arasında influenza virüsü (örn., HA veya NA), Hepatit B virüsü (örn., nüve veya kapsid proteinleri), Hepatit E virüsü, kızamık virüsü, Sindbis virüsü, Rotavirüsü, Ayak ve Ağız Hastalığı virüsü, Retrovirüs, Norwalk virüsü, insan Papilloma virüsü, HIV, RNA-fajları, Qβ-fajı (örn., kılıf proteinleri), GA-fajı, fr-fajı, AP205 fajı ve Ty'den (örn., retrotransposon Ty proteini p1) türetilen proteinler bulunur.

Bu ve diğer adjuvan aktif maddeler, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) ve Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine

serisi). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan'da daha detaylı tartışılmaktadır.

Kompozisyonlar, iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan içerebilir. Örneğin buluşa ait kompozisyonlar avantajlı bir şekilde hem bir su içinde yağ emülsiyonu hem de bir sitokin indükleyici ajan veya hem bir mineral içerikli kompozisyon hem de bir sitokin indükleyici ajan veya iki adet su içinde yağ emülsiyonu adjuvanı veya iki adet benzonaftiridin bileşiği, vb. içerebilir.

Bir kompozisyon içerisinde yer alan antijenler ve adjuvanlar tipik olarak karışım halinde olacaktır.

Yağ emülsiyonu adjuvanları

Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun yağ emülsiyonu kompozisyonları arasında skualen-su emülsiyonları, örn., MF59 (bir mikro-akışkanlaştırıcı kullanılarak mikron altı partiküller halinde formüle edilen, %5, Skualen, %0,5 Tween 80 ve %0,5 Span 85) bulunur. Tam Freund adjuvanı (CFA) ve tam olmayan Freund adjuvanı (IFA) da kullanılabilir.

Çeşitli su içinde yağ emülsiyonları bilinmektedir, ve bunlar tipik olarak en az bir adet yağ ve en az bir adet surfektan içerir ve bu yağ(lar) ve surfektan(lar), biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyouyumludur. Emülsiyondaki yağ damlacıklarının çapı genelde 5 µm'den kısadır ve hatta çapı, mikron altı bile olabilir; bu küçük ebatlara, stabil emülsiyonlar sağlamak için bir mikro-akışkanlaştırıcı

serisi). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan'da daha detaylı tartışılmaktadır.

Kompozisyonlar, iki, üç, dört veya daha fazla adjuvan içerebilir. Örneğin buluşa ait kompozisyonlar avantajlı bir şekilde hem bir su içinde yağ emülsiyonu hem de bir sitokin indükleyici ajan veya hem bir mineral içerikli kompozisyon hem de bir sitokin indükleyici ajan veya iki adet su içinde yağ emülsiyonu adjuvanı veya iki adet benzonaftiridin bileşiği, vb. içerebilir.

Bir kompozisyon içerisinde yer alan antijenler ve adjuvanlar tipik olarak karışım halinde olacaktır.

Yağ emülsiyonu adjuvanları

Buluşta adjuvanlar olarak kullanıma uygun yağ emülsiyonu kompozisyonları arasında skualen-su emülsiyonları, örn., MF59 (bir mikro-akışkanlaştırıcı kullanılarak mikron altı partiküller halinde formüle edilen, %5, Skualen, %0,5 Tween 80 ve %0,5 Span 85) bulunur. Tam Freund adjuvanı (CFA) ve tam olmayan Freund adjuvanı (IFA) da kullanılabilir.

Çeşitli su içinde yağ emülsiyonları bilinmektedir, ve bunlar tipik olarak en az bir adet yağ ve en az bir adet surfektan içerir ve bu yağ(lar) ve surfektan(lar), biyo-bozunur (metabolize edilebilir) ve biyouyumludur. Emülsiyondaki yağ damlacıklarının çapı genelde 5 µm'den kısadır ve hatta çapı, mikron altı bile olabilir; bu küçük ebatlara, stabil emülsiyonlar sağlamak için bir mikro-akışkanlaştırıcı

ile ulaşılır. Ebadı 220 nm'nin altında olan damlacıklar tercih edilir, çünkü bunlar, filtreli sterilizasyona tabi tutulabilir.

Buluş, bir hayvan (balık gibi) veya sebze kaynağından olanlar gibi yağlarla birlikte kullanılabilir. Bitkisel yağ kaynakları arasında kabuklu yemişler, tohumlar ve tahıllar bulunur. Yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, hindistancevizi yağı ve en yaygın olarak bulunan zeytinyağı, kabuklu yemiş yağlarının örnekleridir. Örn., jojoba tanesinden elde edilen jojoba yağı kullanılabilir. Tohum yağları arasında yalancı safran yağı, pamuk tohumu yağı, ayçiçeği tohumu yağı, susam tohumu yağı ve benzerleri yer alır. Tahıl grubunda mısır yağı en kolay bulunanıdır ancak buğday, yulaf, çavdar, pirinç, tef, tritikale ve benzerleri gibi diğer tahıl tanelerinin yağı da kullanılabilir. Gliserol ve 1,2-propandiolün 6-10 karbonlı yağlı asit esterleri, tohum yağlarında doğal yollarla meydana gelmezken sert kabuklu yemiş ve tohum yağlarından başlayarak uygun materyallerin hidrolizi, ayrılması ve esterlenmesi yoluyla hazırlanabilir. Memelilerin sütünden katı ve sıvı yağlar metabolize edilebilir ve bu nedenle bu buluşun uygulanmasında kullanılabilir. Ayırma, saflaştırma, sabunlaştırma prosedürleri ve hayvansal kaynaklardan saf yağlar elde etmek için gereken diğer yöntemler, bu konuda iyi bilinir. Çoğu balıkta, kolaylıkla geri kazanılabilen metabolize edilebilir yağlar bulunur. Örneğin, morina balığı yağı, köpek balığı yağları ve ispermeçet gibi balina yağı, burada kullanılabilecek balık yağlarının birkaçına örnektir. Birçok dallı zincirli yağ, 5-karbon izopren birimleri halinde biyokimyasal olarak sentezlenir ve genellikle terpenoitler olarak anılır. Köpekbalığı karaciğeri yağı, skualen, 2,6,10,15,19,23-heksametil-2,6,10,14,18-22-tetrakosaheksan olarak bilinen ki bu, burada özellikle tercih edilir, dallı, doymamış bir terpenoid ihtiva eder. Skualenin

ile ulaşılır. Ebadı 220 nm'nin altında olan damlacıklar tercih edilir, çünkü bunlar, filtreli sterilizasyona tabi tutulabilir.

Buluş, bir hayvan (balık gibi) veya sebze kaynağından olanlar gibi yağlarla birlikte kullanılabilir. Bitkisel yağ kaynakları arasında kabuklu yemişler, tohumlar ve tahıllar bulunur. Yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, hindistancevizi yağı ve en yaygın olarak bulunan zeytinyağı, kabuklu yemiş yağlarının örnekleridir. Örn., jojoba tanesinden elde edilen jojoba yağı kullanılabilir. Tohum yağları arasında yalancı safran yağı, pamuk tohumu yağı, ayçiçeği tohumu yağı, susam tohumu yağı ve benzerleri yer alır. Tahıl grubunda mısır yağı en kolay bulunanıdır ancak buğday, yulaf, çavdar, pirinç, tef, tritikale ve benzerleri gibi diğer tahıl tanelerinin yağı da kullanılabilir. Gliserol ve 1,2-propandiolün 6-10 karbonlı yağlı asit esterleri, tohum yağlarında doğal yollarla meydana gelmezken sert kabuklu yemiş ve tohum yağlarından başlayarak uygun materyallerin hidrolizi, ayrılması ve esterlenmesi yoluyla hazırlanabilir. Memelilerin sütünden katı ve sıvı yağlar metabolize edilebilir ve bu nedenle bu buluşun uygulanmasında kullanılabilir. Ayırma, saflaştırma, sabunlaştırma prosedürleri ve hayvansal kaynaklardan saf yağlar elde etmek için gereken diğer yöntemler, bu konuda iyi bilinir. Çoğu balıkta, kolaylıkla geri kazanılabilen metabolize edilebilir yağlar bulunur. Örneğin, morina balığı yağı, köpek balığı yağları ve ispermeçet gibi balina yağı, burada kullanılabilecek balık yağlarının birkaçına örnektir. Birçok dallı zincirli yağ, 5-karbon izopren birimleri halinde biyokimyasal olarak sentezlenir ve genellikle terpenoitler olarak anılır. Köpekbalığı karaciğeri yağı, skualen, 2,6,10,15,19,23-heksametil-2,6,10,14,18-22-tetrakosaheksan olarak bilinen ki bu, burada özellikle tercih edilir, dallı, doymamış bir terpenoid ihtiva eder. Skualenin

doymuş analogu olan skualan da tercih edilen yağdır. Skualen ve skualan da dahil olmak üzere balık yağları, ticari kaynaklardan kolayca temin edilebilir veya bu konuda bilinen yöntemlerle elde edilebilir. Tercih edilen diğer yağlar, tokoferollerdir (aşağıya bakınız). Yağların karışımları kullanılabilir.

Surfektanlar, 'HLB'lerine (hidrofil/lipofil dengesi) göre sınıflandırılabilir. Buluşa ait tercih edilen surfektanların HLB'si, en az 10, tercihen en az 15 ve daha tercihen en az 16'dır. Buluş, bunlarla sınırlı olmaksızın aşağıdakiler gibi surfektanlar ile kullanılabilir: polioksietilen sorbitan ester surfektanları (genellikle Tweenler olarak anılır), özellikle polisorbat 20 ve polisorbat 80; DOWFAX(TM) ticari adı altında satılan, etilen oksit (EO), propilen oksit (PO) ve/veya butilen oksit (BO) kopolimerleri, örn., lineer EO/PO blok kopolimerleri; oktoksinol-9 (Triton X-100 veya t-oktilfenoksipolietoksietanol) özel ilgi konusu olmak üzere, tekrar eden etoksi (oksi-1,2-etandiil) grubu sayısı değişebilen oktoksinoller; (oktilfenoksi)polietoksietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfatidilkolin (lesitin) gibi fosfolipidler; TERGITOL(TM) NP serisi gibi nonilfenol etoksilatlar; lauril, setil, stearil ve oleil alkollerden türetilen polioksietilen yağlı eterler (Brij surfektanları olarak bilinir), örn., trietilenglikol monolauril eter (Brij 30) ve sorbitan esterler (genellikle SPANlar olarak bilinir), örn., sorbitan trioleat (Span 85) ve sorbitan monolaurat. İyonik olmayan surfektanlar tercih edilir. Emülsiyona dahil edilmesi tercih edilen surfektanlar, Tween 80(TM) (polioksietilen sorbitan monooleat), Span 85 (sorbitan trioleat), lesitin e Triton X-100'dür.

doymuş analogu olan skualan da tercih edilen yağdır. Skualen ve skualan da dahil olmak üzere balık yağları, ticari kaynaklardan kolayca temin edilebilir veya bu konuda bilinen yöntemlerle elde edilebilir. Tercih edilen diğer yağlar, tokoferollerdir (aşağıya bakınız). Yağların karışımları kullanılabilir.

Surfektanlar, 'HLB'lerine (hidrofil/lipofil dengesi) göre sınıflandırılabilir. Buluşa ait tercih edilen surfektanların HLB'si, en az 10, tercihen en az 15 ve daha tercihen en az 16'dır. Buluş, bunlarla sınırlı olmaksızın aşağıdakiler gibi surfektanlar ile kullanılabilir: polioksietilen sorbitan ester surfektanları (genellikle Tweenler olarak anılır), özellikle polisorbat 20 ve polisorbat 80; DOWFAX(TM) ticari adı altında satılan, etilen oksit (EO), propilen oksit (PO) ve/veya butilen oksit (BO) kopolimerleri, örn., lineer EO/PO blok kopolimerleri; oktoksinol-9 (Triton X-100 veya t-oktilfenoksipolietoksietanol) özel ilgi konusu olmak üzere, tekrar eden etoksi (oksi-1,2-etandiil) grubu sayısı değişebilen oktoksinoller; (oktilfenoksi)polietoksietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfatidilkolin (lesitin) gibi fosfolipidler; TERGITOL(TM) NP serisi gibi nonilfenol etoksilatlar; lauril, setil, stearil ve oleil alkollerden türetilen polioksietilen yağlı eterler (Brij surfektanları olarak bilinir), örn., trietilenglikol monolauril eter (Brij 30) ve sorbitan esterler (genellikle SPANlar olarak bilinir), örn., sorbitan trioleat (Span 85) ve sorbitan monolaurat. İyonik olmayan surfektanlar tercih edilir. Emülsiyona dahil edilmesi tercih edilen surfektanlar, Tween 80(TM) (polioksietilen sorbitan monooleat), Span 85 (sorbitan trioleat), lesitin e Triton X-100'dür.

Surfektan karışımları, örn., TWEEN 80 (TM)/Span 85 karışımları kullanılabilir. Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80(TM)) gibi bir polioksietilen sorbitan ester ile t-oktilfenoksipolietoksietanol (Triton X-100) gibi bir oktoksinolün bir kombinasyonu da uygundur. Bir başka faydalı kombinasyon, lauret 9 artı bir polioksietilen sorbitan ester ve/veya bir oktoksinol içerir.

Tercih edilen surfektan miktarları (ağırlığa göre %) şöyledir: polioksietilen sorbitan esterler (örn., TWEEN 80(TM)), %0,01 ila 1, özellikle yaklaşık %0,1; oktil- veya nonilfenoksi polioksietanoller (örn., Triton X-100 ya da Triton serisindeki diğer deterjanlar), %0,001 ila 0,1, özellikle %0,005 ila 0,02; polioksietilen eterler (örn., lauret 9), %0,1 ila 20, tercihen %0,1 ila 10 ve özellikle %0,1 ila 1 veya yaklaşık %0,5.

Buluşla faydalı spesifik su içinde yağ emülsiyonu adjuvanları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır: Skualen, Tween 80(TM) ve Span 85 içeren bir mikron altı emülsiyon. Emülsiyonun hacme göre kompozisyonu, yaklaşık %5 skualen, yaklaşık %0,5 polisorbat 80 ve yaklaşık %0,5 Span 85 olabilir. Ağırlık bakımından bu oranlar, %4.3 skualen, %0.5 polisorbat 80 ve %0.48 Span 85 olur. Bu adjuvan, 'MF59' olarak bilinir (WO90/14837; Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203; Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680), Bölüm 10, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) ve bölüm 12, Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan'da daha detaylı

Surfektan karışımları, örn., TWEEN 80 (TM)/Span 85 karışımları kullanılabilir. Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80(TM)) gibi bir polioksietilen sorbitan ester ile t-oktilfenoksipolietoksietanol (Triton X-100) gibi bir oktoksinolün bir kombinasyonu da uygundur. Bir başka faydalı kombinasyon, lauret 9 artı bir polioksietilen sorbitan ester ve/veya bir oktoksinol içerir.

Tercih edilen surfektan miktarları (ağırlığa göre %) şöyledir: polioksietilen sorbitan esterler (örn., TWEEN 80(TM)), %0,01 ila 1, özellikle yaklaşık %0,1; oktil- veya nonilfenoksi polioksietanoller (örn., Triton X-100 ya da Triton serisindeki diğer deterjanlar), %0,001 ila 0,1, özellikle %0,005 ila 0,02; polioksietilen eterler (örn., lauret 9), %0,1 ila 20, tercihen %0,1 ila 10 ve özellikle %0,1 ila 1 veya yaklaşık %0,5.

Buluşla faydalı spesifik su içinde yağ emülsiyonu adjuvanları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır: Skualen, Tween 80(TM) ve Span 85 içeren bir mikron altı emülsiyon. Emülsiyonun hacme göre kompozisyonu, yaklaşık %5 skualen, yaklaşık %0,5 polisorbat 80 ve yaklaşık %0,5 Span 85 olabilir. Ağırlık bakımından bu oranlar, %4.3 skualen, %0.5 polisorbat 80 ve %0.48 Span 85 olur. Bu adjuvan, 'MF59' olarak bilinir (WO90/14837; Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203; Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680), Bölüm 10, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) ve bölüm 12, Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan'da daha detaylı

tarif edilmektedir. MF59 emülsiyonu avantajlı şekilde sitrat iyonları, örn., 10 mM sodyum sitrat tamponunu içerir.

- Skualen, bir tokoferol ve TWEEN 80(TM) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, fosfat tamponlu tuz içerebilir. Ayrıca Span 85 (örn., %1) ve/veya lesitin de içerebilir. Bu emülsiyonlar, %2 ila 10 arası skualen, %2 ila 10 arası tokoferol ve %0,3 ila 3 TWEEN 80(TM) içerebilir ve skualen:tokoferol ağırlık oranı tercihen < 1'dir çünkü bu, daha stabil bir emülsiyon sağlar. Skualen ve TWEEN 80(TM), yaklaşık 5:2'lik hacim oranında mevcut olabilir. Bu tür bir emülsiyon, TWEEN 80(TM)'nin PBS içerisinde çözündürülmesiyle %2'lik bir çözelti elde edilmesi, daha sonra bu çözeltiden 90 mL'nin (5 g DL-α-tokoferol ve 5 mL skualen) içeren bir karışım ile karıştırılması ve sonra karışımın mikroakışkanlaştırılması yoluyla yapılabilir. Sonuçta elde edilen emülsiyonda, örn., ortalama çapı 100 ile 250 nm arasında, tercihen yaklaşık 180nm olan mikron altı yağ damlacıları bulunabilir.
- Skualen, bir tokoferol ve bir Triton deterjanı (örn.Triton X-100) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon ayrıca bir 3d-MPL (aşağıda bakınız) de içerebilir. Emülsiyon, bir fosfat tamponu ihtiva edebilir.
- Bir polisorbat (örn., polisorbat 80), bir Triton deterjanı (örn., Triton X-100) ve bir tokoferol (örn., bir α-tokoferol sukinat) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, bu üç bileşeni yaklaşık 75:11:10 kütle oranında (örn. 750 µg/ml polisorbat 80, 110 µg/ml Triton X-100 ve 100 µg/ml α-tokoferol sukinat) içerebilir ve bu konsantrasyonlar, bu bileşenlerin antijenlerden herhangi bir katkısını içermelidir. Emülsiyon bir skualen de içerebilir. Emülsiyon ayrıca bir 3d-MPL (aşağıda bakınız) de içerebilir. Sulu faz, bir fosfat tamponu ihtiva edebilir.

tarif edilmektedir. MF59 emülsiyonu avantajlı şekilde sitrat iyonları, örn., 10 mM sodyum sitrat tamponunu içerir.

- Skualen, bir tokoferol ve TWEEN 80(TM) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, fosfat tamponlu tuz içerebilir. Ayrıca Span 85 (örn., %1) ve/veya lesitin de içerebilir. Bu emülsiyonlar, %2 ila 10 arası skualen, %2 ila 10 arası tokoferol ve %0,3 ila 3 TWEEN 80(TM) içerebilir ve skualen:tokoferol ağırlık oranı tercihen < 1'dir çünkü bu, daha stabil bir emülsiyon sağlar. Skualen ve TWEEN 80(TM), yaklaşık 5:2'lik hacim oranında mevcut olabilir. Bu tür bir emülsiyon, TWEEN 80(TM)'nin PBS içerisinde çözündürülmesiyle %2'lik bir çözelti elde edilmesi, daha sonra bu çözeltiden 90 mL'nin (5 g DL-α-tokoferol ve 5 mL skualen) içeren bir karışım ile karıştırılması ve sonra karışımın mikroakışkanlaştırılması yoluyla yapılabilir. Sonuçta elde edilen emülsiyonda, örn., ortalama çapı 100 ile 250 nm arasında, tercihen yaklaşık 180nm olan mikron altı yağ damlacıları bulunabilir.
- Skualen, bir tokoferol ve bir Triton deterjanı (örn.Triton X-100) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon ayrıca bir 3d-MPL (aşağıda bakınız) de içerebilir. Emülsiyon, bir fosfat tamponu ihtiva edebilir.
- Bir polisorbat (örn., polisorbat 80), bir Triton deterjanı (örn., Triton X-100) ve bir tokoferol (örn., bir α-tokoferol sukinat) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, bu üç bileşeni yaklaşık 75:11:10 kütle oranında (örn. 750 µg/ml polisorbat 80, 110 µg/ml Triton X-100 ve 100 µg/ml α-tokoferol sukinat) içerebilir ve bu konsantrasyonlar, bu bileşenlerin antijenlerden herhangi bir katkısını içermelidir. Emülsiyon bir skualen de içerebilir. Emülsiyon ayrıca bir 3d-MPL (aşağıda bakınız) de içerebilir. Sulu faz, bir fosfat tamponu ihtiva edebilir.

- Skualan, polisorbat 80 ve poloksamer 401 (“PLURONIC(TM) L121”) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, fosfat tamponlu tuz, pH 7,4 halinde formüle edilebilir. Bu emülsiyon, muramil dipeptitler için faydalı bir verme aracıdır ve "SAF-1" adjuvanı içerisinde treonil-MDP ile birlikte kullanılmıştır (Allison ve Byars (1992) Res Immunol 143:519-25) (%0.05-1 Thr-MDP, %5 skualan, %2.5 Pluronic L121 ve% 0.2 polisorbat 80). Bu ayrıca "AF" adjuvanında olduğu gibi Thr-MDP olmadan da kullanılabilir (Hariharan ve arkadaşları (1995) Cancer Res 55:3486-9) (%5 skualan, %1.25 Pluronic L121 ve %0.2 polisorbat 80). Mikro-akışkanlaştırma tercih edilir.
- Skualen, bir sulu solvent, bir polioksietilen alkil eter hidrofilik iyonik olmayan surfektan (örn., polioksietilen (12) setostearil eter) ve bir hidrofobik iyonik olmayan surfektan (örn., sorbitan monoleat veya 'Span 80' gibi bir sorbitan ester veya mannid ester) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon tercihen ısıltersinirdir ve/veya yağ damlacıklarının en azından %90’ının ebadı (hacme göre), 200 nm’nin altındadır. Emülsiyon ayrıca şunlardan birini veya daha fazlasını da içerebilir: alditol, bir kriyo-koruyucu ajan (örn., bir şeker, örn., dodesilmaltosid ve/veya sukroz) ve/veya alkilpoliglikosid. Bu tür emülsiyonlar liyofilize edilmiş olabilir.
- %0,5-50 oranında bir yağ, %0,1-10 oranında bir fosfolipid ve %0,05-5 oranında bir iyonik olmayan surfektan içeren bir emülsiyon. WO95/11700 referansında tarif edildiği gibi tercih edilen fosfolipit bileşenleri, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, fosfatidik asit, sfingomiyelin ve kardiyolipindir. Mikron altı damlacık büyüklükleri avantajlıdır.
- Bir metabolize edilebilir olmayan yağ (örn., hafif mineral yağ) ve en az bir adet surfektan (örn., lesitin, TWEEN 80(TM) veya Span 80)

- Skualan, polisorbat 80 ve poloksamer 401 (“PLURONIC(TM) L121”) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon, fosfat tamponlu tuz, pH 7,4 halinde formüle edilebilir. Bu emülsiyon, muramil dipeptitler için faydalı bir verme aracıdır ve "SAF-1" adjuvanı içerisinde treonil-MDP ile birlikte kullanılmıştır (Allison ve Byars (1992) Res Immunol 143:519-25) (%0.05-1 Thr-MDP, %5 skualan, %2.5 Pluronic L121 ve% 0.2 polisorbat 80). Bu ayrıca "AF" adjuvanında olduğu gibi Thr-MDP olmadan da kullanılabilir (Hariharan ve arkadaşları (1995) Cancer Res 55:3486-9) (%5 skualan, %1.25 Pluronic L121 ve %0.2 polisorbat 80). Mikro-akışkanlaştırma tercih edilir.
- Skualen, bir sulu solvent, bir polioksietilen alkil eter hidrofilik iyonik olmayan surfektan (örn., polioksietilen (12) setostearil eter) ve bir hidrofobik iyonik olmayan surfektan (örn., sorbitan monoleat veya 'Span 80' gibi bir sorbitan ester veya mannid ester) içeren bir emülsiyon. Emülsiyon tercihen ısıltersinirdir ve/veya yağ damlacıklarının en azından %90’ının ebadı (hacme göre), 200 nm’nin altındadır. Emülsiyon ayrıca şunlardan birini veya daha fazlasını da içerebilir: alditol, bir kriyo-koruyucu ajan (örn., bir şeker, örn., dodesilmaltosid ve/veya sukroz) ve/veya alkilpoliglikosid. Bu tür emülsiyonlar liyofilize edilmiş olabilir.
- %0,5-50 oranında bir yağ, %0,1-10 oranında bir fosfolipid ve %0,05-5 oranında bir iyonik olmayan surfektan içeren bir emülsiyon. WO95/11700 referansında tarif edildiği gibi tercih edilen fosfolipit bileşenleri, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, fosfatidik asit, sfingomiyelin ve kardiyolipindir. Mikron altı damlacık büyüklükleri avantajlıdır.
- Bir metabolize edilebilir olmayan yağ (örn., hafif mineral yağ) ve en az bir adet surfektan (örn., lesitin, TWEEN 80(TM) veya Span 80)

içeren bir mikron altı su içinde yağ emülsiyonu. QuilA saponin, kolesterol, bir saponin-lipofil konjugatı (örn., GPI-0100, ABD Patenti No.6,080,725'te tarif edilmiştir, alifatik aminin desasilsaponine, glukuronik asidin karboksil grubu vasıtasıyla ilave edilmesi suretiyle üretilmiştir), dimetildioktadesilamonyum bromür ve/veya N,N-dioktadesil-N,N-bis (2-hidroksietil)propandiamin gibi katkı maddeleri dahil edilebilir.

- Bir mineral yağı, bir iyonik olmayan lipofilik etoksile edilmiş yağlı alkol ve bir iyonik olmayan hidrofilik surfektan (örn., bir etoksile edilmiş yağlı alkol ve/veya polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri) içeren bir emülsiyon.
- Bir mineral yağı, bir iyonik olmayan hidrofilik etoksile edilmiş yağlı alkol ve bir iyonik olmayan lipofilik surfektan (örn., bir etoksile edilmiş yağlı alkol ve/veya polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri) içeren bir emülsiyon.
- Bir saponin (*örn.,* QuilA veya QS21) ve bir sterolün (*örn.,* bir kolesterol) helis miseller şeklinde birleştirildiği bir emülsiyon (WO2005/097181).

Emülsiyonlar, verme sırasında antijen ile irticalen karıştırılabilir. Böylece adjuvan ve antijen, kullanım sırasında nihai formülasyon için hazır ambalajlanmış veya dağıtımı yapılan bir aşı içinde ayrı ayrı tutulabilir. Antijen genellikle bir sulu formda olacaktır, böylelikle aşı,son olarak iki sıvının karıştırılmasıyla hazırlanır. Karıştırılacak iki sıvının hacim oranı değişkenlik gösterebilir (örn., 5:1 ile 1:5 arasında) ancak genellikle yaklaşık 1:1'dir.

içeren bir mikron altı su içinde yağ emülsiyonu. QuilA saponin, kolesterol, bir saponin-lipofil konjugatı (örn., GPI-0100, ABD Patenti No.6,080,725'te tarif edilmiştir, alifatik aminin desasilsaponine, glukuronik asidin karboksil grubu vasıtasıyla ilave edilmesi suretiyle üretilmiştir), dimetildioktadesilamonyum bromür ve/veya N,N-dioktadesil-N,N-bis (2-hidroksietil)propandiamin gibi katkı maddeleri dahil edilebilir.

- Bir mineral yağı, bir iyonik olmayan lipofilik etoksile edilmiş yağlı alkol ve bir iyonik olmayan hidrofilik surfektan (örn., bir etoksile edilmiş yağlı alkol ve/veya polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri) içeren bir emülsiyon.
- Bir mineral yağı, bir iyonik olmayan hidrofilik etoksile edilmiş yağlı alkol ve bir iyonik olmayan lipofilik surfektan (örn., bir etoksile edilmiş yağlı alkol ve/veya polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri) içeren bir emülsiyon.
- Bir saponin (*örn.,* QuilA veya QS21) ve bir sterolün (*örn.,* bir kolesterol) helis miseller şeklinde birleştirildiği bir emülsiyon (WO2005/097181).

Emülsiyonlar, verme sırasında antijen ile irticalen karıştırılabilir. Böylece adjuvan ve antijen, kullanım sırasında nihai formülasyon için hazır ambalajlanmış veya dağıtımı yapılan bir aşı içinde ayrı ayrı tutulabilir. Antijen genellikle bir sulu formda olacaktır, böylelikle aşı,son olarak iki sıvının karıştırılmasıyla hazırlanır. Karıştırılacak iki sıvının hacim oranı değişkenlik gösterebilir (örn., 5:1 ile 1:5 arasında) ancak genellikle yaklaşık 1:1'dir.

Sitokin indükleyici ajanlar

Buluşa ait kompozisyonlar içerisine dahil edilme amaçlı sitokin indükleyici ajanlar, bir hastaya uygulandığı durumda, immün sistemin, interferonlar ve interlökinler dahil olmak üzere sitokin salmasını sağlayabilir. Tercih edilen ajanlar, şunlardan birinin veya daha fazlasının salınmasını sağlayabilir: interferon-γ; interlökin-1; interlökin-2; interlökin-12; TNF-α; TNF-β ve GM-CSF. Tercih edilen ajanlar, bir Th1 tipi immün yanıtla ilişkili sitokinlerin, örn., interferon-γ, TNF-α, interlökin-2'nin salınmasını sağlar. Hem interferon-γ hem de interlökin-2'nin her ikisinin de uyarılması tercih edilir.

Böylelikle buluşa ait bir kompozisyonu alması sonucu bir hastada, bir RSV F proteini ile uyarıldığı durumda, arzu edilen sitokin(ler)i antijene özel bir şekilde salacak T hücreleri olacaktır. Örneğin kanlarından saflaştırılan T hücreleri, *in vitro* F proteinine maruz bırakıldığı durumda γ-interferon salacaktır. Periferal kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) bu tür tepkileri ölçme yöntemleri, bu konuda bilinir ve bunlar arasında, ELISA, ELISPOT, akış sitometrisi ve gerçek zamanlı PCR bulunur. Örneğin Tassignon ve arkadaşları (2005) J Immunol Meth 305:188-98'de, tetanos toksoidine karşı antijene özel T hücresi aracılığında immün yanıtların, spesifik olarak γ-interferon yanıtlarının izlendiği ve ELISPOT'un, antijene özel TT'nin indüklediği yanıtların spontan yanıtlardan ayrılmasında en hassas yöntem olduğunun ancak akış sitometrisiyle intrasitoplazmik sitokin saptamasının, yeniden uyarıcı etkilerin saptanmasında en verimli yöntem olduğunun bulunduğu bir çalışmayı bildirir.

Sitokin indükleyici ajanlar

Buluşa ait kompozisyonlar içerisine dahil edilme amaçlı sitokin indükleyici ajanlar, bir hastaya uygulandığı durumda, immün sistemin, interferonlar ve interlökinler dahil olmak üzere sitokin salmasını sağlayabilir. Tercih edilen ajanlar, şunlardan birinin veya daha fazlasının salınmasını sağlayabilir: interferon-γ; interlökin-1; interlökin-2; interlökin-12; TNF-α; TNF-β ve GM-CSF. Tercih edilen ajanlar, bir Th1 tipi immün yanıtla ilişkili sitokinlerin, örn., interferon-γ, TNF-α, interlökin-2'nin salınmasını sağlar. Hem interferon-γ hem de interlökin-2'nin her ikisinin de uyarılması tercih edilir.

Böylelikle buluşa ait bir kompozisyonu alması sonucu bir hastada, bir RSV F proteini ile uyarıldığı durumda, arzu edilen sitokin(ler)i antijene özel bir şekilde salacak T hücreleri olacaktır. Örneğin kanlarından saflaştırılan T hücreleri, *in vitro* F proteinine maruz bırakıldığı durumda γ-interferon salacaktır. Periferal kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) bu tür tepkileri ölçme yöntemleri, bu konuda bilinir ve bunlar arasında, ELISA, ELISPOT, akış sitometrisi ve gerçek zamanlı PCR bulunur. Örneğin Tassignon ve arkadaşları (2005) J Immunol Meth 305:188-98'de, tetanos toksoidine karşı antijene özel T hücresi aracılığında immün yanıtların, spesifik olarak γ-interferon yanıtlarının izlendiği ve ELISPOT'un, antijene özel TT'nin indüklediği yanıtların spontan yanıtlardan ayrılmasında en hassas yöntem olduğunun ancak akış sitometrisiyle intrasitoplazmik sitokin saptamasının, yeniden uyarıcı etkilerin saptanmasında en verimli yöntem olduğunun bulunduğu bir çalışmayı bildirir.

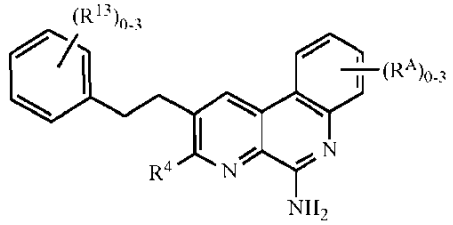
Uygun sitokin indükleyici ajanlar arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır:

- Bir immünouyarıcı oligonükleotit, örn., bir Cpg motifi ihtiva eden biri (bir fosfat bağıyla bir guanosine bağlanmış metile edilmemiş bir sitosin ihtiva eden bir dinükleotit sekansı) veya bir çift iplikçikli RNA veya bir palindromik sekans ihtiva eden bir oligonükleotit veya bir poli(dG) sekansı ihtiva eden bir oligonükleotit.
- 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A ('3dMPL', 'MPL (TM)' olarak da bilinir) (Myers ve arkadaşları (1990) sayfa 145-156, Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Bölüm 16 (sayfa 273-282), Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson ve arkadaşları (1999) J Med Chem 42:4640-9; Baldrick ve arkadaşları (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413).
- Bir imidazokinolin bileşiği, örn., IMIQUIMOD (TM) ("R-837") (ABD Patenti No. 4,680,338, ABD Patenti No. 4,988,815), RESIQUIMOD (TM) ("R-848") (WO92/15582) ve bunların analogları ve bunların tuzları (*örn.*, hidroklorür tuzları). İmmünouyarıcı imidazokino çizgileri ile ilgili diğer detaylar, Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:57 1-577; Wu ve arkadaşları (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83; Vasilakos ve arkadaşları (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74; ABD Patentleri No. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 ve 6924293; ve Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218'de bulunabilir.

Uygun sitokin indükleyici ajanlar arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, aşağıdakiler yer alır:

- Bir immünouyarıcı oligonükleotit, örn., bir Cpg motifi ihtiva eden biri (bir fosfat bağıyla bir guanosine bağlanmış metile edilmemiş bir sitosin ihtiva eden bir dinükleotit sekansı) veya bir çift iplikçikli RNA veya bir palindromik sekans ihtiva eden bir oligonükleotit veya bir poli(dG) sekansı ihtiva eden bir oligonükleotit.
- 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A ('3dMPL', 'MPL (TM)' olarak da bilinir) (Myers ve arkadaşları (1990) sayfa 145-156, Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Bölüm 16 (sayfa 273-282), Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson ve arkadaşları (1999) J Med Chem 42:4640-9; Baldrick ve arkadaşları (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413).
- Bir imidazokinolin bileşiği, örn., IMIQUIMOD (TM) ("R-837") (ABD Patenti No. 4,680,338, ABD Patenti No. 4,988,815), RESIQUIMOD (TM) ("R-848") (WO92/15582) ve bunların analogları ve bunların tuzları (*örn.*, hidroklorür tuzları). İmmünouyarıcı imidazokino çizgileri ile ilgili diğer detaylar, Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:57 1-577; Wu ve arkadaşları (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83; Vasilakos ve arkadaşları (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74; ABD Patentleri No. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 ve 6924293; ve Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218'de bulunabilir.

- Bir benzonaftiridin bileşiği, örn.: (a) şu formüle sahip bir bileşik:



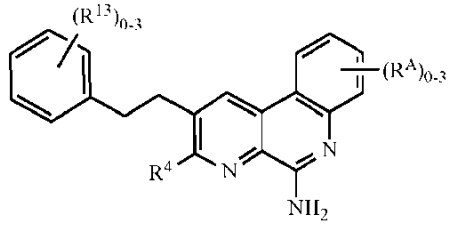
burada:

R^4, H, halojen, -C(O)OR^7, -C(O)R^7, -C(O)N($R^{11}R^{12}$), -N($R^{11}R^{12}$), -N(R^9)$_2$, -NHN(R^9)$_2$, -SR^7, -(CH_2)$_n$OR^7, -(CH_2)$_n$R^7, -LR^8, -LR^{10}, -OLR^8, -OLR^{10}, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^4'ün C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak halojen, -CN, -NO_2, -R^7, -OR^8, -C(O)R^8, -OC(O)R^8, -C(O)OR^8, -N(R^9)$_2$, -P(O)(OR^8)$_2$, -OP(O)(OR^8)$_2$, -P(O)(OR^{10})$_2$, -OP(O)(OR^{10})$_2$, -C(O)N(R^9)$_2$, -S(O)$_2$R^8, -S(O)R^8, -S(O)$_2$N(R^9)$_2$ ve -NR^{9}S(O)$_2$R^8 arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir L, birbirinden bağımsız olarak, bir bağ, -(O(CH_2)$_m$)$_t$-, C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilen arasından seçilir, burada L'ye ait C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilenden her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, -N(R^9)$_2$, -P(O)(OR^8)$_2$, -OP(O)(OR^8)$_2$, -P(O)(OR^{10})$_2$ ve -OP(O)(OR^{10})$_2$ arasından seçilen 1 ila 4 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^7, H, C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada

- Bir benzonaftiridin bileşiği, örn.: (a) şu formüle sahip bir bileşik:



burada:

R^4, H, halojen, -C(O)OR^7, -C(O)R^7, -C(O)N($R^{11}R^{12}$), -N($R^{11}R^{12}$), -N(R^9)$_2$, -NHN(R^9)$_2$, -SR^7, -(CH_2)$_n$OR^7, -(CH_2)$_n$R^7, -LR^8, -LR^{10}, -OLR^8, -OLR^{10}, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^4'ün C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak halojen, -CN, -NO_2, -R^7, -OR^8, -C(O)R^8, -OC(O)R^8, -C(O)OR^8, -N(R^9)$_2$, -P(O)(OR^8)$_2$, -OP(O)(OR^8)$_2$, -P(O)(OR^{10})$_2$, -OP(O)(OR^{10})$_2$, -C(O)N(R^9)$_2$, -S(O)$_2$R^8, -S(O)R^8, -S(O)$_2$N(R^9)$_2$ ve -NR^{9}S(O)$_2$R^8 arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir L, birbirinden bağımsız olarak, bir bağ, -(O(CH_2)$_m$)$_t$-, C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilen arasından seçilir, burada L'ye ait C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilenden her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, -N(R^9)$_2$, -P(O)(OR^8)$_2$, -OP(O)(OR^8)$_2$, -P(O)(OR^{10})$_2$ ve -OP(O)(OR^{10})$_2$ arasından seçilen 1 ila 4 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^7, H, C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada

R^7'nin C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, 1 ila 3 R^{13} grubu ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^8, birbirinden bağımsız olarak, H, -$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6heteroalkil, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilir, burada R^8'in C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^9C(O)R^{11}$, -NR^9R^{10}, -$NR^{11}R^{12}$, -$N(R^9)_2$, - OR^9, -OR^{10}, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, H, -$C(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$C(O)R^{10}$, -$C(O)OR^{10}$, -$S(O)_2R^{10}$, -C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil ve C_3-C_6 sikloalkil arasından seçilir veya her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, eklendiği N ile birlikte bir C_3-C_8heterosikloalkil oluşturan bir C_1-C_6alkildir, burada C_3-C_8heterosikloalkil halkası isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eder ve burada R^9 'un C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil, C_3-C_6 sikloalkil veya C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^7'nin C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, 1 ila 3 R^{13} grubu ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^8, birbirinden bağımsız olarak, H, -$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6heteroalkil, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilir, burada R^8'in C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^9C(O)R^{11}$, -NR^9R^{10}, -$NR^{11}R^{12}$, -$N(R^9)_2$, - OR^9, -OR^{10}, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, H, -$C(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$C(O)R^{10}$, -$C(O)OR^{10}$, -$S(O)_2R^{10}$, -C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil ve C_3-C_6 sikloalkil arasından seçilir veya her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, eklendiği N ile birlikte bir C_3-C_8heterosikloalkil oluşturan bir C_1-C_6alkildir, burada C_3-C_8heterosikloalkil halkası isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eder ve burada R^9 'un C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil, C_3-C_6 sikloalkil veya C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^{10}, birbirinden bağımsız olarak, aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril arasından seçilir, burada aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril grupları, halojen, -R^8, -OR^8, -LR^9, -LOR^9, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9CO_2R^8$, -CO_2R^8, -$C(O)R^8$ ve -$C(O)N(R^9)_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^{11} ve R^{12}, birbirinden bağımsız olarak, H, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^{11} ve R^{12}'nin C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, R^8, -OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$NR^8C(O)R^8$, -$NR^8C(O)OR^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterosikloalkil, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)_2N(R^9)_2$, -$NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

veya R^{11} ve R^{12}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, C_1-C_6alkildir ve eklendiği N atomu ile birlikte alındığında, isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eden bir isteğe bağlı olarak ikame edilmiş C_3-C_8heterosikloalkil halkası oluşturur;

her bir R^{13}, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, -$LS(O)_2R^8$, -$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, -$LS(O)_2N(R^9)_2$, - $OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -

her bir R^{10}, birbirinden bağımsız olarak, aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril arasından seçilir, burada aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril grupları, halojen, -R^8, -OR^8, -LR^9, -LOR^9, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9CO_2R^8$, -CO_2R^8, -$C(O)R^8$ ve -$C(O)N(R^9)_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^{11} ve R^{12}, birbirinden bağımsız olarak, H, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^{11} ve R^{12}'nin C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, R^8, -OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$NR^8C(O)R^8$, -$NR^8C(O)OR^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterosikloalkil, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)_2N(R^9)_2$, -$NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

veya R^{11} ve R^{12}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, C_1-C_6alkildir ve eklendiği N atomu ile birlikte alındığında, isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eden bir isteğe bağlı olarak ikame edilmiş C_3-C_8heterosikloalkil halkası oluşturur;

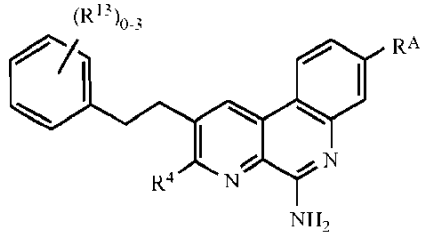
her bir R^{13}, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, -$LS(O)_2R^8$, -$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, -$LS(O)_2N(R^9)_2$, - $OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -

$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, $-LP(O)(OR^8)_2$, $-LOP(O)(OR^8)_2$, $-LP(O)(OR^{10})_2$ ve $-OLP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilir;

her bir R^A, birbirinden bağımsız olarak, $-R^8$, $-R^7$, $-OR^7$, $-OR^8$, $-R^{10}$, $-OR^{10}$, $-SR^8$, $-NO_2$, $-CN$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9C(S)R^8$, $-NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9C(S)N(R^9)_2$, $-NR^9CO_2R^8$, $-NR^9NR^9C(O)R^8$, $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9NR^9CO_2R^8$, $-C(O)C(O)R^8$, $-C(O)CH_2C(O)R^8$, $-CO_2R^8$, $-(CH_2),CO_2R^8$, $-C(O)R^8$, $-C(S)R^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(S)N(R^9)_2$, $-OC(O)N(R^9)_2$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)N(OR^8)R^8$, $-C(NOR^8)R^8$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_3R^8$, $-SO_2N(R^9)_2$, $-S(O)R^8$, $-NR^9SO_2N(R^9)_2$, $-NR^9SO_2R^8$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ ve $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$ arasından seçilir veya A Halkası üzerindeki iki komşu R^A ikame edicisi, halka elemanları olarak iki kadar heteroatom ihtiva eden 5-6 üyeli bir halka oluşturur;

n, her bir durumda birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir; her bir m, birbirinden bağımsız olarak, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 arasından seçilir ve

t, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir; (b) şu formüle sahip bir bileşik:



burada:

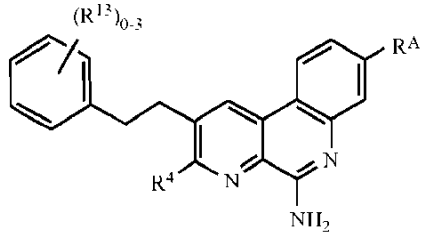
R^4, H, halojen, $-C(O)OR^7$, $-C(O)R^7$, $-C(O)N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^9)_2$, $-NHN(R^9)_2$, $-SR^7$, $-(CH_2)_nOR^7$, $-(CH_2)_nR^7$, $-LR^8$, $-LR^{10}$, $-OLR^8$, $-OLR^{10}$, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril,

$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, $-LP(O)(OR^8)_2$, $-LOP(O)(OR^8)_2$, $-LP(O)(OR^{10})_2$ ve $-OLP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilir;

her bir R^A, birbirinden bağımsız olarak, $-R^8$, $-R^7$, $-OR^7$, $-OR^8$, $-R^{10}$, $-OR^{10}$, $-SR^8$, $-NO_2$, $-CN$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9C(S)R^8$, $-NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9C(S)N(R^9)_2$, $-NR^9CO_2R^8$, $-NR^9NR^9C(O)R^8$, $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9NR^9CO_2R^8$, $-C(O)C(O)R^8$, $-C(O)CH_2C(O)R^8$, $-CO_2R^8$, $-(CH_2),CO_2R^8$, $-C(O)R^8$, $-C(S)R^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(S)N(R^9)_2$, $-OC(O)N(R^9)_2$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)N(OR^8)R^8$, $-C(NOR^8)R^8$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_3R^8$, $-SO_2N(R^9)_2$, $-S(O)R^8$, $-NR^9SO_2N(R^9)_2$, $-NR^9SO_2R^8$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ ve $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$ arasından seçilir veya A Halkası üzerindeki iki komşu R^A ikame edicisi, halka elemanları olarak iki kadar heteroatom ihtiva eden 5-6 üyeli bir halka oluşturur;

n, her bir durumda birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir; her bir m, birbirinden bağımsız olarak, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 arasından seçilir ve

t, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir; (b) şu formüle sahip bir bileşik:



burada:

R^4, H, halojen, $-C(O)OR^7$, $-C(O)R^7$, $-C(O)N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^9)_2$, $-NHN(R^9)_2$, $-SR^7$, $-(CH_2)_nOR^7$, $-(CH_2)_nR^7$, $-LR^8$, $-LR^{10}$, $-OLR^8$, $-OLR^{10}$, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril,

C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^4'ün C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak halojen, -CN, -NO_2, -R^7, - OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$P(O)(OR^8)_2$, - $OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$, -$OP(O)(OR^{10})_2$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)R^8$, -$S(O)_2N(R^9)_2$ ve -$NR^9S(O)_2R^8$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir L, birbirinden bağımsız olarak, bir bağ, -$(O(CH_2)_m)_t$-, C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilen arasından seçilir, burada L'ye ait C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilenden her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, - $N(R^9)_2$, -$P(O)(OR^8)_2$, -$OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$ ve -$OP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilen 1 ila 4 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^7, H, C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^7'nin C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, 1 ila 3 R^{13} grubu ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^8, birbirinden bağımsız olarak, H, -$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6heteroalkil, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilir, burada R^8'in C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_{21}-C_8alkin, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-

C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^4'ün C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak halojen, -CN, -NO_2, -R^7, - OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$P(O)(OR^8)_2$, - $OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$, -$OP(O)(OR^{10})_2$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)R^8$, -$S(O)_2N(R^9)_2$ ve -$NR^9S(O)_2R^8$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir L, birbirinden bağımsız olarak, bir bağ, -$(O(CH_2)_m)_t$-, C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilen arasından seçilir, burada L'ye ait C_1-C_6alkil, C_2-C_6alkenilen ve C_2-C_6alkinilenden her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, - $N(R^9)_2$, -$P(O)(OR^8)_2$, -$OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$ ve -$OP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilen 1 ila 4 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^7, H, C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^7'nin C_1-C_6alkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6haloalkoksi ve C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, 1 ila 3 R^{13} grubu ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^8, birbirinden bağımsız olarak, H, -$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_2-C_8alkin, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_1-C_6heteroalkil, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilir, burada R^8'in C_1-C_8alkil, C_2-C_8alken, C_{21}-C_8alkin, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, C_1-C_6alkoksi, C_3-C_8sikloalkil, C_2-C_8heterosikloalkil, C_1-C_6hidroksialkil ve C_1-

C_6haloalkoksi gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^9C(O)R^{11}$, -NR^9R^{10}, -$NR^{11}R^{12}$, -$N(R^9)_2$, - OR^9, -OR^{10}, -$C(O)NR^{11}R^{12}$ -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, H, -$C(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$C(O)R^{10}$, -$C(O)OR^{10}$, -$S(O)_2R^{10}$, -C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil ve C_3-C_6 sikloalkil arasından seçilir veya her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, eklendiği N ile birlikte bir C_3-C_8heterosikloalkil oluşturan bir C_1-C_6alkildir, burada C_3-C_8heterosikloalkil halkası isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eder ve burada R^9 'un C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil, C_3-C_6 sikloalkil veya C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^{10}, birbirinden bağımsız olarak, aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-Csheterosikloalkil ve heteroaril arasından seçilir, burada aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril grupları, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, -LR^9, -LOR^9, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9CO_2R^8$, -CO_2R^8, -$C(O)R^8$ ve -$C(O)N(R^9)_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^{11} ve R^{12}, birbirinden bağımsız olarak, H, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^{11} ve R^{12}'nin C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve

C_6haloalkoksi gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^9C(O)R^{11}$, -NR^9R^{10}, -$NR^{11}R^{12}$, -$N(R^9)_2$, - OR^9, -OR^{10}, -$C(O)NR^{11}R^{12}$ -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, H, -$C(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$C(O)R^{10}$, -$C(O)OR^{10}$, -$S(O)_2R^{10}$, -C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil ve C_3-C_6 sikloalkil arasından seçilir veya her bir R^9, birbirinden bağımsız olarak, eklendiği N ile birlikte bir C_3-C_8heterosikloalkil oluşturan bir C_1-C_6alkildir, burada C_3-C_8heterosikloalkil halkası isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eder ve burada R^9 'un C_1-C_6 alkil, C_1-C_6 heteroalkil, C_3-C_6 sikloalkil veya C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, -$S(O)_2R^{11}$, -$S(O)R^{11}$, -$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$ ve -$OP(O)(OR^{11})_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

her bir R^{10}, birbirinden bağımsız olarak, aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-Csheterosikloalkil ve heteroaril arasından seçilir, burada aril, C_3-C_8sikloalkil, C_3-C_8heterosikloalkil ve heteroaril grupları, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -R^8, -OR^8, -LR^9, -LOR^9, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9CO_2R^8$, -CO_2R^8, -$C(O)R^8$ ve -$C(O)N(R^9)_2$ arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

R^{11} ve R^{12}, birbirinden bağımsız olarak, H, C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve C_3-C_8heterosikloalkil arasından seçilir, burada R^{11} ve R^{12}'nin C_1-C_6alkil, C_1-C_6heteroalkil, C_1-C_6haloalkil, aril, heteroaril, C_3-C_8sikloalkil ve

C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, R^8, -OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$NR^8C(O)R^8$, -$NR^8C(O)OR^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterosikloalkil, -$S(O)_2R$, -$S(O)_2N(R^9)_2$, -$NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

veya R^{11} ve R^{12}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, C_1-C_6alkildir ve eklendiği N atomu ile birlikte alındığında, isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eden bir isteğe bağlı olarak ikame edilmiş C_3-C_8heterosikloalkil halkası oluşturur;

her bir R^{13}, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, -$LS(O)_2R^8$, -$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, -$LS(O)_2N(R^9)_2$, - $OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, -$LP(O)(OR^8)_2$, -$LOP(O)(OR^8)_2$, -$LP(O)(OR^{10})_2$ ve -$OLP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilir;

her bir R^A, birbirinden bağımsız olarak, -R^8, -R^7, -OR^7, -OR^8, -R^{10}, -OR^{10}, -SR^8, -NO_2, -CN, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9C(S)R^8$, -$NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9C(S)N(R^9)_2$, -$NR^9CO_2R^8$, -$NR^9NR^9C(O)R^8$, -$NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9NR^9CO_2R^8$, -$C(O)C(O)R^8$, -$C(O)CH_2C(O)R^8$, -CO_2R^8, -$(CH_2),CO_2R^8$, -$C(O)R^8$, -$C(S)R^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(S)N(R^9)_2$, -$OC(O)N(R^9)_2$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)N(OR^8)R^8$, -$C(NOR^8)R^8$, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)_3R^8$, -$SO_2N(R^9)_2$, -$S(O)R^8$, -$NR^9SO_2N(R^9)_2$, -$NR^9SO_2R^8$, -$P(O)(OR^8)_2$, - $OP(O)(OR^8)_2$, -

C_3-C_8heterosikloalkil gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, R^8, -OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$NR^8C(O)R^8$, -$NR^8C(O)OR^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterosikloalkil, -$S(O)_2R$, -$S(O)_2N(R^9)_2$, -$NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalkil ve C_1-C_6haloalkoksi arasından seçilen 1 ila 3 ikame edici ile isteğe bağlı olarak ikame edilmiştir;

veya R^{11} ve R^{12}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, C_1-C_6alkildir ve eklendiği N atomu ile birlikte alındığında, isteğe bağlı olarak N, O ve S arasından seçilen ilave bir heteroatom ihtiva eden bir isteğe bağlı olarak ikame edilmiş C_3-C_8heterosikloalkil halkası oluşturur;

her bir R^{13}, birbirinden bağımsız olarak, halojen, -CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, -$LS(O)_2R^8$, -$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, -$LS(O)_2N(R^9)_2$, - $OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, -$LP(O)(OR^8)_2$, -$LOP(O)(OR^8)_2$, -$LP(O)(OR^{10})_2$ ve -$OLP(O)(OR^{10})_2$ arasından seçilir;

her bir R^A, birbirinden bağımsız olarak, -R^8, -R^7, -OR^7, -OR^8, -R^{10}, -OR^{10}, -SR^8, -NO_2, -CN, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9C(S)R^8$, -$NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9C(S)N(R^9)_2$, -$NR^9CO_2R^8$, -$NR^9NR^9C(O)R^8$, -$NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9NR^9CO_2R^8$, -$C(O)C(O)R^8$, -$C(O)CH_2C(O)R^8$, -CO_2R^8, -$(CH_2),CO_2R^8$, -$C(O)R^8$, -$C(S)R^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(S)N(R^9)_2$, -$OC(O)N(R^9)_2$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)N(OR^8)R^8$, -$C(NOR^8)R^8$, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)_3R^8$, -$SO_2N(R^9)_2$, -$S(O)R^8$, -$NR^9SO_2N(R^9)_2$, -$NR^9SO_2R^8$, -$P(O)(OR^8)_2$, - $OP(O)(OR^8)_2$, -

$P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ ve $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$ arasından seçilir;

n, her bir durumda, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir;

her bir m, birbirinden bağımsız olarak, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 arasından seçilir; ve

t, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8; veya (c) (a) veya (b)'nin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

Diğer benzonaftiridin bileşikleri ve benzonaftiridin bileşikleri yapma yöntemleri, WO 2009/111337 ve Uluslararası Patent Başvurusu No. PCT/US2010//047587'de tarif edilir. Bir benzonaftiridin bileşiği veya bunu bir tuzu, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin bir benzonaftiridin bileşiği, bir su içinde yağ emülsiyonu veya bir mineral içerikli kompozisyon ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Özel bir düzenekte bir benzonaftiridin bileşiği, bir su içinde yağ emülsiyonu (örn., bir skualen-su emülsiyonu, örn., MF59) veya bir mineral içerikli kompozisyon (örn., bir mineral tuzu, örn., bir alüminyum tuzu veya bir kalsiyum tuzu) ile kombinasyon halinde kullanılır.

- Bir tiyosemikarbazon bileşiği, örn., WO2004/060308'de açıklananlar. Aktif bileşiklerin formüle edilmesine, üretilmesine ve taranmasına yönelik yöntemler de, WO2004/060308'de tarif edilmektedir. Tiyosemikarbazonlar, insan periferal kan mononükleer hücrelerinin, TNF-α gibi sitokinlerin üretimi için uyarılmasında özellikle etkilidir.
- Bir triptantrin bileşiği, örn., WO2004/064759'da açıklananlar. Aktif bileşiklerin formüle edilmesine, üretilmesine ve taranmasına yönelik yöntemler de, WO2004/064759'de tarif edilmektedir.

$P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ ve $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$ arasından seçilir;

n, her bir durumda, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8'dir;

her bir m, birbirinden bağımsız olarak, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 arasından seçilir; ve

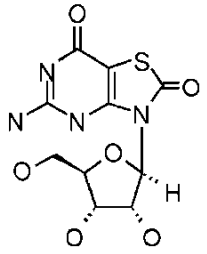
t, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya 8; veya (c) (a) veya (b)'nin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

Diğer benzonaftiridin bileşikleri ve benzonaftiridin bileşikleri yapma yöntemleri, WO 2009/111337 ve Uluslararası Patent Başvurusu No. PCT/US2010//047587'de tarif edilir. Bir benzonaftiridin bileşiği veya bunu bir tuzu, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin bir benzonaftiridin bileşiği, bir su içinde yağ emülsiyonu veya bir mineral içerikli kompozisyon ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Özel bir düzenekte bir benzonaftiridin bileşiği, bir su içinde yağ emülsiyonu (örn., bir skualen-su emülsiyonu, örn., MF59) veya bir mineral içerikli kompozisyon (örn., bir mineral tuzu, örn., bir alüminyum tuzu veya bir kalsiyum tuzu) ile kombinasyon halinde kullanılır.

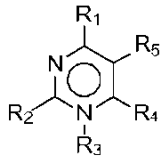
- Bir tiyosemikarbazon bileşiği, örn., WO2004/060308'de açıklananlar. Aktif bileşiklerin formüle edilmesine, üretilmesine ve taranmasına yönelik yöntemler de, WO2004/060308'de tarif edilmektedir. Tiyosemikarbazonlar, insan periferal kan mononükleer hücrelerinin, TNF-α gibi sitokinlerin üretimi için uyarılmasında özellikle etkilidir.
- Bir triptantrin bileşiği, örn., WO2004/064759'da açıklananlar. Aktif bileşiklerin formüle edilmesine, üretilmesine ve taranmasına yönelik yöntemler de, WO2004/064759'de tarif edilmektedir.

Tiyosemikarbazonlar, insan periferal kan mononükleer hücrelerinin, TNF-α gibi sitokinlerin üretimi için uyarılmasında özellikle etkilidir.

- Bir nükleosid analogu, örn.:(a) İzatorabin (ANA-245; 7-tiya-8-oksoguanosin):



ve bunun ön ilaçları; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) ABD Patenti No. 6,924,271; US2005/0070556 ve ABD Patenti No. 5,658,731'De'de açıklanan bileşikler; (f) şu formüle sahip bir bileşik:

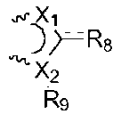


burada:

R_1 ve R_2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, $-NR_aR_b$, -OH, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, C_{1-6} alkil veya ikame edilmiş C_{1-6} alkildir;

R_3 mevcut değil, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, heterosiklil veya ikame edilmiş heterosiklildir;

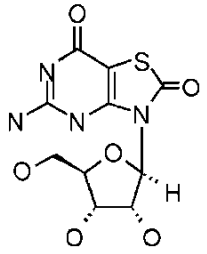
R_4 ve R_5'ten her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkildir veya birbirine bağlanarak R_{4-5}'te olduğu gibi 5 elemanlı bir halka oluşturur:



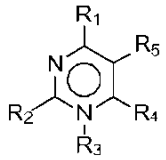
R_{4-5}

Tiyosemikarbazonlar, insan periferal kan mononükleer hücrelerinin, TNF-α gibi sitokinlerin üretimi için uyarılmasında özellikle etkilidir.

- Bir nükleosid analogu, örn.:(a) İzatorabin (ANA-245; 7-tiya-8-oksoguanosin):



ve bunun ön ilaçları; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) ABD Patenti No. 6,924,271; US2005/0070556 ve ABD Patenti No. 5,658,731'De'de açıklanan bileşikler; (f) şu formüle sahip bir bileşik:

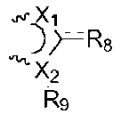


burada:

R_1 ve R_2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, $-NR_aR_b$, -OH, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, C_{1-6} alkil veya ikame edilmiş C_{1-6} alkildir;

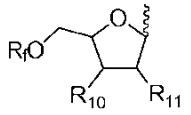
R_3 mevcut değil, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, heterosiklil veya ikame edilmiş heterosiklildir;

R_4 ve R_5'ten her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkildir veya birbirine bağlanarak R_{4-5}'te olduğu gibi 5 elemanlı bir halka oluşturur:



R_{4-5}

bağlanma, aşağıdakiyle işaret edilen bağlarda sağlanır

~~~

X_1 ve X_2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, N, C, O ya da S'dir;

R_8, H, halo, -OH, C_{1-6} alkil, C_{2-6} alkenil, C_{2-6} alkinil, -OH, $-NR_aR_b$,-$(CH_2)_n$-O-R_c, -O-(C_{1-6} alkyl), -$S(O)_pR_e$ veya -C(O)-R_d'dir;

R_9, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil veya R_{9a}'dır; burada R_{9a}, şöyledir:



R_{9a}

bağlanma, aşağıdakiyle işaret edilen bağda sağlanır

~~~

R_{10} ve R_{11}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, -NRaRb veya -OH'dir;

her bir R_a ve R_b, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, -C(O)R_d, C_{6-10} arildir;

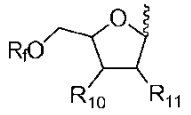
her bir R_c, birbirinden bağımsız olarak H, fosfat, difosfat, trifosfat, C_{1-6} alkil ya da ikame edilmiş C_{1-6} alkildir;

her bir R_d, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, $-NH_2$, -$NH(C_{1-6}$ alkil), -NH(ikame edilmiş C_{1-6} alkil), - $N(C_{1-6}$ alkil$)_2$, -N(ikame edilmiş C_{1-6} alkil$)_2$, C_{6-10} aril veya heterosiklildir;

her bir R_e, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, heterosiklil veya ikame edilmiş heterosiklildir;

her bir R_f, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, -C(O)R_d, fosfat, difosfat ya da trifosfattır;

bağlanma, aşağıdakiyle işaret edilen bağlarda sağlanır

~~~

X_1 ve X_2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, N, C, O ya da S'dir;

R_8, H, halo, -OH, C_{1-6} alkil, C_{2-6} alkenil, C_{2-6} alkinil, -OH, $-NR_aR_b$,-$(CH_2)_n$-O-R_c, -O-(C_{1-6} alkyl), -$S(O)_pR_e$ veya -C(O)-R_d'dir;

R_9, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, heterosiklil, ikame edilmiş heterosiklil veya R_{9a}'dır; burada R_{9a}, şöyledir:



R_{9a}

bağlanma, aşağıdakiyle işaret edilen bağda sağlanır

~~~

R_{10} ve R_{11}'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, -NRaRb veya -OH'dir;

her bir R_a ve R_b, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, -C(O)R_d, C_{6-10} arildir;

her bir R_c, birbirinden bağımsız olarak H, fosfat, difosfat, trifosfat, C_{1-6} alkil ya da ikame edilmiş C_{1-6} alkildir;

her bir R_d, birbirinden bağımsız olarak, H, halo, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkoksi, ikame edilmiş C_{1-6} alkoksi, $-NH_2$, -$NH(C_{1-6}$ alkil), -NH(ikame edilmiş C_{1-6} alkil), - $N(C_{1-6}$ alkil$)_2$, -N(ikame edilmiş C_{1-6} alkil$)_2$, C_{6-10} aril veya heterosiklildir;

her bir R_e, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, C_{6-10} aril, ikame edilmiş C_{6-10} aril, heterosiklil veya ikame edilmiş heterosiklildir;

her bir R_f, birbirinden bağımsız olarak, H, C_{1-6} alkil, ikame edilmiş C_{1-6} alkil, -C(O)R_d, fosfat, difosfat ya da trifosfattır;

her bir n, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2 ya da 3'tür;

her bir p, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1 veya 2'dir; veya

veya (g) (a) ila (f)'den herhangi birinin farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, (a) ila (f)'den herhangi birinin bir tatomeri veya tatomerin bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

- Loksoribin (7-alil-8-oksoguanosin) (ABD Patenti No. 5,011,828).
- WO2004/87 153'te açıklanan bileşikler, örneğin: Asilpiperazin bileşikleri, İndoledion bileşikleri, Tetrahidraizokinolin (THIQ) bileşikleri, Benzosiklodion bileşikleri, Aminoazavinil bileşikleri, Aminobenzimidazol kinolinon (ABIQ) bileşikleri (ABD Patenti No. 6,605,617, WO02/18383), Hidrapitalamid bileşikleri, Benzofenon bileşikleri, İzoksazol bileşikleri, Sterol bileşikleri, Kinazilinon bileşikleri, Pirol bileşikleri (WO2004/018455), Antrakinon bileşikleri, Kinoksalin bileşikleri, Triazin bileşikleri, Pirazalopirimidin bileşikleri ve Benzazol bileşikleri (WO03/082272).
- WO2006/002422'de açıklanan bileşikler.
- Bir aminoalkil glukosaminid fosfat türevi, örn., RC-529 (Johnson ve arkadaşları (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278, Evans ve arkadaşları (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229).
- Bir fosfazen, örn., poli[di(karboksilatofenoksi)fosfazen] ("PCPP"), örneğin Andrianov ve arkadaşları (1998) Biomaterials 19:109-115 ve Payne ve arkadaşları (1998) AdvDrug Delivery Review 31:185-196'da tarif edildiği gibi.
- Küçük moleküllü immüno-güçlendiriciler (SMIPler), örn.:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

her bir n, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1, 2 ya da 3'tür;

her bir p, birbirinden bağımsız olarak, 0, 1 veya 2'dir; veya

veya (g) (a) ila (f)'den herhangi birinin farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, (a) ila (f)'den herhangi birinin bir tatomeri veya tatomerin bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu.

- Loksoribin (7-alil-8-oksoguanosin) (ABD Patenti No. 5,011,828).
- WO2004/87 153'te açıklanan bileşikler, örneğin: Asilpiperazin bileşikleri, İndoledion bileşikleri, Tetrahidraizokinolin (THIQ) bileşikleri, Benzosiklodion bileşikleri, Aminoazavinil bileşikleri, Aminobenzimidazol kinolinon (ABIQ) bileşikleri (ABD Patenti No. 6,605,617, WO02/18383), Hidrapitalamid bileşikleri, Benzofenon bileşikleri, İzoksazol bileşikleri, Sterol bileşikleri, Kinazilinon bileşikleri, Pirol bileşikleri (WO2004/018455), Antrakinon bileşikleri, Kinoksalin bileşikleri, Triazin bileşikleri, Pirazalopirimidin bileşikleri ve Benzazol bileşikleri (WO03/082272).
- WO2006/002422'de açıklanan bileşikler.
- Bir aminoalkil glukosaminid fosfat türevi, örn., RC-529 (Johnson ve arkadaşları (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278, Evans ve arkadaşları (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229).
- Bir fosfazen, örn., poli[di(karboksilatofenoksi)fosfazen] ("PCPP"), örneğin Andrianov ve arkadaşları (1998) Biomaterials 19:109-115 ve Payne ve arkadaşları (1998) AdvDrug Delivery Review 31:185-196'da tarif edildiği gibi.
- Küçük moleküllü immüno-güçlendiriciler (SMIPler), örn.:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tiyo]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin

1-(2-metilpropil)-2-(propiltiyo)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-il](metill)amino]etanol

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-il](metil)amino]etilasetat

4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-on

N2 butil -1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2,N2-dimetil -1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tiyo]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin

1-(2-metilpropil)-2-(propiltiyo)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-il](metill)amino]etanol

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-il](metil)amino]etilasetat

4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-on

N2 butil -1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2,N2-dimetil -1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

N4,N4-dibenzil-1-(2-metoksi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin.

Mevcut buluşta kullanılma amaçlı sitokin indükleyici ajanlar, Çan Benzeri Reseptörlerin (TLR) modülatörleri ve/veya agonistleri olabilir. Örneğin bunlar, insan TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ve/veya TLR9 proteinlerinden birinin veya daha fazlasının agonistleri olabilir. Tercih edilen ajanlar, TLR4 (örn., enterobakteriyel lipopolisakaridlerden türetilen modifiye edilmiş doğal lipit A'lar, fosfolipit bileşikleri, örn., sentetik fosfolipit dimeri, E6020), TLR7 *(örn.,* benzonaftiridinler, imidazokinolinler) ve/veya TLR9 *(örn.,* CpG oligonükleotitleri) agonistleridir. Bu ajanlar, doğuştan gelen immünite yolaklarının aktifleştirilmesinde faydalıdır.

Sitokin indükleyici ajan, kompozisyona, bunun üretimi sırasında çeşitli evrelerde ilave edilebilir. Örneğin bu, bir antijen kompozisyonu içerisinde bulunabilir ve bu karışım daha sonra bir su içinde yağ emülsiyonuna ilave edilebilir. Bir alternatif olarak bu, bir su içinde yağ emülsiyonu içerisinde bulunabilir; bu durumda ajan ya emülsiyon bileşenlerine emülsifikasyondan önce ilave edilebilir yada emülsiyona, emülsifikasyondan sonra katılabilir. Benzer şekilde ajan, emülsiyon damlacıkları içerisinde koaservat edilebilir. Sitokin indükleyici ajanın nihai kompozisyon içerisindeki yeri ve dağılımı, bunun hidrofilik/lipofilik özelliklerine bağlı olacaktır; örn., ajan, sulu fazda, yağ fazında ve/veya yağ-su ara yüzünde yer alabilir.

1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

N4,N4-dibenzil-1-(2-metoksi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin.

Mevcut buluşta kullanılma amaçlı sitokin indükleyici ajanlar, Çan Benzeri Reseptörlerin (TLR) modülatörleri ve/veya agonistleri olabilir. Örneğin bunlar, insan TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ve/veya TLR9 proteinlerinden birinin veya daha fazlasının agonistleri olabilir. Tercih edilen ajanlar, TLR4 (örn., enterobakteriyel lipopolisakaridlerden türetilen modifiye edilmiş doğal lipit A'lar, fosfolipit bileşikleri, örn., sentetik fosfolipit dimeri, E6020), TLR7 *(örn.,* benzonaftiridinler, imidazokinolinler) ve/veya TLR9 *(örn.,* CpG oligonükleotitleri) agonistleridir. Bu ajanlar, doğuştan gelen immünite yolaklarının aktifleştirilmesinde faydalıdır.

Sitokin indükleyici ajan, kompozisyona, bunun üretimi sırasında çeşitli evrelerde ilave edilebilir. Örneğin bu, bir antijen kompozisyonu içerisinde bulunabilir ve bu karışım daha sonra bir su içinde yağ emülsiyonuna ilave edilebilir. Bir alternatif olarak bu, bir su içinde yağ emülsiyonu içerisinde bulunabilir; bu durumda ajan ya emülsiyon bileşenlerine emülsifikasyondan önce ilave edilebilir yada emülsiyona, emülsifikasyondan sonra katılabilir. Benzer şekilde ajan, emülsiyon damlacıkları içerisinde koaservat edilebilir. Sitokin indükleyici ajanın nihai kompozisyon içerisindeki yeri ve dağılımı, bunun hidrofilik/lipofilik özelliklerine bağlı olacaktır; örn., ajan, sulu fazda, yağ fazında ve/veya yağ-su ara yüzünde yer alabilir.

Sitokin indükleyici ajan, bir ayrı ajana, örn., bir antijene (*örn.*, CRM197) konjuge edilmiş olabilir. Küçük moleküller için konjugasyon teknikleri ile ilgili genel bir inceleme, Thompson ve arkadaşları (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255-266'da verilmiştir. Bir alternatif olarak adjuvanlar, ilave ajanlar ile kovalent olmayan şekilde, örn., hidrofobik veya iyonik etkileşimlerle de birleştirilebilir.

Tercih edilen sitokin indükleyici ajanlar, (a) benzonaftiridin bileşikleri; (b) immüno-uyarıcı oligonükleotitler ve (c) 3dMPL'dir.

İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler, nükleotit modifikasyonları/analogları, örn., fosforotiyoat modifikasyonları içerebilir ve çift iplikçikli veya (RNA hariç) tek iplikçikli olabilir. Kandimalla ve arkadaşları (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400, WO02/26757 ve WO99/62923, olası analog ikamelerini, *örn.*, guanosinin 2'-deoksi-7-deazaguanosin ile değiştirilmesini açıklar. CpG oligonükleotitlerinin adjuvan etkisi ayrıca Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835; McCluskie ve arkadaşları (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185; WO98/40100; ABD Patenti No. 6,207,646; ABD Patenti No. 6,239,116 ve ABD Patenti No. 6,429,199'Da'da da tartışılır. Bir CpG sekansı, GTCGTT veya TTCGTT motifi gibi TLR9'a yönlendirilmiş olabilir (Kandimalla ve arkadaşları (2003) Biochemical Society Transactions 31 (bölüm 3): 654-658). CpG sekansı, bir CpG-A ODN (oligodeoksinükleotit) gibi bir Th1 immün yanıtı indüklenmesine özel olabilir veya bir CpG-B ODN gibi bir B hücresi yanıtı indüklenmesine daha özel olabilir. CpG-A ve CpG-B ODNler, Blackwell ve

Sitokin indükleyici ajan, bir ayrı ajana, örn., bir antijene (*örn.*, CRM197) konjuge edilmiş olabilir. Küçük moleküller için konjugasyon teknikleri ile ilgili genel bir inceleme, Thompson ve arkadaşları (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255-266'da verilmiştir. Bir alternatif olarak adjuvanlar, ilave ajanlar ile kovalent olmayan şekilde, örn., hidrofobik veya iyonik etkileşimlerle de birleştirilebilir.

Tercih edilen sitokin indükleyici ajanlar, (a) benzonaftiridin bileşikleri; (b) immüno-uyarıcı oligonükleotitler ve (c) 3dMPL'dir.

İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler, nükleotit modifikasyonları/analogları, örn., fosforotiyoat modifikasyonları içerebilir ve çift iplikçikli veya (RNA hariç) tek iplikçikli olabilir. Kandimalla ve arkadaşları (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400, WO02/26757 ve WO99/62923, olası analog ikamelerini, *örn.*, guanosinin 2'-deoksi-7-deazaguanosin ile değiştirilmesini açıklar. CpG oligonükleotitlerinin adjuvan etkisi ayrıca Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835; McCluskie ve arkadaşları (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185; WO98/40100; ABD Patenti No. 6,207,646; ABD Patenti No. 6,239,116 ve ABD Patenti No. 6,429,199'Da'da da tartışılır. Bir CpG sekansı, GTCGTT veya TTCGTT motifi gibi TLR9'a yönlendirilmiş olabilir (Kandimalla ve arkadaşları (2003) Biochemical Society Transactions 31 (bölüm 3): 654-658). CpG sekansı, bir CpG-A ODN (oligodeoksinükleotit) gibi bir Th1 immün yanıtı indüklenmesine özel olabilir veya bir CpG-B ODN gibi bir B hücresi yanıtı indüklenmesine daha özel olabilir. CpG-A ve CpG-B ODNler, Blackwell ve

arkadaşları (2003) J Immunol 170:4061-4068, Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65; ve WO01/95935'te tartışılır. Tercihen CpG, bir CpG-A ODN'dir. Tercihen CpG oligonükleotidi, reseptör tanıma için 5' ucuna erişilebilir olacak şekilde yapılandırılır. İsteğe bağlı olarak iki CpG oligonükleotit sekansı, 3' uçlarından eklenerek "immünomerler" oluşturulabilir. Bakınız örneğin referanslar Kandimalla ve arkadaşları (2003) Biochemical Society Transactions 31 (bölüm 3): 654-658; Kandimalla ve arkadaşları (2003) BBRC 306:948-953; Bhagat ve arkadaşları (2003) BBRC 300:853-861 ve WO03/035836. Faydalı bir CpG adjuvanı, PROMUNE (TM) (Coley Pharmaceutical Group, Inc.) olarak da bilinen CpG7909'dur.

CpG sekansları kullanılmasına bir alternatif veya ek olarak TpG sekansları da kullanılabilir (WO01/22972). Bu oligonükleotitler, metile edilmemiş CpG motifleri içermeyebilir.

İmmüno-uyarıcı oligonükleotit, pirimidin bakımından zengin olabilir. Örneğin bu, birden fazla ardışık timidin nükleotidi (*örn.*, TTTT (SEK.KİM.NO:17), WO01/22972'de açıklandığı gibi) içerebilir ve/veya timidinin >%25 olduğu (*örn.*, >%35, >%40, >%50, >%60, >%80, *vb.*) bir nükleotit kompozisyonuna sahip olabilir. Örneğin bu, birden fazla ardışık sitosin nükleotidi (örn., CCC (SEK.KİM.NO:18), WO01/22972'de açıklandığı gibi) içerebilir ve/veya sitosinin >%25 olduğu (*örn.*, >%35, >%40, >%50, >%60, >%80, *vb.*) bir nükleotit kompozisyonuna sahip olabilir. Bu oligonükleotitler, metile edilmemiş CpG motifleri içermeyebilir.

arkadaşları (2003) J Immunol 170:4061-4068, Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65; ve WO01/95935'te tartışılır. Tercihen CpG, bir CpG-A ODN'dir. Tercihen CpG oligonükleotidi, reseptör tanıma için 5' ucuna erişilebilir olacak şekilde yapılandırılır. İsteğe bağlı olarak iki CpG oligonükleotit sekansı, 3' uçlarından eklenerek "immünomerler" oluşturulabilir. Bakınız örneğin referanslar Kandimalla ve arkadaşları (2003) Biochemical Society Transactions 31 (bölüm 3): 654-658; Kandimalla ve arkadaşları (2003) BBRC 306:948-953; Bhagat ve arkadaşları (2003) BBRC 300:853-861 ve WO03/035836. Faydalı bir CpG adjuvanı, PROMUNE (TM) (Coley Pharmaceutical Group, Inc.) olarak da bilinen CpG7909'dur.

CpG sekansları kullanılmasına bir alternatif veya ek olarak TpG sekansları da kullanılabilir (WO01/22972). Bu oligonükleotitler, metile edilmemiş CpG motifleri içermeyebilir.

İmmüno-uyarıcı oligonükleotit, pirimidin bakımından zengin olabilir. Örneğin bu, birden fazla ardışık timidin nükleotidi (*örn.*, TTTT (SEK.KİM.NO:17), WO01/22972'de açıklandığı gibi) içerebilir ve/veya timidinin >%25 olduğu (*örn.*, >%35, >%40, >%50, >%60, >%80, *vb.*) bir nükleotit kompozisyonuna sahip olabilir. Örneğin bu, birden fazla ardışık sitosin nükleotidi (örn., CCC (SEK.KİM.NO:18), WO01/22972'de açıklandığı gibi) içerebilir ve/veya sitosinin >%25 olduğu (*örn.*, >%35, >%40, >%50, >%60, >%80, *vb.*) bir nükleotit kompozisyonuna sahip olabilir. Bu oligonükleotitler, metile edilmemiş CpG motifleri içermeyebilir.

İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler tipik olarak en azından 20 nükleotit içerecektir. Bunlar, 100'den az nükleotit içerebilir.

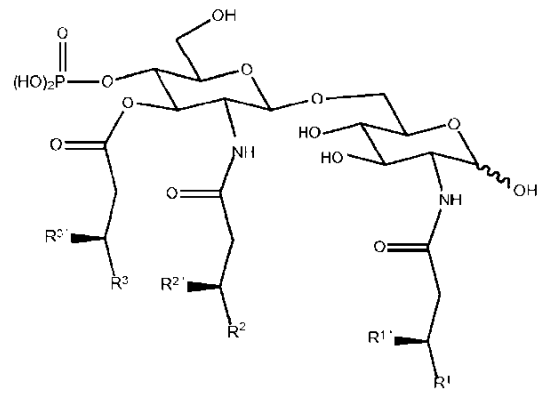
3dMPL (3 de-O-asile edilmiş monofosforil lipit A veya 3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A olarak da bilinir), monofosforil lipit A içerisindeki indirgeyici uç glukosaminin 3 pozisyonunun de-asile edilmiş olduğu bir adjuvandır. 3dMPL, *Salmonella minnesota*'nın bir heptoseless mutantından hazırlanmıştır ve lipit A'ya kimyasal olarak benzer olmakla birlikte bir asitle değişken fosforil grubundan ve bir bazla değişken asil grubundan yoksundur. Bu, monosit/makrofaj soyundan hücreleri aktifleştirir ve IL-1, IL-12, TNF-α ve GM-CSF dahil olmak üzere birkaç sitokinin salınmasını uyarır (bakınız aynı zamanda Thompson ve arkadaşları (2005) J Leukoc Biol 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'). 3dMPL'nin preparasyonu orijinal olarak İngiltere patent başvurusu GB-A-22202 11'de tarif edildi.

3dMPL, asilasyonlarını değiştirmek suretiyle ilgili moleküllerin bir karışımı şeklini alabilir (örn., farklı uzunluklarda 3, 4, 5 veya 6 asil zincirine sahip). İki glukosamin (2-deoksi-2-amino-glukoz) monosakaridleri, 2nci pozisyonlarındaki karbonlarında (*yani* 2 ve 2' pozisyonlarında) N-asile edilir ve 3' pozisyonunda da O-asilasyon vardır. Karbon 2'ye eklenmiş grubun formülü, -NH-CO-CH_2-$CR^1R^{1'}$'dür. Karbon 2''ye eklenmiş grubun formülü, -NH-CO-CH_2-$CR^2R^{2'}$'dür. Karbon 3''ye eklenmiş grubun formülü -O-CO-CH_2-$CR^3R^{3'}$'dür. Temsili bir yapı şöyledir:

İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler tipik olarak en azından 20 nükleotit içerecektir. Bunlar, 100'den az nükleotit içerebilir.

3dMPL (3 de-O-asile edilmiş monofosforil lipit A veya 3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A olarak da bilinir), monofosforil lipit A içerisindeki indirgeyici uç glukosaminin 3 pozisyonunun de-asile edilmiş olduğu bir adjuvandır. 3dMPL, *Salmonella minnesota*'nın bir heptoseless mutantından hazırlanmıştır ve lipit A'ya kimyasal olarak benzer olmakla birlikte bir asitle değişken fosforil grubundan ve bir bazla değişken asil grubundan yoksundur. Bu, monosit/makrofaj soyundan hücreleri aktifleştirir ve IL-1, IL-12, TNF-α ve GM-CSF dahil olmak üzere birkaç sitokinin salınmasını uyarır (bakınız aynı zamanda Thompson ve arkadaşları (2005) J Leukoc Biol 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'). 3dMPL'nin preparasyonu orijinal olarak İngiltere patent başvurusu GB-A-22202 11'de tarif edildi.

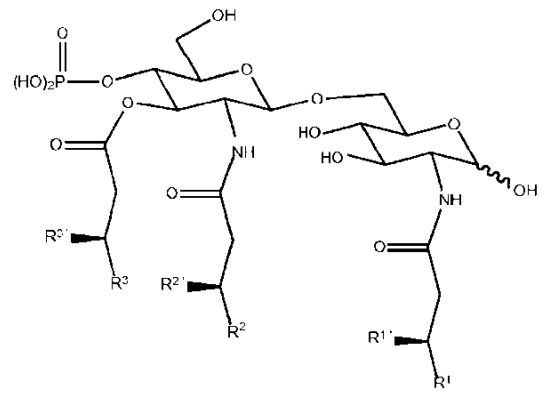
3dMPL, asilasyonlarını değiştirmek suretiyle ilgili moleküllerin bir karışımı şeklini alabilir (örn., farklı uzunluklarda 3, 4, 5 veya 6 asil zincirine sahip). İki glukosamin (2-deoksi-2-amino-glukoz) monosakaridleri, 2nci pozisyonlarındaki karbonlarında (*yani* 2 ve 2' pozisyonlarında) N-asile edilir ve 3' pozisyonunda da O-asilasyon vardır. Karbon 2'ye eklenmiş grubun formülü, -NH-CO-CH_2-$CR^1R^{1'}$'dür. Karbon 2''ye eklenmiş grubun formülü, -NH-CO-CH_2-$CR^2R^{2'}$'dür. Karbon 3''ye eklenmiş grubun formülü -O-CO-CH_2-$CR^3R^{3'}$'dür. Temsili bir yapı şöyledir:



R^1, R^2 ve R^3 gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -$(CH_2)_n$-CH_3'tür. *n* değeri tercihen, 8 ile 16 arasında, tercihen 9 ile 12 arasında ve en fazla tercihen de 10'dur.

$R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$ gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, şu şekilde olabilir: (a) -H; (b) -OH; veya (c) - O-CO-R^4, burada R^4, ya -H yada -$(CH_2)_m$-CH_3'tür; burada *m* değeri tercihen 8 ile 16 arasında ve daha tercihen 10, 12 veya 14'tür. 2nci pozisyonda *m* tercihen 14'tür. 2''nci poziyonda *m* tercihen 10'dur. 3''üncü poziyonda *m* tercihen 12'dir. Bu yüzden $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$ grupları tercihen dodekanoik asit, tetradekanoik asit veya heksadekanoik asit arasından seçilen -O-asil gruplarıdır.

$R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'nün tamamının -H olduğu durumda 3dMPL, sadece 3 asil zincirine sahiptir (2, 2' ve 3' pozisyonlarının her birinde bir tane olmak üzere). $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den sadece ikisinin -H olduğu durumda 3dMPL, 4 asil zincirine sahip olabilir. $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den sadece birinin -H olduğu duğu durumda 3dMPL, 5 asil zincirine sahip olabilir. $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den hiçbirinin -H olmadığı durumda 3dMPL, 6 asil zincirine sahip olabilir. Buluşa göre kullanılan 3dMPL adjuvanı, 3 ila 6 asil



R^1, R^2 ve R^3 gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, -$(CH_2)_n$-CH_3'tür. *n* değeri tercihen, 8 ile 16 arasında, tercihen 9 ile 12 arasında ve en fazla tercihen de 10'dur.

$R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$ gruplarından her biri, birbirinden bağımsız olarak, şu şekilde olabilir: (a) -H; (b) -OH; veya (c) - O-CO-R^4, burada R^4, ya -H yada -$(CH_2)_m$-CH_3'tür; burada *m* değeri tercihen 8 ile 16 arasında ve daha tercihen 10, 12 veya 14'tür. 2nci pozisyonda *m* tercihen 14'tür. 2''nci poziyonda *m* tercihen 10'dur. 3''üncü poziyonda *m* tercihen 12'dir. Bu yüzden $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$ grupları tercihen dodekanoik asit, tetradekanoik asit veya heksadekanoik asit arasından seçilen -O-asil gruplarıdır.

$R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'nün tamamının -H olduğu durumda 3dMPL, sadece 3 asil zincirine sahiptir (2, 2' ve 3' pozisyonlarının her birinde bir tane olmak üzere). $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den sadece ikisinin -H olduğu durumda 3dMPL, 4 asil zincirine sahip olabilir. $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den sadece birinin -H olduğu duğu durumda 3dMPL, 5 asil zincirine sahip olabilir. $R^{1'}$, $R^{2'}$ ve $R^{3'}$'den hiçbirinin -H olmadığı durumda 3dMPL, 6 asil zincirine sahip olabilir. Buluşa göre kullanılan 3dMPL adjuvanı, 3 ila 6 asil

zinciri içeren bu formların bir karışımı olabilir ancak karışım içerisine 6 asil zincirli 3dMPL dahil edilmesi ve özellikle heksaasil zinciri formunun, toplam 3dMPL'nin ağırlığa göre en az %10'unu, *örn.,* >%20, >%30, >%40, >%50% veya daha fazlasını oluşturmasının sağlanması tercih edilir. 6 asil zinciri bulunan 3dMPL'nin, en adjuvan-aktif form olduğu bulunmuştur.

Bu yüzden buluşa ait kompozisyonlara dahil edilmek için en fazla tercih edilen 3dMPL formu, aşağıda gösterilen formül (IV)'e sahiptir.

3dMPL'nin bir karışım formunda kullanılması durumunda buluşa ait kompozisyonlardaki 3dMPL miktarlarına veya konsantrasyonlarına göndermeler, karışım içerisinde birleştirilmiş 3dMPL türlerine karşılık gelir.

Sulu koşullarda 3dMPL, miselar agregatlar veya farklı büyüklüklerde, *örn.,* çapı <150nm veya >500nm olan partiküller oluşturabilir. Bunlardan herhangi biri veya her ikisi de, buluşla birlikte kullanılabilir ve daha iyi partiküller, rutin deneylerle seçilebilir. Üstün aktivitelerinden dolayı buluşa göre kullanım için daha küçük partiküller (örn.., bir berrak sulu 3dMPL süspansiyonu vermek için yeterince küçük) tercih edilir (WO94/21292). Tercih edilen partiküllerin ortalama çapı, 220 nm'nin altında; daha tercihen 200 nm'nin altında veya 150 nm'nin altında veya 120 nm'nin altındadır ve hatta ortalama çapı 100nm'nin altında bile olabilir. Bununla birlikte çoğu durumda ortalama çap, 50 nm'den daha düşük olmayacaktır. Bu partiküller, filtreli sterilizasyona uygun olmak için yeteri kadar küçüktür. Partikül çapı, bir ortalama partikül çapını ortaya çıkaran

zinciri içeren bu formların bir karışımı olabilir ancak karışım içerisine 6 asil zincirli 3dMPL dahil edilmesi ve özellikle heksaasil zinciri formunun, toplam 3dMPL'nin ağırlığa göre en az %10'unu, *örn.,* >%20, >%30, >%40, >%50% veya daha fazlasını oluşturmasının sağlanması tercih edilir. 6 asil zinciri bulunan 3dMPL'nin, en adjuvan-aktif form olduğu bulunmuştur.

Bu yüzden buluşa ait kompozisyonlara dahil edilmek için en fazla tercih edilen 3dMPL formu, aşağıda gösterilen formül (IV)'e sahiptir.

3dMPL'nin bir karışım formunda kullanılması durumunda buluşa ait kompozisyonlardaki 3dMPL miktarlarına veya konsantrasyonlarına göndermeler, karışım içerisinde birleştirilmiş 3dMPL türlerine karşılık gelir.

Sulu koşullarda 3dMPL, miselar agregatlar veya farklı büyüklüklerde, *örn.,* çapı <150nm veya >500nm olan partiküller oluşturabilir. Bunlardan herhangi biri veya her ikisi de, buluşla birlikte kullanılabilir ve daha iyi partiküller, rutin deneylerle seçilebilir. Üstün aktivitelerinden dolayı buluşa göre kullanım için daha küçük partiküller (örn.., bir berrak sulu 3dMPL süspansiyonu vermek için yeterince küçük) tercih edilir (WO94/21292). Tercih edilen partiküllerin ortalama çapı, 220 nm'nin altında; daha tercihen 200 nm'nin altında veya 150 nm'nin altında veya 120 nm'nin altındadır ve hatta ortalama çapı 100nm'nin altında bile olabilir. Bununla birlikte çoğu durumda ortalama çap, 50 nm'den daha düşük olmayacaktır. Bu partiküller, filtreli sterilizasyona uygun olmak için yeteri kadar küçüktür. Partikül çapı, bir ortalama partikül çapını ortaya çıkaran

rutin dinamik ışık saçılımı tekniğiyle değerlendirilebilir. Bir partikülün çapının x nm olduğunun söylenmesi durumunda partiküllerin dağılımı genellikle bu ortalama etrafında olacak ancak partiküllerin sayısal olarak en azından %50'sinin (*örn.*, >%60, >%70, >%80, >%90 veya üzeri) çapı, x+%25 aralığında olacaktır.

3dMPL, bir su içinde yağ emülsiyonu ile kombinasyon halinde kullanılabilir. 3dMPL'nin önemli ölçüde tamamı, emülsiyonun sulu fazında yer alabilir. 3dMPL, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin 3dMPL'nin QS21 saponin (WO94/00153) (bir su içinde yağ emülsiyonu halinde dahil (WO95/17210)) ile, bir immüno-uyarıcı oligonükleotit ile, hem QS21 hem de bir immüno-uyarıcı oligonükleotit ile, alüminyum fosfat ile (WO96/26741), alüminyum hidroksit ile (WO93/19780) veya alüminyum fosfat ve alüminyum hidroksit ile kombinasyon halinde kullanıldığı bilinir.

rutin dinamik ışık saçılımı tekniğiyle değerlendirilebilir. Bir partikülün çapının x nm olduğunun söylenmesi durumunda partiküllerin dağılımı genellikle bu ortalama etrafında olacak ancak partiküllerin sayısal olarak en azından %50'sinin (*örn.*, >%60, >%70, >%80, >%90 veya üzeri) çapı, x+%25 aralığında olacaktır.

3dMPL, bir su içinde yağ emülsiyonu ile kombinasyon halinde kullanılabilir. 3dMPL'nin önemli ölçüde tamamı, emülsiyonun sulu fazında yer alabilir. 3dMPL, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin 3dMPL'nin QS21 saponin (WO94/00153) (bir su içinde yağ emülsiyonu halinde dahil (WO95/17210)) ile, bir immüno-uyarıcı oligonükleotit ile, hem QS21 hem de bir immüno-uyarıcı oligonükleotit ile, alüminyum fosfat ile (WO96/26741), alüminyum hidroksit ile (WO93/19780) veya alüminyum fosfat ve alüminyum hidroksit ile kombinasyon halinde kullanıldığı bilinir.

Formül (IV)

Yağlı Adjuvanlar

Buluşla birlikte kullanılabilecek yağlı adjuvanlar arasında yukarıda tarif edilen su içinde yağ emülsiyonları yer alır ve ayrıca örneğin aşağıdakiler de yer alır:

- Formül I, II veya III'e ait bir fosfolipit bileşiği veya bunun bir tuzu:

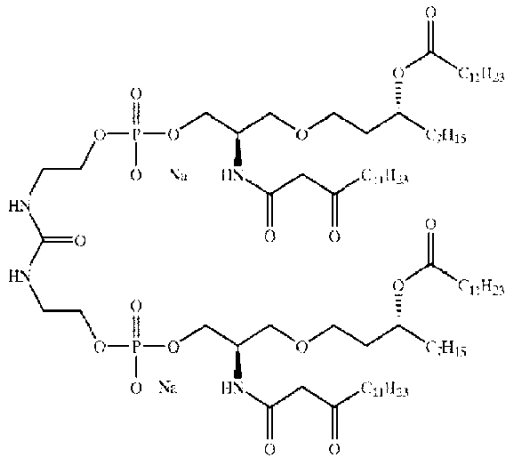
Formül (IV)

Yağlı Adjuvanlar

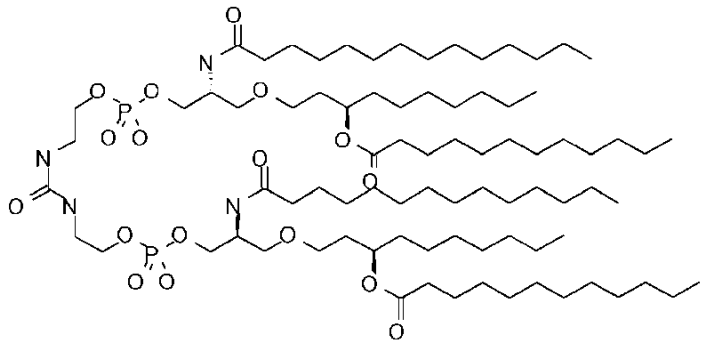
Buluşla birlikte kullanılabilecek yağlı adjuvanlar arasında yukarıda tarif edilen su içinde yağ emülsiyonları yer alır ve ayrıca örneğin aşağıdakiler de yer alır:

- Formül I, II veya III'e ait bir fosfolipit bileşiği veya bunun bir tuzu:

- WO03/011223'de tanımlandığı gibi, örn., 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 veya 'ER 804057', *örn..*:

- 

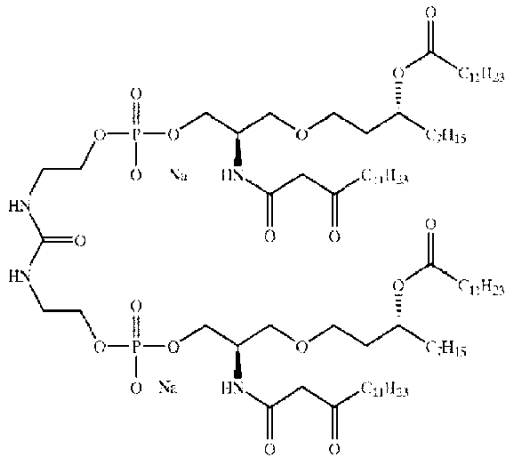
ER804057



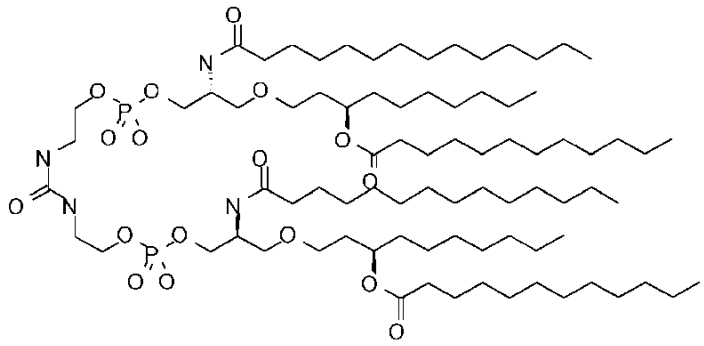
ER-803022.

- ER804057 ayrıca E6020 olarak da bilinir. Formül I, II veya III'e ait bir fosfolipit bileşiği veya bunun bir tuzu, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin Formül I, II veya III'e ait bir bileşik, bir su içinde yağ emülsiyonu veya mineral içerikli bir kompozisyon ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Özel bir düzenekte E6020, bir su içinde yağ emülsiyonu (örn., bir skualen-su emülsiyonu, örn., MF59) veya bir mineral içerikli kompozisyon (örn., bir mineral tuzu, örn., bir

- WO03/011223'de tanımlandığı gibi, örn., 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 veya 'ER 804057', *örn..*:

- 

ER804057

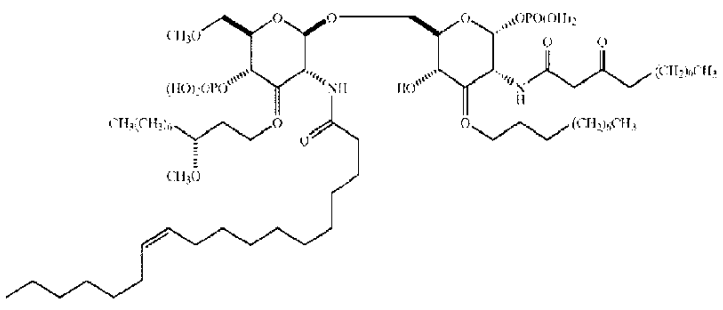


ER-803022.

- ER804057 ayrıca E6020 olarak da bilinir. Formül I, II veya III'e ait bir fosfolipit bileşiği veya bunun bir tuzu, kendi başına veya bir veya daha fazla başka bileşik ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin Formül I, II veya III'e ait bir bileşik, bir su içinde yağ emülsiyonu veya mineral içerikli bir kompozisyon ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Özel bir düzenekte E6020, bir su içinde yağ emülsiyonu (örn., bir skualen-su emülsiyonu, örn., MF59) veya bir mineral içerikli kompozisyon (örn., bir mineral tuzu, örn., bir

alüminyum tuzu veya bir kalsiyum tuzu) ile kombinasyon halinde kullanılır.

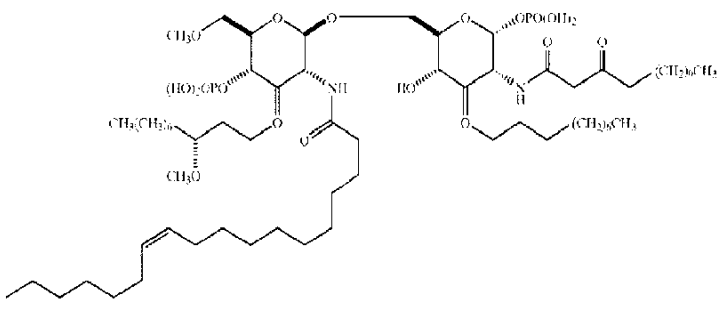
- *Escherichia coli*'den lipit A türevleri, örn., OM-174 (Meraldi ve arkadaşları (2003) Vaccine 21:2485-249 1 ve Pajak ve arkadaşları (2003) Vaccine 21:836-842'de tarif edilmiştir).
- Bir katyonik lipit ve bir (genellikle nötr) ortak lipit, örn., aminopropil-dimetil-miristoleiloksi-propanaminyum bromür- difitanoilfosfatidil-etanolamin ("VAXFECTIN (TM)") veya aminopropil- dimetil-bis-dodesiloksi-propanaminyum bromür-dioleoilfosfatidil- etanolamin ("GAP-DLRIE:DOPE") içeren bir formülasyon. (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeseneiloksi)-1-propanaminyum tuzlarını ihtiva eden formülasyonlar tercih edilir (ABD Patenti No. 6,586,409).
- 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A (yukarı bakınız).
- Bir fosfat içerikli asiklik omurgaya bağlı lipitler ihtiva eden bileşikler, örn., TLR4 antagonisti E5564 (Wong ve arkadaşları (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42, US2005/0215517):



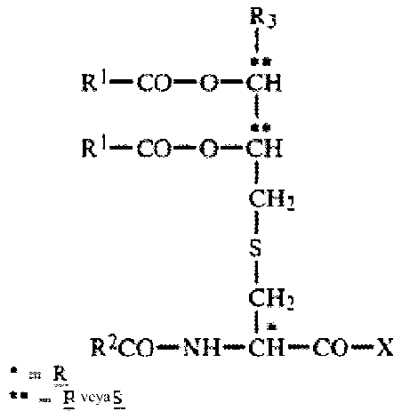
- Lipopeptitler (yani bir veya daha fazla yağlı asit tortusu ve iki veya daha fazla amino asit tortusu içeren bileşikler), örn., gliserilsisteine dayanan lipopeptitler. Bu tür peptitlerin spesifik örnekleri arasında aşağıdaki formüle ait bileşikler yer alır

alüminyum tuzu veya bir kalsiyum tuzu) ile kombinasyon halinde kullanılır.

- *Escherichia coli*'den lipit A türevleri, örn., OM-174 (Meraldi ve arkadaşları (2003) Vaccine 21:2485-249 1 ve Pajak ve arkadaşları (2003) Vaccine 21:836-842'de tarif edilmiştir).
- Bir katyonik lipit ve bir (genellikle nötr) ortak lipit, örn., aminopropil-dimetil-miristoleiloksi-propanaminyum bromür- difitanoilfosfatidil-etanolamin ("VAXFECTIN (TM)") veya aminopropil- dimetil-bis-dodesiloksi-propanaminyum bromür-dioleoilfosfatidil- etanolamin ("GAP-DLRIE:DOPE") içeren bir formülasyon. (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeseneiloksi)-1-propanaminyum tuzlarını ihtiva eden formülasyonlar tercih edilir (ABD Patenti No. 6,586,409).
- 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A (yukarı bakınız).
- Bir fosfat içerikli asiklik omurgaya bağlı lipitler ihtiva eden bileşikler, örn., TLR4 antagonisti E5564 (Wong ve arkadaşları (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42, US2005/0215517):

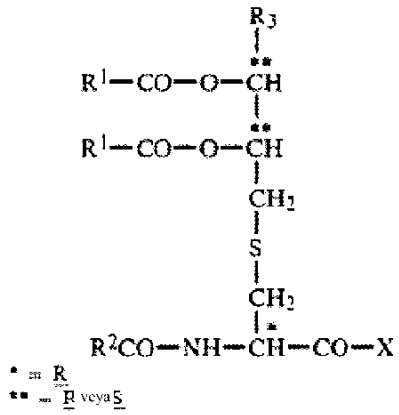


- Lipopeptitler (yani bir veya daha fazla yağlı asit tortusu ve iki veya daha fazla amino asit tortusu içeren bileşikler), örn., gliserilsisteine dayanan lipopeptitler. Bu tür peptitlerin spesifik örnekleri arasında aşağıdaki formüle ait bileşikler yer alır



burada R^1 ve R^2'den her biri, 8 ila 30, tercihen 11 ila 21 karbon atomuna sahip, isteğe bağlı olarak ayrıca oksijen fonksiyonları ile ikame edilmiş olan doymuş veya doymamış, alifatik veya karışık alifatik-sikloalifatik hidrokarbon radikalini temsil eder; R^3, hidrojen veya R_1-CO-O-CH_2- radikalini temsil eder; burada R yukarıdakiyle aynı anlama gelir ve X, bir peptit bağlantısıyla bağlanmış ve bir serbest, esterlenmiş veya amide edilmiş karboksi grubuna sahip bir amino asidi veya terminal karboksi grubunun serbest, esterlenmiş veya amide edilmiş formda olduğu, 2 ila 10 amino aside sahip bir amino asit sekansını temsil eder. Belirli düzeneklerde amino asit sekansı, bir D-amino asit, örneğin, D-glutamik asit (D-Glu) veya D-gamma-karboksi-glutamik asit (D-Gla) içerir.

Bakteriyel lipopeptitler genellikle TLR2'yi, TLR6 katılımını gerektirmeden, tanır. (TLRler işbirliği içerisinde çalışarak çeşitli tetikleyicilerin spesifik olarak tanınmasını sağlar ve TLR2 artı TLR6 birlikte peptidoglikanları tanırken TLR2, TLR6 olmaksızın lipopeptitleri tanır.) Bunlar bazen doğal lipopeptitler ve sentetik lipopeptitler şeklinde sınıflandırılır. Sentetik lipopeptitler, benzer

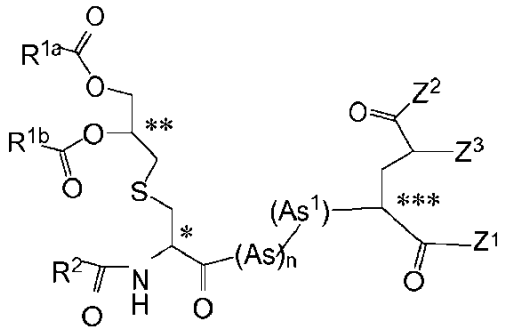


burada R^1 ve R^2'den her biri, 8 ila 30, tercihen 11 ila 21 karbon atomuna sahip, isteğe bağlı olarak ayrıca oksijen fonksiyonları ile ikame edilmiş olan doymuş veya doymamış, alifatik veya karışık alifatik-sikloalifatik hidrokarbon radikalini temsil eder; R^3, hidrojen veya R_1-CO-O-CH_2- radikalini temsil eder; burada R yukarıdakiyle aynı anlama gelir ve X, bir peptit bağlantısıyla bağlanmış ve bir serbest, esterlenmiş veya amide edilmiş karboksi grubuna sahip bir amino asidi veya terminal karboksi grubunun serbest, esterlenmiş veya amide edilmiş formda olduğu, 2 ila 10 amino aside sahip bir amino asit sekansını temsil eder. Belirli düzeneklerde amino asit sekansı, bir D-amino asit, örneğin, D-glutamik asit (D-Glu) veya D-gamma-karboksi-glutamik asit (D-Gla) içerir.

Bakteriyel lipopeptitler genellikle TLR2'yi, TLR6 katılımını gerektirmeden, tanır. (TLRler işbirliği içerisinde çalışarak çeşitli tetikleyicilerin spesifik olarak tanınmasını sağlar ve TLR2 artı TLR6 birlikte peptidoglikanları tanırken TLR2, TLR6 olmaksızın lipopeptitleri tanır.) Bunlar bazen doğal lipopeptitler ve sentetik lipopeptitler şeklinde sınıflandırılır. Sentetik lipopeptitler, benzer

şekilde davranma eğilimi gösterir ve birincil olarak TLR2 taraından tanınır.

Adjuvanlar olarak kullanıma uygun lipopeptitler arasında şu formüle sahip bileşikler:



Burada * etiketli şiral merkez ve * * * etiketli olanın her ikisi de R konfigürasyonundadır;

** etiketli şiral merkez, R veya S konfigürasyonundadır;

her bir R^{1a} ve R^{1b}, birbirinden bağımsız olarak, 7-21 karbon atomuna sahip, isteğe bağlı olarak oksijen fonksiyonları ile ikame edilmiş bir alifatik veya sikloalifatik-alifatik hidrokarbon grubudur veya R^{1a} ve R^{1b}'den biri, H'dir, ikisi de değil;

R^2, 1-21 karbon atomuna sahip ve oksijen fonksiyonlarıyla isteğe bağlı olarak ikame edilmiş bir alifatik veya sikloalifatik hidrokarbon grubudur;

n, 0 veya 1'dir;

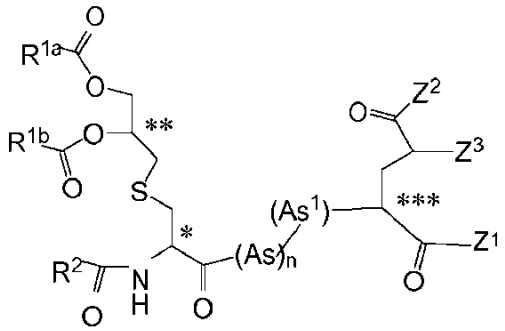
As, -O-Kw-CO- yada -NH-Kw-CO-'yu temsil eder ki burada Kw,, 1-12 karbon atomuna sahip bir alifatik hidrokarbon grubudur;

As^1, bir D- veya L-alfa-amino asittir;

Z^1 ve Z^2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, -OH veya D- ve L-alfa aminokarboksilik asitler ve amino-alt alkil-sülfonik asitler arasından seçilen 6 kadar amino aside sahip bir amino-(alt alkan)-

şekilde davranma eğilimi gösterir ve birincil olarak TLR2 taraından tanınır.

Adjuvanlar olarak kullanıma uygun lipopeptitler arasında şu formüle sahip bileşikler:



Burada * etiketli şiral merkez ve * * * etiketli olanın her ikisi de R konfigürasyonundadır;

** etiketli şiral merkez, R veya S konfigürasyonundadır;

her bir R^{1a} ve R^{1b}, birbirinden bağımsız olarak, 7-21 karbon atomuna sahip, isteğe bağlı olarak oksijen fonksiyonları ile ikame edilmiş bir alifatik veya sikloalifatik-alifatik hidrokarbon grubudur veya R^{1a} ve R^{1b}'den biri, H'dir, ikisi de değil;

R^2, 1-21 karbon atomuna sahip ve oksijen fonksiyonlarıyla isteğe bağlı olarak ikame edilmiş bir alifatik veya sikloalifatik hidrokarbon grubudur;

n, 0 veya 1'dir;

As, -O-Kw-CO- yada -NH-Kw-CO-'yu temsil eder ki burada Kw,, 1-12 karbon atomuna sahip bir alifatik hidrokarbon grubudur;

As^1, bir D- veya L-alfa-amino asittir;

Z^1 ve Z^2'den her biri, birbirinden bağımsız olarak, -OH veya D- ve L-alfa aminokarboksilik asitler ve amino-alt alkil-sülfonik asitler arasından seçilen 6 kadar amino aside sahip bir amino-(alt alkan)-

sülfonik asidin veya bir peptidin bir D- veya L-alfa amino asidinin N-terminal radikalini temsil eder; ve

Z^3, H veya -CO-Z^4'tür ki burada Z^4, -OH veya D- ve L-alfa aminokarboksilik asitler ve amino-alt alkil-sülfonik asitler arasından seçilen 6 kadar amino aside sahip bir amino-(alt alkan)-sülfonik asidin veya bir peptidin bir D- veya L-alfa amino asidinin N-terminal radikalidir; veya bu tür bileşiklerin bir esteri veya karboksilik asidinden oluşturulan amid yer alır. Uygun amidler araısnda -NH_2 ve NH(alt alkil) yer alır ve uygun esterler arasında C1-C4 alkil esterler, (burada kullanıldığı gibi alt akil veya alt alkan, C_1- C_6 düz zincirli veya dallı alkillerine karşılık gelir) yer alır.

Bu tür bileşikler, US 4,666,886'da daha detaylı olarak tarif edilir. Bir özel düzenekte lipopeptit, şu formüle sahiptir:

Bir lipopeptit türünün bir başka örneği, LP40 adıyla bilinir ve bir TLR2 agonistidir. Akdis ve arkadaşları, Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003).

Bunlar, murein lipoproteinleri olarak anılan, *E. Coli'den*'den bilinen bir lipopeptit sınıfı ile ilgilidir. Murein lipopeptitleri adıyla bilinen bu proteinlerin belirli kısmi bozunma ürünleri, Hantke ve arkadaşları,

sülfonik asidin veya bir peptidin bir D- veya L-alfa amino asidinin N-terminal radikalini temsil eder; ve

Z^3, H veya -CO-Z^4'tür ki burada Z^4, -OH veya D- ve L-alfa aminokarboksilik asitler ve amino-alt alkil-sülfonik asitler arasından seçilen 6 kadar amino aside sahip bir amino-(alt alkan)-sülfonik asidin veya bir peptidin bir D- veya L-alfa amino asidinin N-terminal radikalidir; veya bu tür bileşiklerin bir esteri veya karboksilik asidinden oluşturulan amid yer alır. Uygun amidler araısnda -NH_2 ve NH(alt alkil) yer alır ve uygun esterler arasında C1-C4 alkil esterler, (burada kullanıldığı gibi alt akil veya alt alkan, C_1- C_6 düz zincirli veya dallı alkillerine karşılık gelir) yer alır.

Bu tür bileşikler, US 4,666,886'da daha detaylı olarak tarif edilir. Bir özel düzenekte lipopeptit, şu formüle sahiptir:

Bir lipopeptit türünün bir başka örneği, LP40 adıyla bilinir ve bir TLR2 agonistidir. Akdis ve arkadaşları, Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003).

Bunlar, murein lipoproteinleri olarak anılan, *E. Coli'den*'den bilinen bir lipopeptit sınıfı ile ilgilidir. Murein lipopeptitleri adıyla bilinen bu proteinlerin belirli kısmi bozunma ürünleri, Hantke ve arkadaşları,

Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973)'te tarif edilir. Bunlar, N-asetil muramik aside bağlı bir peptit içerir ve bu yüzden Baschang ve arkadaşları, Tetrahedron, 45(20): 6331-6360 (1989)'te tarif edilen Muramil peptitler ile ilgilidir.

Alüminyum tuzu adjuvanları

"Alüminyum hidroksit" ve "alüminyum fosfat" olarak bilinen adjuvanlar kullanılabilir. Bu isimler gelenekseldir ancak herhangi biri, mevcut olan gerçek kimyasal bileşiğin kesin bir tarifi olmadığından sadece uygunluk açısından kullanılır *(örn.,* bakınız bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Buluş, genel olarak adjuvanlar olarak kullanılan "hidroksit" veya "fosfat" adjuvanlarından herhangi birini kullanabilir.

"Alüminyum hidroksit" olarak bilinen adjuvanlar tipik olarak alüminyum oksihidroksit tuzlarıdır ki bunlar genellikle en azından kısmen kristaldir. AlO(OH) formülü ile temsil edilebilen alüminyum oksihidroksit, alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ gibi diğer alüminyum bileşiklerinden, kızılötesi (IR) spektroskopisi yoluyla, özellikle $1070cm^{-1}$'de bir adsorpsiyon bandı ve $3090\text{-}3100cm^{-1}$'de kuvvetli bir tespit parçası varlığıyla ayırt edilebilir (bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Bir alüminyum hidroksit adjuvanının kristallik derecesi, yarı yükseklikte difraksiyon bandı genişliğiyle (WHH) yansıtılır; burada kristalliği zayıf partiküller, kristalit ebatlarının daha küçük olmasından ötürü daha fazla çizgi

Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973)'te tarif edilir. Bunlar, N-asetil muramik aside bağlı bir peptit içerir ve bu yüzden Baschang ve arkadaşları, Tetrahedron, 45(20): 6331-6360 (1989)'te tarif edilen Muramil peptitler ile ilgilidir.

Alüminyum tuzu adjuvanları

"Alüminyum hidroksit" ve "alüminyum fosfat" olarak bilinen adjuvanlar kullanılabilir. Bu isimler gelenekseldir ancak herhangi biri, mevcut olan gerçek kimyasal bileşiğin kesin bir tarifi olmadığından sadece uygunluk açısından kullanılır *(örn.,* bakınız bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Buluş, genel olarak adjuvanlar olarak kullanılan "hidroksit" veya "fosfat" adjuvanlarından herhangi birini kullanabilir.

"Alüminyum hidroksit" olarak bilinen adjuvanlar tipik olarak alüminyum oksihidroksit tuzlarıdır ki bunlar genellikle en azından kısmen kristaldir. AlO(OH) formülü ile temsil edilebilen alüminyum oksihidroksit, alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ gibi diğer alüminyum bileşiklerinden, kızılötesi (IR) spektroskopisi yoluyla, özellikle $1070cm^{-1}$'de bir adsorpsiyon bandı ve $3090\text{-}3100cm^{-1}$'de kuvvetli bir tespit parçası varlığıyla ayırt edilebilir (bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Bir alüminyum hidroksit adjuvanının kristallik derecesi, yarı yükseklikte difraksiyon bandı genişliğiyle (WHH) yansıtılır; burada kristalliği zayıf partiküller, kristalit ebatlarının daha küçük olmasından ötürü daha fazla çizgi

genişlemesi gösterir. WHH arttıkça yüzey alanı da artar ve WHH değerleri daha yüksek olan adjuvanların, antijen adsorbsiyon kapasitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bir fibröz morfoloji (örn., transmisyon elektron mikrograflarında görüldüğü gibi), alüminyum hidroksit adjuvanları için tipiktir. Alüminyum hidroksit adjuvanlarının pI'sı tipik olarak yaklaşık 11'dir, *yani* adjuvanın kendisi, fizyolojik pH'de bir pozitif yüzey yüküne sahiptir. Alüminyum hidroksit adjuvanları için pH 7.4'te her bir mg Al^{+++} başına 1.8-2.6 mg proteinlik adsorptif kapasiteler bildirilmiştir.

"Alüminyum fosfat" olarak bilinen adjuvanlar tipik olarak sıklıkla az miktarda sülfat da ihtiva eden alüminyum hidroksifosfatlardır (*yani* alüminyum hidroksifosfat sülfat). Bunlar, çökeltme yoluyla elde edilebilir ve çökeltme sırasındaki reaksiyon koşulları ve konsantrasyonlar, tuz içinde hidroksil yerine fosfat koyma derecesini etkiler. Hidroksifosfatların molar PO_4/Al oranı genelde 0,3 ile 1,2 arasındadır. Hidroksifosfatlar, mutlak $AlPO_4$'ten, hidroksil gruplarının varlığıyla ayırt edilebilir. Örneğin $3164cm^{-1}$'de bir IR spektrum bandı (*örn.*, 200°C'ye ısıtıldığı durumda), yapısal hidroksillerin varlığını işaret eder (bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X))

Bir alüminyum fosfat adjuvanının PO_4/Al^{3+} molar oranı genellikle 0.3 ile 1.2 arasında, tercihen 0.8 ile 1.2 araısnda ve daha tercihen 0.95+0.1'dir. Alüminyum fosfatlar, özellikle hidroksifosfat tuzları genellikle amorf olacaktır. Tipik bir adjuvan, molar PO_4/Al oranı 0,84 ile 0,92 arasında olan, ml başına 0.6 mg Al^{3+} dahil edilmiş bir amorf

genişlemesi gösterir. WHH arttıkça yüzey alanı da artar ve WHH değerleri daha yüksek olan adjuvanların, antijen adsorbsiyon kapasitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bir fibröz morfoloji (örn., transmisyon elektron mikrograflarında görüldüğü gibi), alüminyum hidroksit adjuvanları için tipiktir. Alüminyum hidroksit adjuvanlarının pI'sı tipik olarak yaklaşık 11'dir, *yani* adjuvanın kendisi, fizyolojik pH'de bir pozitif yüzey yüküne sahiptir. Alüminyum hidroksit adjuvanları için pH 7.4'te her bir mg Al^{+++} başına 1.8-2.6 mg proteinlik adsorptif kapasiteler bildirilmiştir.

"Alüminyum fosfat" olarak bilinen adjuvanlar tipik olarak sıklıkla az miktarda sülfat da ihtiva eden alüminyum hidroksifosfatlardır (*yani* alüminyum hidroksifosfat sülfat). Bunlar, çökeltme yoluyla elde edilebilir ve çökeltme sırasındaki reaksiyon koşulları ve konsantrasyonlar, tuz içinde hidroksil yerine fosfat koyma derecesini etkiler. Hidroksifosfatların molar PO_4/Al oranı genelde 0,3 ile 1,2 arasındadır. Hidroksifosfatlar, mutlak $AlPO_4$'ten, hidroksil gruplarının varlığıyla ayırt edilebilir. Örneğin $3164cm^{-1}$'de bir IR spektrum bandı (*örn.*, 200°C'ye ısıtıldığı durumda), yapısal hidroksillerin varlığını işaret eder (bölüm 9, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X))

Bir alüminyum fosfat adjuvanının PO_4/Al^{3+} molar oranı genellikle 0.3 ile 1.2 arasında, tercihen 0.8 ile 1.2 araısnda ve daha tercihen 0.95+0.1'dir. Alüminyum fosfatlar, özellikle hidroksifosfat tuzları genellikle amorf olacaktır. Tipik bir adjuvan, molar PO_4/Al oranı 0,84 ile 0,92 arasında olan, ml başına 0.6 mg Al^{3+} dahil edilmiş bir amorf

alüminyum hidroksifosfattır. Alüminyum fosfat genellikle partikülat (*örn.*, transmisyon elektron mikrograflarında görüldüğü gibi plaka benzeri morfoloji) olacaktır. Partiküllerin tipik çapları, herhangi bir antijen adsorpsiyonundan sonra 0.5-20μm aralığındadır (*örn.*, yaklaşık 5-10μm). Alüminyum fosfat adjuvanları için pH 7.4'te her bir mg Al^{+++} başına 0.7-1.5 mg proteinlik adsorptif kapasiteler bildirilmiştir.

Alüminyum fosfatın sıfır yük noktası (PZC), hidroksil yerine forsfat koyma derecesi ile ters orantılıdır ve bu ikame derecesi, çökeltme yoluyla tuz hazırlamak için kullanılan reaksiyon koşullarına ve reaktanların konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. PZC ayrıca çözelti halindeki serbest fosfat iyonlarının konsantrasyonunun değiştirilmesiyle (daha fazla fosfat=daha fazla asidik PZC) veya bir histidin tamponu gibi bir tampon ilave edilmesiyle (PZC'yi daha bazik yapar) de değiştirilir. Buluşa göre kullanılan alüminyum fosfatların PZC'si genellikle 4.0 ile 7.0 arasında, daha tercihen 5.0 ile 6.5 arasında, *örn.*, yaklaşık olarak 5.7 olacaktır.

Buluşa ait kompozisyonları hazırlamak için kullanılan alüminyum tuzlarının süspansiyonları, bir tampon (*örn.*, bir fosfat veya bir histidin veya bir Tris tamponu) ihtiva edebilir ancak bu her zaman şart değildir. Süspansiyonlar tercihen sterildir ve pirojen içermez. Bir süspansiyon, *örn.*, 1.0 ile 20 mM araısnda, tercihen 5 ile 15 mM arasında ve daha tercihen yaklaşık 10 mM'lik bir konsantrasyonda mevcut olan serbest sulu fosfat iyonları içerebilir. Süspansiyonlar ayrıca sodyum klorür de içerebilir.

alüminyum hidroksifosfattır. Alüminyum fosfat genellikle partikülat (*örn.*, transmisyon elektron mikrograflarında görüldüğü gibi plaka benzeri morfoloji) olacaktır. Partiküllerin tipik çapları, herhangi bir antijen adsorpsiyonundan sonra 0.5-20μm aralığındadır (*örn.*, yaklaşık 5-10μm). Alüminyum fosfat adjuvanları için pH 7.4'te her bir mg Al^{+++} başına 0.7-1.5 mg proteinlik adsorptif kapasiteler bildirilmiştir.

Alüminyum fosfatın sıfır yük noktası (PZC), hidroksil yerine forsfat koyma derecesi ile ters orantılıdır ve bu ikame derecesi, çökeltme yoluyla tuz hazırlamak için kullanılan reaksiyon koşullarına ve reaktanların konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. PZC ayrıca çözelti halindeki serbest fosfat iyonlarının konsantrasyonunun değiştirilmesiyle (daha fazla fosfat=daha fazla asidik PZC) veya bir histidin tamponu gibi bir tampon ilave edilmesiyle (PZC'yi daha bazik yapar) de değiştirilir. Buluşa göre kullanılan alüminyum fosfatların PZC'si genellikle 4.0 ile 7.0 arasında, daha tercihen 5.0 ile 6.5 arasında, *örn.*, yaklaşık olarak 5.7 olacaktır.

Buluşa ait kompozisyonları hazırlamak için kullanılan alüminyum tuzlarının süspansiyonları, bir tampon (*örn.*, bir fosfat veya bir histidin veya bir Tris tamponu) ihtiva edebilir ancak bu her zaman şart değildir. Süspansiyonlar tercihen sterildir ve pirojen içermez. Bir süspansiyon, *örn.*, 1.0 ile 20 mM araısnda, tercihen 5 ile 15 mM arasında ve daha tercihen yaklaşık 10 mM'lik bir konsantrasyonda mevcut olan serbest sulu fosfat iyonları içerebilir. Süspansiyonlar ayrıca sodyum klorür de içerebilir.

Buluş, hem bir alüminyum hidroksit hem de bir alüminyum fosfat içeren bir karışım kullanabilir. Bu durumda alüminyum fosfat, hidroksitten fazla, *örn.*, en azından 2:1 *örn..,* >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, *vb.* ağırlık oranında olabilir.

Bir hastaya uygulanma amaçlı bir kompozisyon içinde Al^{+++} konsantrasyonu tercihen 10mg/ml'nin altında, *örn.,* <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, *vb.*'dir. Bir tercih edilen aralık, 0.3 ile 1mg/ml arasındadır. Doz başına 0.85mg'lik bir maksimum tercih edilir.

Bir veya daha fazla alüminyum tuzu adjuvanları içermesinin yanı sıra adjuvan bileşeni, bir veya daha fazla adjuvan veya immüno-uyarıcı ajan da içerebilir. Bu tür ilave bileşenler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, bir benzonaftiridin bileşiği, bir 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A adjuvanı ('3d-MPL'); ve/veya bir su içinde yağ emülsiyonu yer alır. 3d-MPL ayrıca 3 de-O-asile edilmiş monofosforil lipit A olarak veya 3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A olarak da anılmaktadır. Bu isim, monofosforil lipit A'da indirgeyici uç glukosamininin 3üncü pozisyonunun deasile edilmiş olduğunu işaret eder. Bu, *Salmonella minnesota*'nın bir heptoseless mutantından hazırlanmıştır ve lipit A'ya kimyasal olarak benzer olmakla birlikte bir asitle değişken fosforil grubundan ve bir bazla değişken asil grubundan yoksundur. Monosit/makrofaj soyundan hücreleri aktifleştirir ve IL-1, IL-12, TNF-α ve GM-CSF dahil olmak üzere birkaç sitokinin salımını uyarır. 3d-MPL'nin preparasyonu orijinal olarak İngiltere patent başvurusu GB-A-22202 11'de tarif edildi ve ürün, Corixa Corporation tarafından MPL (TM) adıyla üretilmekte ve

Buluş, hem bir alüminyum hidroksit hem de bir alüminyum fosfat içeren bir karışım kullanabilir. Bu durumda alüminyum fosfat, hidroksitten fazla, *örn.*, en azından 2:1 *örn..,* >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, *vb.* ağırlık oranında olabilir.

Bir hastaya uygulanma amaçlı bir kompozisyon içinde Al^{+++} konsantrasyonu tercihen 10mg/ml'nin altında, *örn.,* <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, *vb.*'dir. Bir tercih edilen aralık, 0.3 ile 1mg/ml arasındadır. Doz başına 0.85mg'lik bir maksimum tercih edilir.

Bir veya daha fazla alüminyum tuzu adjuvanları içermesinin yanı sıra adjuvan bileşeni, bir veya daha fazla adjuvan veya immüno-uyarıcı ajan da içerebilir. Bu tür ilave bileşenler arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, bir benzonaftiridin bileşiği, bir 3-O-deasile edilmiş monofosforil lipit A adjuvanı ('3d-MPL'); ve/veya bir su içinde yağ emülsiyonu yer alır. 3d-MPL ayrıca 3 de-O-asile edilmiş monofosforil lipit A olarak veya 3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A olarak da anılmaktadır. Bu isim, monofosforil lipit A'da indirgeyici uç glukosamininin 3üncü pozisyonunun deasile edilmiş olduğunu işaret eder. Bu, *Salmonella minnesota*'nın bir heptoseless mutantından hazırlanmıştır ve lipit A'ya kimyasal olarak benzer olmakla birlikte bir asitle değişken fosforil grubundan ve bir bazla değişken asil grubundan yoksundur. Monosit/makrofaj soyundan hücreleri aktifleştirir ve IL-1, IL-12, TNF-α ve GM-CSF dahil olmak üzere birkaç sitokinin salımını uyarır. 3d-MPL'nin preparasyonu orijinal olarak İngiltere patent başvurusu GB-A-22202 11'de tarif edildi ve ürün, Corixa Corporation tarafından MPL (TM) adıyla üretilmekte ve

satılmaktadır. Diğer detaylar, Myers ve arkadaşları (1990) sayfa 145-156, Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Bölüm 16 (sayfa 273-282), Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson ve arkadaşları (1999) J Med Chem 42:4640-9; ve Baldrick ve arkadaşları (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413'te bulunabilir.

Bir alüminyum hidroksit ve/veya alüminyum fosfat adjuvanı kullanılması, özellikle çocuklarda faydalıdır ve antijenler genellikle bu tuzlara adsorbe edilir. Özellikle yaşlılarda su içinde skualen emülsiyonları da tercih edilir. Faydalı adjuvan kombinasyonları arasında CpG ve alum veya resikimod ve alum gibi, Th1 ve Th2 adjuvanlarının kombinasyonları yer alır. Alüminyum fosfatın 3dMPL ile bir kombinasyonu kullanılabilir. Kullanılabilen diğer kombinasyonlar arasında şunlar bulunur: alum ve bir benzonaftiridin bileşiği veya bir SMIP, bir su içinde skualen emülsiyonu (örn., MF59) ve bir benzonaftiridin bileşiği veya bir SMIP ve E6020 ve bir su içinde skualen emülsiyonu, örn., MF59) veya alum.

Buluşa ait kompozisyonlar, hem bir hücre aracılı immün yanıt hem de bir hümoral immün yanıt ortaya çıkarabilir.

Hücre aracılı immünitenin ve hümoral immünitenin başlatılması ve/veya güçlendirilmesi için genellikle CD4 ve CD8 hücreleri olmak üzere iki tip T hücresine gerek olduğu düşünülür. CD8 T hücreleri, bir CD8 ortak reseptörünü eksprese edebilir ve yaygın şekilde Sitotoksik T lenfositleri (CTLler) olarak anılır. CD8 T hücreleri, MHC Sınıf I

satılmaktadır. Diğer detaylar, Myers ve arkadaşları (1990) sayfa 145-156, Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) Bölüm 16 (sayfa 273-282), Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Cilt 42, Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson ve arkadaşları (1999) J Med Chem 42:4640-9; ve Baldrick ve arkadaşları (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413'te bulunabilir.

Bir alüminyum hidroksit ve/veya alüminyum fosfat adjuvanı kullanılması, özellikle çocuklarda faydalıdır ve antijenler genellikle bu tuzlara adsorbe edilir. Özellikle yaşlılarda su içinde skualen emülsiyonları da tercih edilir. Faydalı adjuvan kombinasyonları arasında CpG ve alum veya resikimod ve alum gibi, Th1 ve Th2 adjuvanlarının kombinasyonları yer alır. Alüminyum fosfatın 3dMPL ile bir kombinasyonu kullanılabilir. Kullanılabilen diğer kombinasyonlar arasında şunlar bulunur: alum ve bir benzonaftiridin bileşiği veya bir SMIP, bir su içinde skualen emülsiyonu (örn., MF59) ve bir benzonaftiridin bileşiği veya bir SMIP ve E6020 ve bir su içinde skualen emülsiyonu, örn., MF59) veya alum.

Buluşa ait kompozisyonlar, hem bir hücre aracılı immün yanıt hem de bir hümoral immün yanıt ortaya çıkarabilir.

Hücre aracılı immünitenin ve hümoral immünitenin başlatılması ve/veya güçlendirilmesi için genellikle CD4 ve CD8 hücreleri olmak üzere iki tip T hücresine gerek olduğu düşünülür. CD8 T hücreleri, bir CD8 ortak reseptörünü eksprese edebilir ve yaygın şekilde Sitotoksik T lenfositleri (CTLler) olarak anılır. CD8 T hücreleri, MHC Sınıf I

moleküller üzerinde gösterilen antijenleri tanıyabilir veya bunlarla etkileşime girebilir.

CD4 T hücreleri, bir CD4 ortak reseptörünü eksprese edebilir ve yaygın şekilde T yardımcı hücreleri olarak anılır. CD4 T hücreleri, MHC Sınıf II moleküllerine bağlanan antijenik peptitleri tanıyabilir. Bir MHC sınıf II molekülü ile etkileşime girmesi üzerine CD4 hücreleri, sitokinler gibi faktörleri sekrete edebilir. Bu sekrete edilen sitokinler, B hücrelerini, sitotoksik T hücrelerini, makrofajları ve bir immün yanıta katılan diğer hücreleri aktifleştirebilir. Yardımcı T hücreleri veya CD4+ hücreleri ayrıca fonksiyonel açıdan farklı iki alt gruba da ayrılabilir: sitokinleri ve efektör fonksiyonları bakımından farklılık gösteren TH1 fenotipi ve TH2 fenotipi.

Aktifleşmiş TH1 hücreleri, hücresel immüniteyi güçlendirir (antijene özel CTL üretiminde bir artış dahil olmak üzere) ve bu yüzden hücre içi enfeksiyonlara tepki vermede özel bir değer taşır. Aktifleşmiş TH1 hücreleri, IL-2, IFN-γ ve TNF-β'dan birini veya daha fazlasını sekrete edebilir. Bir TH1 immün yanıtı, makrofajları, NK (doğal katil hücreler) hücreleri ve CD8 sitotoksik T hücrelerini (CTLler) aktifleştirmek suretiyle lokal enflamatuar reaksiyonlara yol açabilir. Bir TH1 immün yanıtı ayrıca B ve T hücrelerinin büyümesini IL-12 ile uyarmak suretiyle immün yanıtı arttırma görevi de görebilir. TH1'in uyardığı B hücreleri, lgG2a sekrete edebilir.

Bir TH1 immün yanıtı, CTLlerde bir artış, bir TH1 immün yanıtı ile ilişkili sitokinlerden biri veya daha fazlasında (örn., IL-2, IFN-γ ve TNF-β) bir artış, aktifleşmiş makrofajlarda bir artış, NK aktivitesinde

moleküller üzerinde gösterilen antijenleri tanıyabilir veya bunlarla etkileşime girebilir.

CD4 T hücreleri, bir CD4 ortak reseptörünü eksprese edebilir ve yaygın şekilde T yardımcı hücreleri olarak anılır. CD4 T hücreleri, MHC Sınıf II moleküllerine bağlanan antijenik peptitleri tanıyabilir. Bir MHC sınıf II molekülü ile etkileşime girmesi üzerine CD4 hücreleri, sitokinler gibi faktörleri sekrete edebilir. Bu sekrete edilen sitokinler, B hücrelerini, sitotoksik T hücrelerini, makrofajları ve bir immün yanıta katılan diğer hücreleri aktifleştirebilir. Yardımcı T hücreleri veya CD4+ hücreleri ayrıca fonksiyonel açıdan farklı iki alt gruba da ayrılabilir: sitokinleri ve efektör fonksiyonları bakımından farklılık gösteren TH1 fenotipi ve TH2 fenotipi.

Aktifleşmiş TH1 hücreleri, hücresel immüniteyi güçlendirir (antijene özel CTL üretiminde bir artış dahil olmak üzere) ve bu yüzden hücre içi enfeksiyonlara tepki vermede özel bir değer taşır. Aktifleşmiş TH1 hücreleri, IL-2, IFN-γ ve TNF-β'dan birini veya daha fazlasını sekrete edebilir. Bir TH1 immün yanıtı, makrofajları, NK (doğal katil hücreler) hücreleri ve CD8 sitotoksik T hücrelerini (CTLler) aktifleştirmek suretiyle lokal enflamatuar reaksiyonlara yol açabilir. Bir TH1 immün yanıtı ayrıca B ve T hücrelerinin büyümesini IL-12 ile uyarmak suretiyle immün yanıtı arttırma görevi de görebilir. TH1'in uyardığı B hücreleri, lgG2a sekrete edebilir.

Bir TH1 immün yanıtı, CTLlerde bir artış, bir TH1 immün yanıtı ile ilişkili sitokinlerden biri veya daha fazlasında (örn., IL-2, IFN-γ ve TNF-β) bir artış, aktifleşmiş makrofajlarda bir artış, NK aktivitesinde

bir artış veya IgG2a üretiminde bir artıştan birini veya daha fazlasını içerebilir. Tercihen güçlenmiş TH1 immün yanıtı, IgG2a üretiminde bir artışı kapsayacaktır.

Bir TH1 immün yanıtı, bir TH1 adjuvanı kullanılarak ortaya çıkartabilir. Bir TH1 adjuvanı genellikle adjuvansız antijen immünizasyonuna göre artmış seviyelerde IgG2a üretimi ortaya çıkaracaktır. Buluşta kullanım için uygun TH1 adjuvanları arasında örneğin saponin formülasyonları, virozomlar ve virüs benzeri partiküller, enterobakteriyel lipopolisakaridin (LPS) toksik olmayan türevleri, immüno-uyarıcı oligonükleotitler yer alabilir. İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler, örn., bir CpG motifi ihtiva eden oligonükleotitler, buluşta kullanım için tercih edilen TH1 adjuvanlarıdır.

Artan immün yanıt, bir sistemik ve bir mukozal bir immün yanıttan biri veya her ikisi de olabilir. Tercihen immün yanıt, bir artmış sistemik ve bir artmış mukozal immün yanıttan birini veya her ikisini de sağlar.

Tedavi, kullanım ve uygulama yöntemleri

Burada açıklanan kompozisyonlar, bir gebe kadında ve/veya bebekte bir immün yanıt indüklenmesine yönelik olup, gebe kadına ve/veya bebeğe, bir kompozisyon (örn., bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon) uygulanması adımını içeren bir yöntemde gebe kadınlara ve bebeklere uygulanmak için uygundur. Kompozisyonlar (örn., bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon), bir gebe

bir artış veya IgG2a üretiminde bir artıştan birini veya daha fazlasını içerebilir. Tercihen güçlenmiş TH1 immün yanıtı, IgG2a üretiminde bir artışı kapsayacaktır.

Bir TH1 immün yanıtı, bir TH1 adjuvanı kullanılarak ortaya çıkartabilir. Bir TH1 adjuvanı genellikle adjuvansız antijen immünizasyonuna göre artmış seviyelerde IgG2a üretimi ortaya çıkaracaktır. Buluşta kullanım için uygun TH1 adjuvanları arasında örneğin saponin formülasyonları, virozomlar ve virüs benzeri partiküller, enterobakteriyel lipopolisakaridin (LPS) toksik olmayan türevleri, immüno-uyarıcı oligonükleotitler yer alabilir. İmmüno-uyarıcı oligonükleotitler, örn., bir CpG motifi ihtiva eden oligonükleotitler, buluşta kullanım için tercih edilen TH1 adjuvanlarıdır.

Artan immün yanıt, bir sistemik ve bir mukozal bir immün yanıttan biri veya her ikisi de olabilir. Tercihen immün yanıt, bir artmış sistemik ve bir artmış mukozal immün yanıttan birini veya her ikisini de sağlar.

Tedavi, kullanım ve uygulama yöntemleri

Burada açıklanan kompozisyonlar, bir gebe kadında ve/veya bebekte bir immün yanıt indüklenmesine yönelik olup, gebe kadına ve/veya bebeğe, bir kompozisyon (örn., bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon) uygulanması adımını içeren bir yöntemde gebe kadınlara ve bebeklere uygulanmak için uygundur. Kompozisyonlar (örn., bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon), bir gebe

kadının ve/veya bir bebeğin immünize edilmesine yönelik bir aşı formülasyonu üretmek için kullanılabilir. Örneğin İmmün yanıt, bir saflaştırılmış RSV F proteini, bir alfavirüsü replikon partikülü veya kendi kendini kopyalayan RNA'nın uygulanmasını takiben yükselebilir.

Buluş ayrıca örn., bir hastanın RSV enfeksiyonuna karşı immünize edilmesinde kullanılma amaçlı bir ilaç olarak kullanım için olan buluşa ait bir kompozisyon da sağlar.

Ayrıca bir bebekte, (a) bir kadına hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlanmasında kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir.

Ayrıca bir gebe kadında, (a) kadına bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle bir immün yanıtın yükseltilmesinde kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir.

Ayrıca bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlanmasında kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir ki burada bebek, bir kadının bebeğe

kadının ve/veya bir bebeğin immünize edilmesine yönelik bir aşı formülasyonu üretmek için kullanılabilir. Örneğin İmmün yanıt, bir saflaştırılmış RSV F proteini, bir alfavirüsü replikon partikülü veya kendi kendini kopyalayan RNA'nın uygulanmasını takiben yükselebilir.

Buluş ayrıca örn., bir hastanın RSV enfeksiyonuna karşı immünize edilmesinde kullanılma amaçlı bir ilaç olarak kullanım için olan buluşa ait bir kompozisyon da sağlar.

Ayrıca bir bebekte, (a) bir kadına hamilelik sırasında bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlanmasında kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir.

Ayrıca bir gebe kadında, (a) kadına bir birinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını ve (b) hamilelikten doğan bebeğe bir ikinci anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanmasını kapsayan bir yöntemle bir immün yanıtın yükseltilmesinde kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir.

Ayrıca bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlanmasında kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir ki burada bebek, bir kadının bebeğe

hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun uygulandığı kadından doğdu.

Ayrıca bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamada kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir ki burada bebek, RSV'ye karşı maternal antikorlar taşır.

Bebekte RSV'ye karşı maternal antikorlar olduğu, uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. Örneğin bebeğin immün sistemi olgunlaşmamış olduğundan doğumu takip eden ilk haftalarda ve aylarda (örn., doğumdan itibaren yaklaşık 2 veya 3 veya 4 aya kadar) bebekte mevcut olan anti-RSV antikorları, özellikle IgG antikorları, maternal antikorlardır. Maternal antikorların patojen antijenlerini bağlayıp bağlamadığını belirlemeye yönelik birçok yöntem, bu konuda iyi bilinir. Bakınız, örneğin Pappaioanou M ve arkadaşları, Accurate Detection of Maternal Antibodies to HIV in Newborn Whole Blood Dried on Filter Paper, AIDS 7(4):483-488 (1993) ve Pinon J.M. ve arkadaşları, Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobin G, M, and A Antibodies, J. Clin. Microbiol. 39(6):2267-2271 (2001).

Ayrıca yukarıda tarif edildiği gibi bir polipeptidin, bir hastada bir immün yanıt ortaya çıkarmaya yönelik bir ilaç üretiminde kullanılması da tarif edilir.

hamile olduğu sırada bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun uygulandığı kadından doğdu.

Ayrıca bir bebekte RSV'ye karşı koruyucu immünite sağlamada kullanılma amaçlı bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon da tarif edilir ki burada bebek, RSV'ye karşı maternal antikorlar taşır.

Bebekte RSV'ye karşı maternal antikorlar olduğu, uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. Örneğin bebeğin immün sistemi olgunlaşmamış olduğundan doğumu takip eden ilk haftalarda ve aylarda (örn., doğumdan itibaren yaklaşık 2 veya 3 veya 4 aya kadar) bebekte mevcut olan anti-RSV antikorları, özellikle IgG antikorları, maternal antikorlardır. Maternal antikorların patojen antijenlerini bağlayıp bağlamadığını belirlemeye yönelik birçok yöntem, bu konuda iyi bilinir. Bakınız, örneğin Pappaioanou M ve arkadaşları, Accurate Detection of Maternal Antibodies to HIV in Newborn Whole Blood Dried on Filter Paper, AIDS 7(4):483-488 (1993) ve Pinon J.M. ve arkadaşları, Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobin G, M, and A Antibodies, J. Clin. Microbiol. 39(6):2267-2271 (2001).

Ayrıca yukarıda tarif edildiği gibi bir polipeptidin, bir hastada bir immün yanıt ortaya çıkarmaya yönelik bir ilaç üretiminde kullanılması da tarif edilir.

Bu yöntemlerin ve kullanımların ortaya çıkardığı immün yanıt genellikle bir antikor yanıtı, tercihen bir koruyucu antikor yanıtını kapsayacaktır. RSV aşılamasından sonraki antikor yanıtlarını değerlendirmeye yönelik yöntemler, bu konuda iyi bilinir.

Buluşa ait kompozisyonlar, birçok uygun yolla, örn., intramüsküler enjeksiyon (örn., kola veya bacağa), subkütan enjeksiyon, intranazal uygulama, oral uygulama, intradermal uygulama, transkütan uygulama, transdermal uygulama ve benzeri bir yolla uygulanabilir. Uygun uygulama yolu, gebe kadının veya bebeğin yaşına, sağlık durumuna ve başka karakteristiklerine bağlı olacaktır. Bir klinisyen, bu ve diğer faktörlere göre uygun uygulama yolunu belirleyebilecektir.

Tedavi, bir tekli doz programıyla veyabir çoklu doz programıyla yürütülebilir. Çoklu dozlar, bir primer immünizasyon programında ve/veya booster immünizasyon programında kullanılabilir. Bir çoklu doz programında çeşitli dozlar, aynı veya farklı yollarla, örn., bir parenteral prime ve mukozal boost, bir mukozal prime ve parenteral boost, vb. şeklinde verilebilir. Birden fazla doz uygulaması (tipik olarak iki doz), immünolojik açıdan naif hastalarda özellikle faydalıdır. Çoklu dozlar tipik olarak en az 1 hafta arayla (örn., yaklaşık 2 hafta, yaklaşık 3 hafta, yaklaşık 4 hafta, yaklaşık 6 hafta, yaklaşık 8 hafta, yaklaşık 10 hafta, yaklaşık 12 hafta, yaklaşık 16 hafta ve benzeri) uygulanacaktır.

Buluşa ait bir kompozisyon kullanılarak üretilen aşı formülasyonları, hastalara, başka aşılarla önemli ölçüde aynı zamanda (örn., bir sağlık

Bu yöntemlerin ve kullanımların ortaya çıkardığı immün yanıt genellikle bir antikor yanıtı, tercihen bir koruyucu antikor yanıtını kapsayacaktır. RSV aşılamasından sonraki antikor yanıtlarını değerlendirmeye yönelik yöntemler, bu konuda iyi bilinir.

Buluşa ait kompozisyonlar, birçok uygun yolla, örn., intramüsküler enjeksiyon (örn., kola veya bacağa), subkütan enjeksiyon, intranazal uygulama, oral uygulama, intradermal uygulama, transkütan uygulama, transdermal uygulama ve benzeri bir yolla uygulanabilir. Uygun uygulama yolu, gebe kadının veya bebeğin yaşına, sağlık durumuna ve başka karakteristiklerine bağlı olacaktır. Bir klinisyen, bu ve diğer faktörlere göre uygun uygulama yolunu belirleyebilecektir.

Tedavi, bir tekli doz programıyla veyabir çoklu doz programıyla yürütülebilir. Çoklu dozlar, bir primer immünizasyon programında ve/veya booster immünizasyon programında kullanılabilir. Bir çoklu doz programında çeşitli dozlar, aynı veya farklı yollarla, örn., bir parenteral prime ve mukozal boost, bir mukozal prime ve parenteral boost, vb. şeklinde verilebilir. Birden fazla doz uygulaması (tipik olarak iki doz), immünolojik açıdan naif hastalarda özellikle faydalıdır. Çoklu dozlar tipik olarak en az 1 hafta arayla (örn., yaklaşık 2 hafta, yaklaşık 3 hafta, yaklaşık 4 hafta, yaklaşık 6 hafta, yaklaşık 8 hafta, yaklaşık 10 hafta, yaklaşık 12 hafta, yaklaşık 16 hafta ve benzeri) uygulanacaktır.

Buluşa ait bir kompozisyon kullanılarak üretilen aşı formülasyonları, hastalara, başka aşılarla önemli ölçüde aynı zamanda (örn., bir sağlık

çalışanı veya aşılama merkezine aynı tıbbi danışma veya ziyaret esnasında) uygulanabilir.

ÖRNEKLER

Örnek 1.

Burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiği ve immünojenisitesi, örneğin, uygun hayvan modelleri kullanılarak değerlendirilebilir.

Bir örnekte dişi pamuk sıçanlarına, hamilelik sırasında anti-RSV antikorları üretimini indüklemek için çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanacaktır. Alternatif olarak dişi pamuk sıçanları, çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra RSV ile enfekte edilebilir ve çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilebilir, böylelikle hamilelik sırasında anti-RSV antikorları üretimi arttırılabilir. Gebe pamuk sıçanında anti-RSV antikorlarının varlığı ve titeri, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. Gebe pamuk sıçanının ürettiği antikorlar, plasentadan geçecek ve fetal dolaşım sistemine girecektir. Doğum sonrasında neonatal sıçanlar, anneleri tarafından veya bir naif pamuk sıçanı (RSV'ye veya bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyona maruz kalmamış olan) tarafından emzirilecektir. Bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünize edilmiş veya RSV ile enfekte edilmiş ve

çalışanı veya aşılama merkezine aynı tıbbi danışma veya ziyaret esnasında) uygulanabilir.

ÖRNEKLER

Örnek 1.

Burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiği ve immünojenisitesi, örneğin, uygun hayvan modelleri kullanılarak değerlendirilebilir.

Bir örnekte dişi pamuk sıçanlarına, hamilelik sırasında anti-RSV antikorları üretimini indüklemek için çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanacaktır. Alternatif olarak dişi pamuk sıçanları, çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra RSV ile enfekte edilebilir ve çiftleştirilmeden önce ve/veya çiftleştirildikten sonra bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilebilir, böylelikle hamilelik sırasında anti-RSV antikorları üretimi arttırılabilir. Gebe pamuk sıçanında anti-RSV antikorlarının varlığı ve titeri, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. Gebe pamuk sıçanının ürettiği antikorlar, plasentadan geçecek ve fetal dolaşım sistemine girecektir. Doğum sonrasında neonatal sıçanlar, anneleri tarafından veya bir naif pamuk sıçanı (RSV'ye veya bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyona maruz kalmamış olan) tarafından emzirilecektir. Bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünize edilmiş veya RSV ile enfekte edilmiş ve

bir anti-RSV indükleyici kompozisyon ile boost edilmiş olan kadınlarda bulunan ilave anti-RSV antikorları, emzirme yoluyla bebek pamuk sıçanlarına geçirilecektir. Yeni doğmuş sıçanlardan bazılarına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla kez (örn., bir prime ve ardından bir veya daha fazla boost) uygulanacaktır. Bir yeni doğana, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun iki veya daha fazla kez uygulandığı durumda kompozisyonlar, aynı veya farklı olacaktır. Bebek pamuk sıçanlarında anti-RSV antikoru seviyeleri, doğumdan sonraki çeşitli zaman noktalarında, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. İmmünizasyon rejimlerinin kazandırdığı RSV'den korunma seviyesi, bebek pamuk sıçanlarını RSV ile tehdit etmek ve bebek pamuk sıçanının akciğerlerindeki veya nazal yıkamalarındaki virüs titerini değerlendirmek veya bebek pamuk sıçanının akciğerlerinin veya nazal kavitesinin patolojisini incelemek suretiyle değerlendirilebilir. Aktif şekilde immünize edilmiş veya edilmemiş ve annelerine doğmuş veya farklı RSV antijeni maruz kalmaları (örneğin hiç, RSV enfeksiyonu, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünizasyon veya RSV enfeksiyonunu takiben bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilme) yaşamış kadınlar tarafından emzirilmiş olan bebek pamuk sıçanlarında çeşitli zaman noktalarındaki anti-RSV antikor seviyelerinin ve RSV'ye karşı korunma derecelerinin karşılaştırılması, burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiğinin ve immünojenisitesinin değerlendirilmesini sağlayacaktır. Bir başka örnekte maternal antikorun fetusa düşük verimlilikte transplasental trasfer potansiyeli, bir yetişkin pamuk sıçanından elde edilen antikor içerikli

bir anti-RSV indükleyici kompozisyon ile boost edilmiş olan kadınlarda bulunan ilave anti-RSV antikorları, emzirme yoluyla bebek pamuk sıçanlarına geçirilecektir. Yeni doğmuş sıçanlardan bazılarına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla kez (örn., bir prime ve ardından bir veya daha fazla boost) uygulanacaktır. Bir yeni doğana, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun iki veya daha fazla kez uygulandığı durumda kompozisyonlar, aynı veya farklı olacaktır. Bebek pamuk sıçanlarında anti-RSV antikoru seviyeleri, doğumdan sonraki çeşitli zaman noktalarında, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. İmmünizasyon rejimlerinin kazandırdığı RSV'den korunma seviyesi, bebek pamuk sıçanlarını RSV ile tehdit etmek ve bebek pamuk sıçanının akciğerlerindeki veya nazal yıkamalarındaki virüs titerini değerlendirmek veya bebek pamuk sıçanının akciğerlerinin veya nazal kavitesinin patolojisini incelemek suretiyle değerlendirilebilir. Aktif şekilde immünize edilmiş veya edilmemiş ve annelerine doğmuş veya farklı RSV antijeni maruz kalmaları (örneğin hiç, RSV enfeksiyonu, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünizasyon veya RSV enfeksiyonunu takiben bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilme) yaşamış kadınlar tarafından emzirilmiş olan bebek pamuk sıçanlarında çeşitli zaman noktalarındaki anti-RSV antikor seviyelerinin ve RSV'ye karşı korunma derecelerinin karşılaştırılması, burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiğinin ve immünojenisitesinin değerlendirilmesini sağlayacaktır. Bir başka örnekte maternal antikorun fetusa düşük verimlilikte transplasental trasfer potansiyeli, bir yetişkin pamuk sıçanından elde edilen antikor içerikli

preparasyonları elle transfer etmek suretiyle ele alınır. Bir yetişkin pamuk sıçanına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanarak anti-RSV antikorları üretilmesi indüklenecektir veya bu, RSV ile enfekte edilebilir ve bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilebilir. Anti-RSV antikorları (veya antikorlar ihtiva eden serum), pamuk sıçanından elde edilecek ve naif pamuk sıçanlarına (yeni doğmuş veya genç pamuk sıçanları), örneğin, intraperitonel enjeksiyon yoluyla uygulanacaktır. Naif pamuk sıçanlarından bazılarına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla kez (örn., bir prime ve ardından bir veya daha fazla boost) uygulanacaktır. Naif sıçanlara, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun iki veya daha fazla kez uygulandığı durumda kompozisyonlar, aynı veya farklı olacaktır. Bebek pamuk sıçanlarında anti-RSV antikoru seviyeleri, doğumdan sonraki çeşitli zaman noktalarında, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. İmmünizasyon rejimlerinin kazandırdığı RSV'den korunma seviyesi, bebek pamuk sıçanlarını RSV ile tehdit etmek ve bebek pamuk sıçanının akciğerlerindeki veya nazal yıkamalarındaki virüs titerini değerlendirmek veya bebek pamuk sıçanının akciğerlerinin veya nazal kavitesinin patolojisini incelemek suretiyle değerlendirilebilir. Aktif şekilde immünize edilmiş veya edilmemiş ve farklı RSV antijeni maruz kalmaları (örneğin hiç, RSV enfeksiyonu, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünizasyon veya RSV enfeksiyonunu takiben bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilme) yaşamış pamuk sıçanlarından elde edilen antikor içerikli preparasyonlar uygulanmış olan bebek pamuk sıçanlarında çeşitli zaman noktalarındaki anti-RSV

preparasyonları elle transfer etmek suretiyle ele alınır. Bir yetişkin pamuk sıçanına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon uygulanarak anti-RSV antikorları üretilmesi indüklenecektir veya bu, RSV ile enfekte edilebilir ve bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilebilir. Anti-RSV antikorları (veya antikorlar ihtiva eden serum), pamuk sıçanından elde edilecek ve naif pamuk sıçanlarına (yeni doğmuş veya genç pamuk sıçanları), örneğin, intraperitonel enjeksiyon yoluyla uygulanacaktır. Naif pamuk sıçanlarından bazılarına, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon, bir veya daha fazla kez (örn., bir prime ve ardından bir veya daha fazla boost) uygulanacaktır. Naif sıçanlara, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyonun iki veya daha fazla kez uygulandığı durumda kompozisyonlar, aynı veya farklı olacaktır. Bebek pamuk sıçanlarında anti-RSV antikoru seviyeleri, doğumdan sonraki çeşitli zaman noktalarında, burada tarif edilen nötralize edici titer deneyleri veya bir ELISA gibi uygun herhangi bir yöntemle değerlendirilebilir. İmmünizasyon rejimlerinin kazandırdığı RSV'den korunma seviyesi, bebek pamuk sıçanlarını RSV ile tehdit etmek ve bebek pamuk sıçanının akciğerlerindeki veya nazal yıkamalarındaki virüs titerini değerlendirmek veya bebek pamuk sıçanının akciğerlerinin veya nazal kavitesinin patolojisini incelemek suretiyle değerlendirilebilir. Aktif şekilde immünize edilmiş veya edilmemiş ve farklı RSV antijeni maruz kalmaları (örneğin hiç, RSV enfeksiyonu, bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile immünizasyon veya RSV enfeksiyonunu takiben bir anti-RSV immün yanıtı indükleyici kompozisyon ile boost edilme) yaşamış pamuk sıçanlarından elde edilen antikor içerikli preparasyonlar uygulanmış olan bebek pamuk sıçanlarında çeşitli zaman noktalarındaki anti-RSV

antikor seviyelerinin ve RSV'ye karşı korunma derecelerinin karşılaştırılması, burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiğinin ve immünojenisitesinin değerlendirilmesini sağlayacaktır

RSV Nötralizasyon Deneyi

HEp-2 hücreleri, konflüent monokatmanlardan tripsinizasyon yoluyla hasat edilecek, ml başına 6.5 x 10^6 hücrelik bir yoğunlukta %5 fetal inek serumu (FBS) ihtiva eden hücre kültürü ortamında yeniden süspanse edilecek, 96 oyuklu plakalara, oyuk başına 0.1 ml olmak üzere tohumlanacak ve 37°C'de %5 CO2'de 3-6 saat süreyle inkübe edilecektir.

Test serumları ve kontrol serumları, 30 dakika süreyle 56°C'de ısıyla eylemsizleştirilecek ve fosfat tamponlu tuz (PBS), %5 inek serum albümini (BSA) içind seri olarak iki kat seyreltilecektir.

Seri olarak seyreltilen serumlar, PBS %5 FBS içinde ilave hacmin test serumları olmadan oyuk başına 80-140 sinsitia vereceği bir konsantrasyona kadar önceden seyreltilmiş olacak eşit hacimlerde RSV ile karıştırılacaktır. RSV ve seri olarak seyreltilmiş serumları içeren karışımlar, 37°C'de %5 CO2'de 2 saat süreyle inkübe edilecektir.

Ortam, HEp-2 tohumlanmış deney plakasından aspire edilecek ve virüs-serum karışımları, plakaların oyuklarına ilave edilecektir. Plaka, 37°C'de %5 CO_2'de 2 saat süreyle inkübe edilecektir. Virüs-serum karışımları, plakadan aspire edilecektir. Oyuklara, oda sıcaklığında

antikor seviyelerinin ve RSV'ye karşı korunma derecelerinin karşılaştırılması, burada tarif edilen RSV immünizasyon rejiminin etkililiğinin ve immünojenisitesinin değerlendirilmesini sağlayacaktır

RSV Nötralizasyon Deneyi

HEp-2 hücreleri, konflüent monokatmanlardan tripsinizasyon yoluyla hasat edilecek, ml başına 6.5 x 10^6 hücrelik bir yoğunlukta %5 fetal inek serumu (FBS) ihtiva eden hücre kültürü ortamında yeniden süspanse edilecek, 96 oyuklu plakalara, oyuk başına 0.1 ml olmak üzere tohumlanacak ve 37°C'de %5 CO2'de 3-6 saat süreyle inkübe edilecektir.

Test serumları ve kontrol serumları, 30 dakika süreyle 56°C'de ısıyla eylemsizleştirilecek ve fosfat tamponlu tuz (PBS), %5 inek serum albümini (BSA) içind seri olarak iki kat seyreltilecektir.

Seri olarak seyreltilen serumlar, PBS %5 FBS içinde ilave hacmin test serumları olmadan oyuk başına 80-140 sinsitia vereceği bir konsantrasyona kadar önceden seyreltilmiş olacak eşit hacimlerde RSV ile karıştırılacaktır. RSV ve seri olarak seyreltilmiş serumları içeren karışımlar, 37°C'de %5 CO2'de 2 saat süreyle inkübe edilecektir.

Ortam, HEp-2 tohumlanmış deney plakasından aspire edilecek ve virüs-serum karışımları, plakaların oyuklarına ilave edilecektir. Plaka, 37°C'de %5 CO_2'de 2 saat süreyle inkübe edilecektir. Virüs-serum karışımları, plakadan aspire edilecektir. Oyuklara, oda sıcaklığında

%0.75 EMEm içinde metilselüloz (fenol kırmızısı içermeyen), %5 FBS içeren bir çözelti ilave edilecektir. Plakalar daha sonra 37°C'de %5 CO_2'de 40-46 saat süreyle inkübe edilecektir.

Metilselüloz, oyuklardan aspire edilecek ve oyuklara, %10 tamponlanmış formalin ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir. Plakalar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır (1 x PBS, %0.05 Tween 20). Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu (D-PBS, %2.5 FBS, %0.5 saponin, %0.1 NaAzid) ilave edilecek ve plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Geçirgenleştirme/bloklama tamponu, oyuklardan aspire edilecektir. Oyuklar daha sonra üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu içinde 1:1000'lik bir seyreltme oranında F ve/veya NP'yi tanıyan monoklonal antikorlar ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Antikor çözeltisi aspire edilecektir. Oyuklar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu içinde 1:1000'lik bir seyreltme oranında bir sekonder antikor (yaban turpu peroksidazı ile konjuge edilmiş keçi anti-fare IgG ağır ve hafif zinciri) ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Sekonder antikor, oyuklardan aspire edilecektir. Oyuklar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, tripan mavisi substratı

%0.75 EMEm içinde metilselüloz (fenol kırmızısı içermeyen), %5 FBS içeren bir çözelti ilave edilecektir. Plakalar daha sonra 37°C'de %5 CO_2'de 40-46 saat süreyle inkübe edilecektir.

Metilselüloz, oyuklardan aspire edilecek ve oyuklara, %10 tamponlanmış formalin ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir. Plakalar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır (1 x PBS, %0.05 Tween 20). Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu (D-PBS, %2.5 FBS, %0.5 saponin, %0.1 NaAzid) ilave edilecek ve plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Geçirgenleştirme/bloklama tamponu, oyuklardan aspire edilecektir. Oyuklar daha sonra üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu içinde 1:1000'lik bir seyreltme oranında F ve/veya NP'yi tanıyan monoklonal antikorlar ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Antikor çözeltisi aspire edilecektir. Oyuklar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, geçirgenleştirme/bloklama tamponu içinde 1:1000'lik bir seyreltme oranında bir sekonder antikor (yaban turpu peroksidazı ile konjuge edilmiş keçi anti-fare IgG ağır ve hafif zinciri) ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilecektir.

Sekonder antikor, oyuklardan aspire edilecektir. Oyuklar, üç kez yıkama tamponu ile yıkanacaktır. Oyuklara, tripan mavisi substratı

ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilecektir. Plaka, bir kez damıtılmış su ile yıkanacak ve kuru aspire edilecektir.

Boyanmış sisitia, görüntü alma ve sayma yazılımı ile bir UV analizeri kullanılarak sayılacaktır.

Sinsitia, serum ile karışık olmayan virüs ile inkübe edilmiş kontrol oyuklarında sayılacaktır. Sinsitia, örnek oyuklarında sayılacaktır. Her bir oyuktan iki replikat sayılacak ve ortalaması alınacaktır. Örnek oyukları içerisinde kalan kontrol oyuklarının sinsitia oranı hesaplanacaktır. Virüste %60 nötralizasyon sağlayan serum seyreltme değerleri, lineer regresyon yoluyla hesaplanır. Bu seyreltmenin tersi, %60 nötralizasyon titeridir.

Örnek 2: RSV F alt birim aşısı, önceden RSV ile enfekte edilmiş pamuk sıçanları ve farelerinde RSV'ye özel antikor yanıtını boost eder

1. Yöntemler

RSV F trimer alt birim aşısı

RSV F trimeri, füzyon peptidi bölgesinde bir delesyon olan RSV F ekto-alanı içermekle, diğer trimerler ile ilişkiyi engelleyen bir rekombinant proteindir. Nihai yapı, boyut dışlama kromatografisiyle de gözlemlenen şekilde bir homojen trimer oluşturur ve elektron mikroskopisiyle de gözlemlenen şekilde bir füzyon sonrası F

ilave edilecektir. Plaka, oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilecektir. Plaka, bir kez damıtılmış su ile yıkanacak ve kuru aspire edilecektir.

Boyanmış sisitia, görüntü alma ve sayma yazılımı ile bir UV analizeri kullanılarak sayılacaktır.

Sinsitia, serum ile karışık olmayan virüs ile inkübe edilmiş kontrol oyuklarında sayılacaktır. Sinsitia, örnek oyuklarında sayılacaktır. Her bir oyuktan iki replikat sayılacak ve ortalaması alınacaktır. Örnek oyukları içerisinde kalan kontrol oyuklarının sinsitia oranı hesaplanacaktır. Virüste %60 nötralizasyon sağlayan serum seyreltme değerleri, lineer regresyon yoluyla hesaplanır. Bu seyreltmenin tersi, %60 nötralizasyon titeridir.

Örnek 2: RSV F alt birim aşısı, önceden RSV ile enfekte edilmiş pamuk sıçanları ve farelerinde RSV'ye özel antikor yanıtını boost eder

1. Yöntemler

RSV F trimer alt birim aşısı

RSV F trimeri, füzyon peptidi bölgesinde bir delesyon olan RSV F ekto-alanı içermekle, diğer trimerler ile ilişkiyi engelleyen bir rekombinant proteindir. Nihai yapı, boyut dışlama kromatografisiyle de gözlemlenen şekilde bir homojen trimer oluşturur ve elektron mikroskopisiyle de gözlemlenen şekilde bir füzyon sonrası F

konformasyonu ile tutarlı bir beklenen fenotipe sahiptir. Protein, CHO hücrelerinden eksprese edildi ve safaştırıldı. Sonuçta elde edilen protein örneği, %95'ten fazla saflık sergiledi. Alüminyum hidroksitli (alum) F alt birim aşısının in vivo değerlendirmesinde F alt birimi, sodyum klorür ile izotoniklik ayarı yapılmış 10 mM histidin tamponu pH 6.3 kullanılarak 2 mg/ml alum üzerine adsorbe edildi. F alt birimi, lum üzerine, bir gece süreyle 2-8°C'de nazkçe karıştırma yapılarak adsorbe edildi. MF59'lu F alt birim aşısını değerlendirmek için protein, PBS içerisinde seyreltildi ve eşit hacimde 2X MF59 ile 2 saat içerisinde karıştırıldıktan sonra immünizasyon yapıldı ve nazikçe baş aşağı edilerek karıştırıldı.

Pamuk sıçanları ve farelerinin aşışanması ve enfekte edilmesi

Dişi pamuk sıçanları (*Sigmodon hispidis*), Harlan Laboratories'den alındı ve dişi BALB/c fareleri, Charles River Laboratories'den alındı. Bütün çalışmalar, Novartis Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesine göre onaylandı ve yapıldı. 7 pamuk sıçanının olduğu gruplar, 100 µl içinde $1x10^5$ plak oluşturma birimi (pfu) RSV ile intranazal (i.n.) yoldan aşılandı ve 7 hafta sonra RSV F alt birim aşısı (bir arka uzuvda toplam 100 µl hacim) ile intramüsküler (i.m.) yoldan immünize edildi. 7 farenin olduğu gruplar, 50 µl içinde $1x10^6$ pfu RSV ile i.n. yoldan aşılandı ve 11 ve 15 hafta sonra RSV F alt birim aşısı (iki arka uzuv arasında bölünmüş toplam 100 µl hacim) ile i.m. yoldan immünize edildi. Her bir çalışmaya, iki tedavi edilmemiş naif kontrol hayvanı dahil edildi. Serum örnekleri, RSV aşılamasından sonraki çeşitli zaman noktalarında ve her bir RSV F alt birimi immünizasyonunundan 2 hafta sonra toplandı.

konformasyonu ile tutarlı bir beklenen fenotipe sahiptir. Protein, CHO hücrelerinden eksprese edildi ve safaştırıldı. Sonuçta elde edilen protein örneği, %95'ten fazla saflık sergiledi. Alüminyum hidroksitli (alum) F alt birim aşısının in vivo değerlendirmesinde F alt birimi, sodyum klorür ile izotoniklik ayarı yapılmış 10 mM histidin tamponu pH 6.3 kullanılarak 2 mg/ml alum üzerine adsorbe edildi. F alt birimi, lum üzerine, bir gece süreyle 2-8°C'de nazkçe karıştırma yapılarak adsorbe edildi. MF59'lu F alt birim aşısını değerlendirmek için protein, PBS içerisinde seyreltildi ve eşit hacimde 2X MF59 ile 2 saat içerisinde karıştırıldıktan sonra immünizasyon yapıldı ve nazikçe baş aşağı edilerek karıştırıldı.

Pamuk sıçanları ve farelerinin aşışanması ve enfekte edilmesi

Dişi pamuk sıçanları (*Sigmodon hispidis*), Harlan Laboratories'den alındı ve dişi BALB/c fareleri, Charles River Laboratories'den alındı. Bütün çalışmalar, Novartis Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesine göre onaylandı ve yapıldı. 7 pamuk sıçanının olduğu gruplar, 100 µl içinde $1x10^5$ plak oluşturma birimi (pfu) RSV ile intranazal (i.n.) yoldan aşılandı ve 7 hafta sonra RSV F alt birim aşısı (bir arka uzuvda toplam 100 µl hacim) ile intramüsküler (i.m.) yoldan immünize edildi. 7 farenin olduğu gruplar, 50 µl içinde $1x10^6$ pfu RSV ile i.n. yoldan aşılandı ve 11 ve 15 hafta sonra RSV F alt birim aşısı (iki arka uzuv arasında bölünmüş toplam 100 µl hacim) ile i.m. yoldan immünize edildi. Her bir çalışmaya, iki tedavi edilmemiş naif kontrol hayvanı dahil edildi. Serum örnekleri, RSV aşılamasından sonraki çeşitli zaman noktalarında ve her bir RSV F alt birimi immünizasyonunundan 2 hafta sonra toplandı.

RSV F'ye özel ELISA

Münferity pamuk sıçanı ve fare serum örnekleri, enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) ile RSV F'ye özel IgG varlığı bakımından deneye tabi tutuldu. ELISA plakaları (MaxiSorp 96 oyuklu, Nunc), 4°C'de bir gece süreyle PBS içinde 1 µg/ml saflaştırılmış RSV F ile kaplandı. Yıkandıktan sonra (%0.1 Tween-20'li PBS) plakalar, PBS içinde Superblock Bloklama Tamponu (Thermo Scientific) ile 37°C'de en az 1 saat süreyle bloke edildi. Plakalar daha sonra yıkandı, deneyden veya kontrol hayvanlarından gelen deney seyrelticisi (%0.1 Tween-20 ve %5 keçi serumu ile PBS) içinde 5 kat seri serum seyreltmeleri iki kez halinde ilave edildi ve plakalar, 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. Yıkandıktan sonra plakalar, deney seyrelticisi içinde seyreltilmiş (1:50,000 oranında tavuk anti-pamuk sıçanı IgG seyreltmesi [Immunology Consultants Laboratory, Inc,] veya 1:30,000 oranında keçi anti-fare IgG seyreltmesi [Southern Biotech]) yabanturpu peroksidazına (HRP) konjuge anti-IgG saptama antikoru ile 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Son olarak plakalar yıkandı ve her bir oyuğa, 100 µl TMB peroksidaz substratı çözeltisi (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) ilave edildi. Reaksiyonlar, 100 µl 1M H_3PO_4 ilave edilerek durduruldu ve absorbans, 450 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak okundu. Her bir serum örneği için lineer olmayan regresyon (GraphPad Prsim) yoluyla, optik yoğunluğa (OD) karşı iki taraflı serum seyreltmesi logaritmasının olduğu bir grafik oluşturuldu. Titerler, her bir plaka üzerine dahil edilmiş olan bir standart serum örneğine (pamuk sıçanı standardı- tanımlanmış titeri 1:2500 olan ESV ile enfekte edilmiş pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serumlar - tanımlanmış

RSV F'ye özel ELISA

Münferity pamuk sıçanı ve fare serum örnekleri, enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) ile RSV F'ye özel IgG varlığı bakımından deneye tabi tutuldu. ELISA plakaları (MaxiSorp 96 oyuklu, Nunc), 4°C'de bir gece süreyle PBS içinde 1 µg/ml saflaştırılmış RSV F ile kaplandı. Yıkandıktan sonra (%0.1 Tween-20'li PBS) plakalar, PBS içinde Superblock Bloklama Tamponu (Thermo Scientific) ile 37°C'de en az 1 saat süreyle bloke edildi. Plakalar daha sonra yıkandı, deneyden veya kontrol hayvanlarından gelen deney seyrelticisi (%0.1 Tween-20 ve %5 keçi serumu ile PBS) içinde 5 kat seri serum seyreltmeleri iki kez halinde ilave edildi ve plakalar, 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. Yıkandıktan sonra plakalar, deney seyrelticisi içinde seyreltilmiş (1:50,000 oranında tavuk anti-pamuk sıçanı IgG seyreltmesi [Immunology Consultants Laboratory, Inc,] veya 1:30,000 oranında keçi anti-fare IgG seyreltmesi [Southern Biotech]) yabanturpu peroksidazına (HRP) konjuge anti-IgG saptama antikoru ile 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Son olarak plakalar yıkandı ve her bir oyuğa, 100 µl TMB peroksidaz substratı çözeltisi (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) ilave edildi. Reaksiyonlar, 100 µl 1M H_3PO_4 ilave edilerek durduruldu ve absorbans, 450 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak okundu. Her bir serum örneği için lineer olmayan regresyon (GraphPad Prsim) yoluyla, optik yoğunluğa (OD) karşı iki taraflı serum seyreltmesi logaritmasının olduğu bir grafik oluşturuldu. Titerler, her bir plaka üzerine dahil edilmiş olan bir standart serum örneğine (pamuk sıçanı standardı- tanımlanmış titeri 1:2500 olan ESV ile enfekte edilmiş pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serumlar - tanımlanmış

titeri 1:269,773 olan adjuvane edilmiş RSV F alt birimi ile aşılanmış BALB/c farelerinden havuz haline getirilmiş serumlar) normalize edilmiş yaklaşık olarak 0.6'lık bir $OD_{450\ nm}$'de iki taralı serum seyreltmesi şeklinde tanımlandı. Münferit bir örnek için olan titerin, test edilen ilk serum seyreltmesinin altında, 1:25, olması durumunda grup ortalamasnın hesaplanması amaçları için 1:5'lik bir titer tahsis edildi.

RSV nötralizasyon deneyi

Serum örnekleri, bir odak azaltmalı nötralizasyon testiyle nötralize edici RSV antikorlarının varlığı bakımından test edildi. Daha önceden yaklaşık 115 pfu/25 µL verecek şekilde titerlenmiş eşit hacimde bir RSV Uzun'a, ısıyla eylemsizleştirilmiş (HI)-serumunun (%5 HI-FBS ile PBS içinde) iki kat seri seyerltmeleri ilave edildi. Serum/virüs karışımları, 37°C ve 5% CO_2'de 2 saat süreyle inkübe edilerek virüs nötralizasyonunun meydana gelmesi sağlandı ve sonra bu karışımın 25 µL'si (yaklaşık 115 PFU ihtiva eden), 96 oyuklu plakalarda Hep-2 hücreleri içeren iki katlı oyuklara aşılandı. 37°C ve %5 CO2'de 2 saat sonra hücreler, %5 HI-FBS ile %0.75 metilselüloz içerikli ortam ile örtüldü ve 40-46 saat süreyle inkübe edildi. Sinsitia sayısı, RSV füzyonuna özel monoklonal antikorlar ve nükleoproteinler (AbD Serotec) ile immüno-boyama yapılmasını takiben otomatik sayım (CTL Immunospot S5 UV Analizeri) yoluyla belirlendi. Nötralizasyon titeri, kontrollere (serum içermeyen) göre oyuk başına sinsitia sayısında en az %60 azalma sağlayan serum seyreltmesinin karşılığı olarak tanımlanır. Bir örneğin titerinin, test edilen ilk serum

titeri 1:269,773 olan adjuvane edilmiş RSV F alt birimi ile aşılanmış BALB/c farelerinden havuz haline getirilmiş serumlar) normalize edilmiş yaklaşık olarak 0.6'lık bir $OD_{450\ nm}$'de iki taralı serum seyreltmesi şeklinde tanımlandı. Münferit bir örnek için olan titerin, test edilen ilk serum seyreltmesinin altında, 1:25, olması durumunda grup ortalamasnın hesaplanması amaçları için 1:5'lik bir titer tahsis edildi.

RSV nötralizasyon deneyi

Serum örnekleri, bir odak azaltmalı nötralizasyon testiyle nötralize edici RSV antikorlarının varlığı bakımından test edildi. Daha önceden yaklaşık 115 pfu/25 µL verecek şekilde titerlenmiş eşit hacimde bir RSV Uzun'a, ısıyla eylemsizleştirilmiş (HI)-serumunun (%5 HI-FBS ile PBS içinde) iki kat seri seyerltmeleri ilave edildi. Serum/virüs karışımları, 37°C ve 5% CO_2'de 2 saat süreyle inkübe edilerek virüs nötralizasyonunun meydana gelmesi sağlandı ve sonra bu karışımın 25 µL'si (yaklaşık 115 PFU ihtiva eden), 96 oyuklu plakalarda Hep-2 hücreleri içeren iki katlı oyuklara aşılandı. 37°C ve %5 CO2'de 2 saat sonra hücreler, %5 HI-FBS ile %0.75 metilselüloz içerikli ortam ile örtüldü ve 40-46 saat süreyle inkübe edildi. Sinsitia sayısı, RSV füzyonuna özel monoklonal antikorlar ve nükleoproteinler (AbD Serotec) ile immüno-boyama yapılmasını takiben otomatik sayım (CTL Immunospot S5 UV Analizeri) yoluyla belirlendi. Nötralizasyon titeri, kontrollere (serum içermeyen) göre oyuk başına sinsitia sayısında en az %60 azalma sağlayan serum seyreltmesinin karşılığı olarak tanımlanır. Bir örneğin titerinin, test edilen ilk serum

seyreltmesinin altında, 1:20, olması durumunda grup ortalamasının hesaplanması amaçları için 1:10'luk bir titer tahsis edildi.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

Önceden RSV ile enfekte edilmiş yetişkin insanlarda serum nötralize edici titerleri yükseltmek amacıyla F alt birim aşısı kullanımını modellemek için 7 yetişkin dişi pamuk sıçanı veya fare içeren gruplar, RSV ile i.n. yoldan aşılandı ve 7 hafta sonra (pamuk sıçanları) veya 11 ve 15 hafta sonra (fareler) adjuvane edilmemiş veya adjuvane edilmiş RSV F alt birim aşısı ile i.m. yoldan immünize edildi. Bu deneylerin sonuçları, RSV F alt birim aşısının, farelerde ve pamuk sıçanlarında RSV enfeksiyonu ile prime edilmiş serum F'ye özel IgG ve RSV nötralize edici yanıtları etkili şekilde boost ettiğini ortaya koyar (Tablo 1 ve 2). RSV'ye özel antikor yanıtında RSV F alt birim aşısının sağladığı katlı boost, farelerde (nötralizasyon titerinde 10 ila 50 kat artış ve F'ye özel IgG titerinde 9 ila 51 kat artış), kontrol sıçanlarında olduğundan (nötralizasyon titerinde 4 ila 6 kat artış ve F'ye özel IgG titerinde 7 ila 25 kat artış) daha fazla idi ancak her iki türde de titer artışı, değerlendirilen antijen dozlarından ve adjuvandan büyük ölçüde bağımsızdı (Tablo 1 ve 2).

seyreltmesinin altında, 1:20, olması durumunda grup ortalamasının hesaplanması amaçları için 1:10'luk bir titer tahsis edildi.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

Önceden RSV ile enfekte edilmiş yetişkin insanlarda serum nötralize edici titerleri yükseltmek amacıyla F alt birim aşısı kullanımını modellemek için 7 yetişkin dişi pamuk sıçanı veya fare içeren gruplar, RSV ile i.n. yoldan aşılandı ve 7 hafta sonra (pamuk sıçanları) veya 11 ve 15 hafta sonra (fareler) adjuvane edilmemiş veya adjuvane edilmiş RSV F alt birim aşısı ile i.m. yoldan immünize edildi. Bu deneylerin sonuçları, RSV F alt birim aşısının, farelerde ve pamuk sıçanlarında RSV enfeksiyonu ile prime edilmiş serum F'ye özel IgG ve RSV nötralize edici yanıtları etkili şekilde boost ettiğini ortaya koyar (Tablo 1 ve 2). RSV'ye özel antikor yanıtında RSV F alt birim aşısının sağladığı katlı boost, farelerde (nötralizasyon titerinde 10 ila 50 kat artış ve F'ye özel IgG titerinde 9 ila 51 kat artış), kontrol sıçanlarında olduğundan (nötralizasyon titerinde 4 ila 6 kat artış ve F'ye özel IgG titerinde 7 ila 25 kat artış) daha fazla idi ancak her iki türde de titer artışı, değerlendirilen antijen dozlarından ve adjuvandan büyük ölçüde bağımsızdı (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1: RSV-seropozitif pamuk sıçanlarında RSV F alt birim aşısının immünojenisitesi

Gr.	Enfeksiyon[a] (hafta 0)	Aşılama[b] (hafta 7)	Serum F'ye özel IgG titeri[c]		Serum RSV nötralizasyon titeri[d]		
			Enfeksiyondan 7 hafta sonra	Aşılamadan 2 hafta sonra	Enfeksiyondan 4 hafta sonra	Enfeksiyondan 7 hafta sonra	Aşılamadan 2 hafta sonra
A	RSV	-	2,90±0,19	2,80±0,33	2,69±0,03	2,44±0,06	2,71±0,03
B	RSV	5 µg F alt birimi	2,80±0,35	4,16±0,16	2,81±0,08	2,64±0,22	3,36±0,13
C	RSV	5 µg F alt birimi/MF59	2,93±0,33	4,32±0,18	2,64±0,13	2,65±0,05	3,39±0,10
D	RSV	0,5 µg F alt birimi/MF59	2,92±0,24	3,99±0,19	2,47±0,02	2,67±0,14	3,36±0,05
E	RSV	0,05 µg F alt birimi/MF59	2,90±0,23	3,87±0,17	2,68±0,07	2,47±0,09	3,25±0,08
F	RSV	5 µg F alt birimi/alum	3,24±0,52	4,07±0,14	2,80±0,20	2,64±0,13	3,24±0,11
G	RSV	0,5 µg F alt birimi/alum	2,79±0,12	3,92±0,16	2,61±0,09	2,39±0,11	3,04±0,06
H	RSV	0,05 µg F alt birimi/alum	3,06±0,17	4,05±0,22	2,80±0,17	2,62±0,06	3,24±0,22
I	-	-	n.t.	n.t.	1,00	1,32	1,00

Kısaltmalar: Gr - grup, wk - hafta, n.t. - test edilmedi

[a] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[b] i.m.

[c] grup başına 7 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titer ±standart sapma

[d] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titer±aralık (Gr.I'de 2 hayvanlık 1 havuz)

Tablo 1: RSV-seropozitif pamuk sıçanlarında RSV F alt birim aşısının immünojenisitesi

Gr.	Enfeksiyon[a] (hafta 0)	Aşılama[b] (hafta 7)	Serum F'ye özel IgG titeri[c]		Serum RSV nötralizasyon titeri[d]		
			Enfeksiyondan 7 hafta sonra	Aşılamadan 2 hafta sonra	Enfeksiyondan 4 hafta sonra	Enfeksiyondan 7 hafta sonra	Aşılamadan 2 hafta sonra
A	RSV	-	2,90±0,19	2,80±0,33	2,69±0,03	2,44±0,06	2,71±0,03
B	RSV	5 µg F alt birimi	2,80±0,35	4,16±0,16	2,81±0,08	2,64±0,22	3,36±0,13
C	RSV	5 µg F alt birimi/MF59	2,93±0,33	4,32±0,18	2,64±0,13	2,65±0,05	3,39±0,10
D	RSV	0,5 µg F alt birimi/MF59	2,92±0,24	3,99±0,19	2,47±0,02	2,67±0,14	3,36±0,05
E	RSV	0,05 µg F alt birimi/MF59	2,90±0,23	3,87±0,17	2,68±0,07	2,47±0,09	3,25±0,08
F	RSV	5 µg F alt birimi/alum	3,24±0,52	4,07±0,14	2,80±0,20	2,64±0,13	3,24±0,11
G	RSV	0,5 µg F alt birimi/alum	2,79±0,12	3,92±0,16	2,61±0,09	2,39±0,11	3,04±0,06
H	RSV	0,05 µg F alt birimi/alum	3,06±0,17	4,05±0,22	2,80±0,17	2,62±0,06	3,24±0,22
I	-	-	n.t.	n.t.	1,00	1,32	1,00

Kısaltmalar: Gr - grup, wk - hafta, n.t. - test edilmedi

[a] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[b] i.m.

[c] grup başına 7 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titer ±standart sapma

[d] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titer±aralık (Gr.I'de 2 hayvanlık 1 havuz)

Tablo 2: RSV-seropozitif BALB/c farelerinde RSV F alt birim aşısının immünojenisitesi

Gr.	Enfek-siyon[a] (hafta 0)	Aşılama[b] (hafta 11 ve 15)	Serum F'ye özel IgG titeri[c]			Serum RSV nötralizasyon titeri[d]		
			Enfeksiyondan 11 hafta sonra	1nci aşılamadan 2 hafta sonra	2nci aşılamadan 2 hafta sonra	Enfeksiyondan 11 hafta sonra	1nci aşılamadan 2 hafta sonra	2nci aşılama dan 2 hafta sonra
A	RSV	-	4,03±0,11	4,09±0,12	4,10±0,12	2,11±0,10	2,18±0,03	2,50±0,08
B	RSV	5 µg F alt birimi	4,02±0,10	5,36±0,11	5,40±0,10	2,03±0,14	3,24±0,15	3,42±0,11
C	RSV	0,5 µg F alt birimi	4,18±0,11	5,29±0,06	5,43±0,07	2,39±0,10	3,39±0,03	3,54±0,07
D	RSV	0,05 µg F alt birimi	4,07±0,16	5,15±0,11	5,24±0,08	1,98±0,10	3,03±0,07	3,28±0,08
E	RSV	5 µg F alt birimi/MF59	3,99±0,16	5,59±0,15	5,72±0,09	1,98±0,26	3,34±0,34	3,38±0,10
F	RSV	0,5 µg F alt birimi/MF59	4,00±0,30	5,55±0,11	5,78±0,12	2,04±0,12	3,40±0,09	3,39±0,20
G	RSV	0,05 µg F alt birimi/MF59	3,96±0,20	5,61±0,09	5,68±0,09	1,85±0,37	3,32±0,08	3,64±0,15
H	RSV	5 µg F alt birimi/alum	4,02±0,10	5,46±0,14	5,63±0,06	1,75±0,13	3,45±0,09	3,31±0,17
I	RSV	0,5 µg F alt birimi/alum	3,91±0,19	5,22±0,14	5,57±0,14	2,05±0,19	3,23±0,14	3,52±0,02
J	RSV	0,05 µg F alt birimi/alum	4,04±0,11	5,06±0,13	5,35±0,16	2,22±0,15	3,16±0,17	3,54±0,10
K	-	-	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00	1,00

Kısaltmalar: Gr - grup, wk - hafta

[a] $1x10^6$ pfu RSV i.n.

[b] i.m.

[c] grup başına 7 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ±standart sapma (Gr. K'de 2 hayvan)

[d] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ±aralık (Gr. K'de 2 hayvanlık 1 havuz)

Tablo 2: RSV-seropozitif BALB/c farelerinde RSV F alt birim aşısının immünojenisitesi

Gr.	Enfek-siyon[a] (hafta 0)	Aşılama[b] (hafta 11 ve 15)	Serum F'ye özel IgG titeri[c]			Serum RSV nötralizasyon titeri[d]		
			Enfeksiyondan 11 hafta sonra	1nci aşılamadan 2 hafta sonra	2nci aşılamadan 2 hafta sonra	Enfeksiyondan 11 hafta sonra	1nci aşılamadan 2 hafta sonra	2nci aşılama dan 2 hafta sonra
A	RSV	-	4,03±0,11	4,09±0,12	4,10±0,12	2,11±0,10	2,18±0,03	2,50±0,08
B	RSV	5 µg F alt birimi	4,02±0,10	5,36±0,11	5,40±0,10	2,03±0,14	3,24±0,15	3,42±0,11
C	RSV	0,5 µg F alt birimi	4,18±0,11	5,29±0,06	5,43±0,07	2,39±0,10	3,39±0,03	3,54±0,07
D	RSV	0,05 µg F alt birimi	4,07±0,16	5,15±0,11	5,24±0,08	1,98±0,10	3,03±0,07	3,28±0,08
E	RSV	5 µg F alt birimi/MF59	3,99±0,16	5,59±0,15	5,72±0,09	1,98±0,26	3,34±0,34	3,38±0,10
F	RSV	0,5 µg F alt birimi/MF59	4,00±0,30	5,55±0,11	5,78±0,12	2,04±0,12	3,40±0,09	3,39±0,20
G	RSV	0,05 µg F alt birimi/MF59	3,96±0,20	5,61±0,09	5,68±0,09	1,85±0,37	3,32±0,08	3,64±0,15
H	RSV	5 µg F alt birimi/alum	4,02±0,10	5,46±0,14	5,63±0,06	1,75±0,13	3,45±0,09	3,31±0,17
I	RSV	0,5 µg F alt birimi/alum	3,91±0,19	5,22±0,14	5,57±0,14	2,05±0,19	3,23±0,14	3,52±0,02
J	RSV	0,05 µg F alt birimi/alum	4,04±0,11	5,06±0,13	5,35±0,16	2,22±0,15	3,16±0,17	3,54±0,10
K	-	-	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00	1,00

Kısaltmalar: Gr - grup, wk - hafta

[a] $1x10^6$ pfu RSV i.n.

[b] i.m.

[c] grup başına 7 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ±standart sapma (Gr. K'de 2 hayvan)

[d] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ±aralık (Gr. K'de 2 hayvanlık 1 havuz)

Örnek 3: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş pamuk sıçanları ve farelerden pasif antikor transferiyle korunma

1. Yöntemler

Pamuk sıçanları ve farelerde serum transferi ve RSV enfeksiyonue

Dişi pamuk sıçanları (*Sigmodon hispidis*), Harlan Laboratories'den alındı ve dişi BALB/c fareleri, Charles River Laboratories'den alındı. Bütün çalışmalar, Novartis Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesine göre onaylandı ve yapıldı. 7-8 dişi yetişkin pamuk sıçanı içeren gruplar, seyreltilmemiş pamuk sıçanı serumu içeren şu şekilde üç havuzdan biri ile intraperitonel yoldan (i.p.) aşılandı (10 ml/kg): 1) "normal" - naif pamuk sıçanlarından alınmış, 2) "RSV" -pamuk sıçanları, $1x10^5$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 hafta sonra serum alındı veya 3) "RSV + alt birim" - pamuk sıçanları, $1x10^5$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 hafta sonra F alt birimi ile aşılandı. F alt birimi aşılamasından 2 ve 4 hafta sonra serum alındı (Örnek 2'de tarif edilen pamuk sıçanı deneyine benzer şekilde, adjuvane edilmemiş yada alum veya MF59 ile adjuvane edilmiş 0.05 µg, 0.5 µg veya 5 µg F alt birimi ile aşılanmış hayvanlardan havuz haline getirilen). İlave bir grup hayvana, 1:3 oranında "RSV+alt birim" serum havuzu seyreltmesinden 10 ml/kg enjekte edildi.

4-8 BALB/c faresi içeren gruplar, seyreltilmemiş fare serumu içeren şu şekildeki iki havuzdan biri ile i.p. yoldan aşılandı (20 ml/kg): 1) "normal" - naif BALB/c farelerinden alındı veya 2) "RSV + alt birimi" - BALB/c fareleri, $1x10^6$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 ve 11 hafta

Örnek 3: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş pamuk sıçanları ve farelerden pasif antikor transferiyle korunma

1. Yöntemler

Pamuk sıçanları ve farelerde serum transferi ve RSV enfeksiyonue

Dişi pamuk sıçanları (*Sigmodon hispidis*), Harlan Laboratories'den alındı ve dişi BALB/c fareleri, Charles River Laboratories'den alındı. Bütün çalışmalar, Novartis Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesine göre onaylandı ve yapıldı. 7-8 dişi yetişkin pamuk sıçanı içeren gruplar, seyreltilmemiş pamuk sıçanı serumu içeren şu şekilde üç havuzdan biri ile intraperitonel yoldan (i.p.) aşılandı (10 ml/kg): 1) "normal" - naif pamuk sıçanlarından alınmış, 2) "RSV" -pamuk sıçanları, $1x10^5$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 hafta sonra serum alındı veya 3) "RSV + alt birim" - pamuk sıçanları, $1x10^5$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 hafta sonra F alt birimi ile aşılandı. F alt birimi aşılamasından 2 ve 4 hafta sonra serum alındı (Örnek 2'de tarif edilen pamuk sıçanı deneyine benzer şekilde, adjuvane edilmemiş yada alum veya MF59 ile adjuvane edilmiş 0.05 µg, 0.5 µg veya 5 µg F alt birimi ile aşılanmış hayvanlardan havuz haline getirilen). İlave bir grup hayvana, 1:3 oranında "RSV+alt birim" serum havuzu seyreltmesinden 10 ml/kg enjekte edildi.

4-8 BALB/c faresi içeren gruplar, seyreltilmemiş fare serumu içeren şu şekildeki iki havuzdan biri ile i.p. yoldan aşılandı (20 ml/kg): 1) "normal" - naif BALB/c farelerinden alındı veya 2) "RSV + alt birimi" - BALB/c fareleri, $1x10^6$ pfu RSV ile enfekte edildi ve 7 ve 11 hafta

sonra F alt birimi ile aşılandı. 1Nci aşılamadan 2 ve 4 hafta sonra ve 2nci aşılamadan 2 hafta sonra serum alındı ve havuz haline getirildi (hayvanlar, Örnek 2'de tarif edilen fare deneyine benzer şekilde, adjuvane edilmemiş yada alum veya MF59 ile adjuvane edilmiş 0.05 µg, 0.5 µg veya 5 µg F alt birimi ile aşılandı). İlave bir fare grubuna, 1:3 oranında "RSV+alt birim" serum havuzu seyreltmesinden 20 ml/kg enjekte edildi.

Serum transferinden iki gün sonra bütün pamuk sıçanları ve fareler artı tedavi edilmemiş kontrol hayvanları, RSV (pamuk sıçanları için $1x10^5$ pfu ve fareler için $3x10^6$ pfu) ile intranazal yoldan enfekte edildi.

RSV plak deneyi

Enfeksiyon sonrası akciğerdeki RSV yükü, plak deneyiyle belirlendi. Akciğerler, RSV enfeksiyonundan 4 gün (fareler) veya 5 gün (pamuk sıçanları) sonra hasat edildi ve tartıldı ve bir adet sağ lob, %25 sukroz içeren ortam içerisine konuldu ve bir doku homojenizeri ile parçalandı. Bu örneklerden gelen hücresiz süpernatanlar, -80°C'de saklandı. Enfeksiyöz virüs deneyi yapmak için arıtılmış akciğer homojenatı seyreltmeleri (%5 HI-FBS ile PBS içinde), konflüent HEp-2 hücresi monokatmanları üzerine, 12 oyuklu bir plakadaki oyuk başına 200 µl hacimde aşılandı. Periyodik nazikçe salla yapılan 2 saatin ardından (37°C, %5 CO_2), inokülüm çıkarıldı ve hücreler, %5 HI-FBS, glutamin ve antibiyotikler ile desteklenen ortamda %1.25 SeaPlaque agarozdan 1.5 ml ile örtüldü. 3-4 günlük inkübasyon sonrasında hücreler yine %0,1 nötr kırmızı (Sigma) ihtiva eden ortamda %1,25 agarozdan 1 ml ile örtüldü. Plaklar, bir gün sonra bir

sonra F alt birimi ile aşılandı. 1Nci aşılamadan 2 ve 4 hafta sonra ve 2nci aşılamadan 2 hafta sonra serum alındı ve havuz haline getirildi (hayvanlar, Örnek 2'de tarif edilen fare deneyine benzer şekilde, adjuvane edilmemiş yada alum veya MF59 ile adjuvane edilmiş 0.05 µg, 0.5 µg veya 5 µg F alt birimi ile aşılandı). İlave bir fare grubuna, 1:3 oranında "RSV+alt birim" serum havuzu seyreltmesinden 20 ml/kg enjekte edildi.

Serum transferinden iki gün sonra bütün pamuk sıçanları ve fareler artı tedavi edilmemiş kontrol hayvanları, RSV (pamuk sıçanları için $1x10^5$ pfu ve fareler için $3x10^6$ pfu) ile intranazal yoldan enfekte edildi.

RSV plak deneyi

Enfeksiyon sonrası akciğerdeki RSV yükü, plak deneyiyle belirlendi. Akciğerler, RSV enfeksiyonundan 4 gün (fareler) veya 5 gün (pamuk sıçanları) sonra hasat edildi ve tartıldı ve bir adet sağ lob, %25 sukroz içeren ortam içerisine konuldu ve bir doku homojenizeri ile parçalandı. Bu örneklerden gelen hücresiz süpernatanlar, -80°C'de saklandı. Enfeksiyöz virüs deneyi yapmak için arıtılmış akciğer homojenatı seyreltmeleri (%5 HI-FBS ile PBS içinde), konflüent HEp-2 hücresi monokatmanları üzerine, 12 oyuklu bir plakadaki oyuk başına 200 µl hacimde aşılandı. Periyodik nazikçe salla yapılan 2 saatin ardından (37°C, %5 CO_2), inokülüm çıkarıldı ve hücreler, %5 HI-FBS, glutamin ve antibiyotikler ile desteklenen ortamda %1.25 SeaPlaque agarozdan 1.5 ml ile örtüldü. 3-4 günlük inkübasyon sonrasında hücreler yine %0,1 nötr kırmızı (Sigma) ihtiva eden ortamda %1,25 agarozdan 1 ml ile örtüldü. Plaklar, bir gün sonra bir

ışık kutusu yardımıyla sayılır. Münferit bir hayvan için viral yükün, deneydeki saptama limitinin altında (her bir g akciğer başına 200 pfu) olması durumunda buna, grup ortalamasının hesaplanması amacıyla her bir g akciğer başına 100 pfu'luk bir titer tahsis edildi.

RSV nötralizasyon deneyi ve F'ye özel IgG ELISA

Bu deneyler, Örnek 2'de tarif edildiği gibi yapıldı.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

İnsan bebeklerin, daha önceden RSV ile enfekte edilmiş, alt birim F ile boost edilmiş annelerden RSV nötralize edici titerleri artmış antikorların pasif transferiyle korunmasını modellemek için biz, yetişkin pamuk sıçanlarını veya fareleri RSV ile enfekte ettik, bunlardan bazılarını, 7 hafta sonra RSV F alt birim aşısı ile boost ettik, serumu hasat ettik ve serumu, immünize edilmemiş yetişkin pamuk sıçanlarına veya farelere i.p. yoldan enjekte ettik (grup başına 4-8 hayvan, pamuk sıçanlarına pamuk sıçanı serumu enjekte edilir ve farelere, fare serumu enjekte edilir). Serum transferinden iki gün sonra bütün hayvanlar, RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi.

RSV nötralize edici aktivite, donör serumunun pasif transferinden bir gün sonra alıcı kemirgenlerin serumunda kolaylıkla saptanabildi (Tablo 3 ve 4). RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş donörlerden serum alan kemirgenlerde, RSV ile enfekte edilmiş ancak immünize edilmemiş donörlerden gelen serumu alan, normal serum alan veya RSV tehdidinden önce hiç serum almayan

ışık kutusu yardımıyla sayılır. Münferit bir hayvan için viral yükün, deneydeki saptama limitinin altında (her bir g akciğer başına 200 pfu) olması durumunda buna, grup ortalamasının hesaplanması amacıyla her bir g akciğer başına 100 pfu'luk bir titer tahsis edildi.

RSV nötralizasyon deneyi ve F'ye özel IgG ELISA

Bu deneyler, Örnek 2'de tarif edildiği gibi yapıldı.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

İnsan bebeklerin, daha önceden RSV ile enfekte edilmiş, alt birim F ile boost edilmiş annelerden RSV nötralize edici titerleri artmış antikorların pasif transferiyle korunmasını modellemek için biz, yetişkin pamuk sıçanlarını veya fareleri RSV ile enfekte ettik, bunlardan bazılarını, 7 hafta sonra RSV F alt birim aşısı ile boost ettik, serumu hasat ettik ve serumu, immünize edilmemiş yetişkin pamuk sıçanlarına veya farelere i.p. yoldan enjekte ettik (grup başına 4-8 hayvan, pamuk sıçanlarına pamuk sıçanı serumu enjekte edilir ve farelere, fare serumu enjekte edilir). Serum transferinden iki gün sonra bütün hayvanlar, RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi.

RSV nötralize edici aktivite, donör serumunun pasif transferinden bir gün sonra alıcı kemirgenlerin serumunda kolaylıkla saptanabildi (Tablo 3 ve 4). RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş donörlerden serum alan kemirgenlerde, RSV ile enfekte edilmiş ancak immünize edilmemiş donörlerden gelen serumu alan, normal serum alan veya RSV tehdidinden önce hiç serum almayan

kemirgenler ile kıyaslandığında, transfer sonrası serum RSV nötralizasyon titerleri en yüksekti ve RSV tehdidi sonrası akciğer viral yükleri en düşüktü (Tablo 3 ve 4). Bu veriler, pasif şekilde transfer edilmiş olan serumun, RSV tehdidinden koruma sağlayabildiğini ve transfer edilen serumun nötralizasyon titeri ne kadar yüksekse RSV'den korunmansın o kadar fazla olduğunu gösterir (Tablo 3 ve 4 ve ŞEKİL 1A ve 1B). RSV ile enfekte edilmiş ancak immünize edilmemiş pamuk sıçanlarından değil RSV ile enfekte edilmiş, alt birim F aşısı ile immünize edilmiş pamuk sıçanlarından transfer edilen serumun alıcıları, RSV tehdidinden korunduğu için bu sonuçlar, RSV F alt birim aşısı ile immünize edilmiş gebe kadının (kaçınılmaz surette geçmişte RSV enfeksiyonları geçirmiş) doğurduğu insan bebeklerin korunduğunu destekler.

Pasif transfer sonrasında RSV'ye özel antikorun yarı ömrünü belirlemek için kemirgen gruplarına, RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş kemirgenlerden gelen seyreltilmemiş serum i.p. yoldan enjekte edildi ve alıcılardaki RSV nötralizasyon titeri, transfer sonrasında çeşitli zaman noktalarında ölçüldü. Bu çalışmaların sonuçları, pasif şekilde transfer edilmiş olan antikorun yarı ömrünün, hem pamuk sıçanlarında hem de farelerde yaklaşık olarak 2 hafta olduğunu ortaya koya (Tablo 5 ve 6). Bu nedenle, RSV F alt birim aşısı tarafından nötralizasyon titerinde koruyucu eşiğin üzerindeki her iki kat artış, bu kemirgen modellerinde pasif antikor alıcılarında 2 hafta kadar korumayı kapsamalıdır.

kemirgenler ile kıyaslandığında, transfer sonrası serum RSV nötralizasyon titerleri en yüksekti ve RSV tehdidi sonrası akciğer viral yükleri en düşüktü (Tablo 3 ve 4). Bu veriler, pasif şekilde transfer edilmiş olan serumun, RSV tehdidinden koruma sağlayabildiğini ve transfer edilen serumun nötralizasyon titeri ne kadar yüksekse RSV'den korunmansın o kadar fazla olduğunu gösterir (Tablo 3 ve 4 ve ŞEKİL 1A ve 1B). RSV ile enfekte edilmiş ancak immünize edilmemiş pamuk sıçanlarından değil RSV ile enfekte edilmiş, alt birim F aşısı ile immünize edilmiş pamuk sıçanlarından transfer edilen serumun alıcıları, RSV tehdidinden korunduğu için bu sonuçlar, RSV F alt birim aşısı ile immünize edilmiş gebe kadının (kaçınılmaz surette geçmişte RSV enfeksiyonları geçirmiş) doğurduğu insan bebeklerin korunduğunu destekler.

Pasif transfer sonrasında RSV'ye özel antikorun yarı ömrünü belirlemek için kemirgen gruplarına, RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş kemirgenlerden gelen seyreltilmemiş serum i.p. yoldan enjekte edildi ve alıcılardaki RSV nötralizasyon titeri, transfer sonrasında çeşitli zaman noktalarında ölçüldü. Bu çalışmaların sonuçları, pasif şekilde transfer edilmiş olan antikorun yarı ömrünün, hem pamuk sıçanlarında hem de farelerde yaklaşık olarak 2 hafta olduğunu ortaya koya (Tablo 5 ve 6). Bu nedenle, RSV F alt birim aşısı tarafından nötralizasyon titerinde koruyucu eşiğin üzerindeki her iki kat artış, bu kemirgen modellerinde pasif antikor alıcılarında 2 hafta kadar korumayı kapsamalıdır.

Tablo 3: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş pamuk sıçanlarından pasif serum transferiyle korunma

Gr.	Transfer edilen serum[a] (gün 0)	Tehdit[b] (gün 2)	Serum transferinden 1 gün sonra		RSV tehdidinden 5 gün sonra
			Serum F'ye özel IgG titeri[c]	Serum RSV nötralizasyon titeri[d]	Akciğer viral yükü[e]
A	RSV + alt birim	RSV	2,81±0,09	2,52±0,09	3,18±0,42
B	1:3 RSV + alt birim	RSV	2,43±0,30	2,16±0,12	5,36±0,47
C	RSV	RSV	1,64±0,05	1,92±0,15	5,48±0,23
D	normal	RSV	0,70±0,00	1,04±0,12	5,82±0,24
E	-	RSV	0,70±0,00	1,00±0,00	5,74±0,35

Kısaltmalar: Gr - grup, chal - tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim"), RSV ile enfekte edilmiş, aşılanmamış ("RSV") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından gelen havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[c-d] grup başına 7-8 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 7-8 münferit hayvanın her bir g akciğeri başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

Tablo 3: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş pamuk sıçanlarından pasif serum transferiyle korunma

Gr.	Transfer edilen serum[a] (gün 0)	Tehdit[b] (gün 2)	Serum transferinden 1 gün sonra		RSV tehdidinden 5 gün sonra
			Serum F'ye özel IgG titeri[c]	Serum RSV nötralizasyon titeri[d]	Akciğer viral yükü[e]
A	RSV + alt birim	RSV	2,81±0,09	2,52±0,09	3,18±0,42
B	1:3 RSV + alt birim	RSV	2,43±0,30	2,16±0,12	5,36±0,47
C	RSV	RSV	1,64±0,05	1,92±0,15	5,48±0,23
D	normal	RSV	0,70±0,00	1,04±0,12	5,82±0,24
E	-	RSV	0,70±0,00	1,00±0,00	5,74±0,35

Kısaltmalar: Gr - grup, chal - tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim"), RSV ile enfekte edilmiş, aşılanmamış ("RSV") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından gelen havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[c-d] grup başına 7-8 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 7-8 münferit hayvanın her bir g akciğeri başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

Tablo 4: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş BALB/c farelerinden pasif serum transferiyle korunma

Gr.	Transfer edilen serum[a] (gün 0)	Tehdit[b] (gün 2)	Serum transferinden 1 gün sonra		RSV tehdidinden 4 gün sonra
			Serum F'ye özel IgG titeri[c]	Serum RSV nötralizasyon titeri[d]	Akciğer viral yükü[e]
A	RSV + alt birim	RSV	4,85 ±0,04	2,90 ±0,06	2,65 ±0,07
B	1:3 RSV + alt birim	RSV	4,30 ±0,05	2,20 ±0,20	4,78 ±0,39
D	normal	RSV	0,70 ±0,00	1,00 ±0,00	4,95 ±0,37
E	-	RSV	0,70 ±0,00	1,04 ±0,11	4,96 ±0,26

Kısaltmalar: Gr - grup, chal - tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") BALB/c farelerinden gelen havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[c-d] grup başına 4-8 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 4-8 münferit hayvanın her bir g akciğeri başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

5

Tablo 4: RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş BALB/c farelerinden pasif serum transferiyle korunma

Gr.	Transfer edilen serum[a] (gün 0)	Tehdit[b] (gün 2)	Serum transferinden 1 gün sonra		RSV tehdidinden 4 gün sonra
			Serum F'ye özel IgG titeri[c]	Serum RSV nötralizasyon titeri[d]	Akciğer viral yükü[e]
A	RSV + alt birim	RSV	4,85 ±0,04	2,90 ±0,06	2,65 ±0,07
B	1:3 RSV + alt birim	RSV	4,30 ±0,05	2,20 ±0,20	4,78 ±0,39
D	normal	RSV	0,70 ±0,00	1,00 ±0,00	4,95 ±0,37
E	-	RSV	0,70 ±0,00	1,04 ±0,11	4,96 ±0,26

Kısaltmalar: Gr - grup, chal - tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") BALB/c farelerinden gelen havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[c-d] grup başına 4-8 münferit hayvanın ortalama $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 4-8 münferit hayvanın her bir g akciğeri başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

5

Tablo 5: Pasif antikorun pamuk sıçanı alıcılarında serum RSV nötralizasyon titerlerinin bozulması

Transfer sonrası gün [a]	Serum RSV nötralizasyon titeri[b]	Yarı ömür
1	2,51 ±0,00	
7	2,27 ±0,01	
14	2,24 ±0,05	
19	2,11 ±0,14	
34	1,84 ±0,08	15 gün
48	1,47 ±0,06	
[a]RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") pamuk sıçanlarından gelen seyreltilmemiş havuz haline getirilmiş kg başına 10 mg serum, 8 pamuk sıçanı içeren bir gruba i.p. yoldan enjekte edildi [b] 4 hayvanlık 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ± aralık		

Tablo 6: Pasif antikorun fare alıcılarında serum RSV nötralizasyon titerlerinin bozulması

Transfer sonrası gün [a]	Serum RSV nötralizasyon titeri[b]	Yarı ömür
1	2,87 ±0,01	
9	2,65 ±0,04	
16	2,43 ±0,03	
23	2,26 ±0,08	
36	2,08 ±0,02	14 gün
44	1,83 ±0,04	
[a]RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") BALB/c farelerinden gelen seyreltilmemiş havuz haline getirilmiş kg başına 20 mg serum, 13 BALB/c faresi içeren bir gruba i.p. yoldan enjekte edildi [b] 4-5 hayvanlık 2-3 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ± SEM		

Tablo 5: Pasif antikorun pamuk sıçanı alıcılarında serum RSV nötralizasyon titerlerinin bozulması

Transfer sonrası gün [a]	Serum RSV nötralizasyon titeri[b]	Yarı ömür
1	2,51 ±0,00	
7	2,27 ±0,01	
14	2,24 ±0,05	
19	2,11 ±0,14	
34	1,84 ±0,08	15 gün
48	1,47 ±0,06	
[a]RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") pamuk sıçanlarından gelen seyreltilmemiş havuz haline getirilmiş kg başına 10 mg serum, 8 pamuk sıçanı içeren bir gruba i.p. yoldan enjekte edildi [b] 4 hayvanlık 2 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ± aralık		

Tablo 6: Pasif antikorun fare alıcılarında serum RSV nötralizasyon titerlerinin bozulması

Transfer sonrası gün [a]	Serum RSV nötralizasyon titeri[b]	Yarı ömür
1	2,87 ±0,01	
9	2,65 ±0,04	
16	2,43 ±0,03	
23	2,26 ±0,08	
36	2,08 ±0,02	14 gün
44	1,83 ±0,04	
[a]RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") BALB/c farelerinden gelen seyreltilmemiş havuz haline getirilmiş kg başına 20 mg serum, 13 BALB/c faresi içeren bir gruba i.p. yoldan enjekte edildi [b] 4-5 hayvanlık 2-3 havuzun ortalama $\log_{10}$ titeri ± SEM		

Örnek 4: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV-immün serumu varlığında veya yokluğunda kemirgenlerde RSV SAM™ aşısıyla bir koruyucu immün yanıt indüklenmesi

1. Yöntemler

RSV* SAM™ *aşısı

Bu çalışmalarda, füzyon peptidi bölgesinde bir delesyonun olduğu tam boyda RSV proteinini şifreleyen bir RSV SAM™ (Kendi kendini Amplifiye eden Mesaj) aşısı (RNA replikonu aşısı) kullanıldı. RNA, enjeksiyon öncesinde bir katyonik nanoemülsiyon (10 mM'lik bir sitrat tamponu pH6.5 sulu fazında CNE, 4.4 mg/ml DOTAP, %0.5 SPAN 85, %0.5 Tween 80, %4.3 skualen) ile formüle edildi. CNE, bir majör modifikasyon ile daha önce tarif edildiği gibi (Ott ve arkadaşları, Journal of Controlled Release, cilt 79, sayfa 1-5, 2002) yüklü MF59'a benzer şekilde hazırlandı. DOTAP, direkt olarak skualen içerisinde çözündürüldü ve hiç organik solvent kullanılmadı.

RNA, 20 mM NaCl ve 560 mM sukroz ihtiva eden 2 mM'lik bir sitrat tamponu içerisinde 300 μg/ml'lik bir konsantrasyona kadar seyreltildi. RNA direkt olarak eşit hacimde CNE'ye ilave edilirken hafifçe vorteksleme yapıldı. Çözelti, oda sıcaklığında 1 saat kadar oturmaya bırakıldı. Kompleksleşmesi üzerine sonuçta elde edilen çözelti, uygun konsantrasyona kadar seyreltildi ve 1 saat içerisinde kullanıldı.

Örnek 4: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV-immün serumu varlığında veya yokluğunda kemirgenlerde RSV SAM™ aşısıyla bir koruyucu immün yanıt indüklenmesi

1. Yöntemler

RSV* SAM™ *aşısı

Bu çalışmalarda, füzyon peptidi bölgesinde bir delesyonun olduğu tam boyda RSV proteinini şifreleyen bir RSV SAM™ (Kendi kendini Amplifiye eden Mesaj) aşısı (RNA replikonu aşısı) kullanıldı. RNA, enjeksiyon öncesinde bir katyonik nanoemülsiyon (10 mM'lik bir sitrat tamponu pH6.5 sulu fazında CNE, 4.4 mg/ml DOTAP, %0.5 SPAN 85, %0.5 Tween 80, %4.3 skualen) ile formüle edildi. CNE, bir majör modifikasyon ile daha önce tarif edildiği gibi (Ott ve arkadaşları, Journal of Controlled Release, cilt 79, sayfa 1-5, 2002) yüklü MF59'a benzer şekilde hazırlandı. DOTAP, direkt olarak skualen içerisinde çözündürüldü ve hiç organik solvent kullanılmadı.

RNA, 20 mM NaCl ve 560 mM sukroz ihtiva eden 2 mM'lik bir sitrat tamponu içerisinde 300 μg/ml'lik bir konsantrasyona kadar seyreltildi. RNA direkt olarak eşit hacimde CNE'ye ilave edilirken hafifçe vorteksleme yapıldı. Çözelti, oda sıcaklığında 1 saat kadar oturmaya bırakıldı. Kompleksleşmesi üzerine sonuçta elde edilen çözelti, uygun konsantrasyona kadar seyreltildi ve 1 saat içerisinde kullanıldı.

Serum transferi, aşılama ve kemirgenlerin RSV ile enfeksiyonu

RSV ile enfekte edilmiş ve RSV SAM aşısı ile boost edilmiş olan yetişkin dişi pamuk sıçanlarından gelen susuz veya 1:3 oranında bir seyreltmede serum, i.p. yoldan (10 mg/kg), 16 adet RSV-naif, immünize edilmemiş yetişkin pamuk sıçanı içeren gruplara enjekte edildi. Kontrol pamuk sıçanlarının olduğu gruplara, seyreltilmemiş normal pamuk sıçanı serumu i.p. yoldan enjekte edildi ve bunlar tedavi edilmedi. Her bir gruptaki hayvanların yarısı, çalışmanın 2 ve 20nci günlerinde 15 μg RSV SAM aşısı (1 arka uzuvda 100 μl toplam hacim) ile i.m. yoldan aşılandı. Pamuk sıçanlarının tamamı, 49uncu günde $1x10^5$ pfu RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi ve 5 gün sonra T hücresi ve viral yük analizleri için dalaklar ve akciğerler hasat edildi. Benzer bir çalışma, BALB/c farelerinde pasif RSV-immün veya normal fare serumu transferini takiben her bir grubun bir alt grubunun 15 μg RSV SAM aşısı (2 arka uzuv arasında bölünen 100 μl toplam hacim) ile aşılanmasıyla yapıldı, ancak serum dozu, 20 ml/kg idi; RSV SAM aşıları, 2 ve 22nci günlerde uygulandı; gruplara, F'ye özel T hücresi analizi için 36ncı günde dalakları hasat edilen 5 ila ilave hayvan dahil edildi; fareler, 45inci günde $3x10^6$ pfu RSV ile tehdit edildi ve akciğerler ve dalaklar, 49uncu günde hasat edildi. Bu çalışmalarda transfer için kullanılan pamuk sıçanı ve fare serumu havuzları, Örnek 3'te kullanılanlara özdeşti.

RSV nötralizasyon deneyi ve F'ye özel IgG ELISA

Bu deneyler, Örnek 2'de tarif edildiği gibi yapıldı.

Serum transferi, aşılama ve kemirgenlerin RSV ile enfeksiyonu

RSV ile enfekte edilmiş ve RSV SAM aşısı ile boost edilmiş olan yetişkin dişi pamuk sıçanlarından gelen susuz veya 1:3 oranında bir seyreltmede serum, i.p. yoldan (10 mg/kg), 16 adet RSV-naif, immünize edilmemiş yetişkin pamuk sıçanı içeren gruplara enjekte edildi. Kontrol pamuk sıçanlarının olduğu gruplara, seyreltilmemiş normal pamuk sıçanı serumu i.p. yoldan enjekte edildi ve bunlar tedavi edilmedi. Her bir gruptaki hayvanların yarısı, çalışmanın 2 ve 20nci günlerinde 15 μg RSV SAM aşısı (1 arka uzuvda 100 μl toplam hacim) ile i.m. yoldan aşılandı. Pamuk sıçanlarının tamamı, 49uncu günde $1x10^5$ pfu RSV ile i.n. yoldan tehdit edildi ve 5 gün sonra T hücresi ve viral yük analizleri için dalaklar ve akciğerler hasat edildi. Benzer bir çalışma, BALB/c farelerinde pasif RSV-immün veya normal fare serumu transferini takiben her bir grubun bir alt grubunun 15 μg RSV SAM aşısı (2 arka uzuv arasında bölünen 100 μl toplam hacim) ile aşılanmasıyla yapıldı, ancak serum dozu, 20 ml/kg idi; RSV SAM aşıları, 2 ve 22nci günlerde uygulandı; gruplara, F'ye özel T hücresi analizi için 36ncı günde dalakları hasat edilen 5 ila ilave hayvan dahil edildi; fareler, 45inci günde $3x10^6$ pfu RSV ile tehdit edildi ve akciğerler ve dalaklar, 49uncu günde hasat edildi. Bu çalışmalarda transfer için kullanılan pamuk sıçanı ve fare serumu havuzları, Örnek 3'te kullanılanlara özdeşti.

RSV nötralizasyon deneyi ve F'ye özel IgG ELISA

Bu deneyler, Örnek 2'de tarif edildiği gibi yapıldı.

RSV plak deneyi

Bu deney, Örnek 3'te tarif edildiği gibi yapıldı.

Pamuk sıçanı fonksiyonel T hücresi deneyi: sekrete edilen sitokinler için hücre bazlı ELISA

Antijene özel sıçan IFNγ ve IL-4 sekresyonu, aşağıdaki protokol modifikasyonlartı ile R&D Systems'den kitler kullanılarak ELISA yoluyla ölçüldü. Sitokin yakalama antikoru ile kaplı plakalara, 200 µL serumsuz T hücresi ortamında (RPMI, 10 mM HEPES, 100 µM esansiyel olmayan amino asitler, 50 µM 2-mersaptoetanol ve antibiyotikler) splenositler (3-4 x 10^5 canlı, çekirdeklenmiş hücreler) ilave edildi. Hücreler, her biri 5 µM olmak üzere üç RSV F peptidi (F29-43, F49-63 ve F247-261) içeren bir kokteyl ile uyarıldı. Rekombinant sitokin protein standartları, T hücresi ortamı + %1 FBS içinde seyreltildi. 24 saat sonra sekrete edilmiş olan sitokinler, üreticinin tavsiyelerine göre saptandı. Sonuçlar, net pg/ml olarak bildirilir (uyaranlı triplikat oyukların ortalaması - uyaransız triplikat oyukların ortalaması).

Fare fonksiyonel T hücresi deneyi: Hücre içi sitokin boyaması ve akış sitometresi

Belirtilen çalışmada dalaklar hasat edildi ve tek hücreli süspansiyonlar halinde işlendi. Münferit hayvanlardan splenositlerin ayrı ayrı deneye tabi tutulduğu durumda her bir hayvan için 1 antijenle uyrılmış ve 1 uyarılmamış kültür oluşturuldu ve bir gruptaki bütün hayvanlardan

RSV plak deneyi

Bu deney, Örnek 3'te tarif edildiği gibi yapıldı.

Pamuk sıçanı fonksiyonel T hücresi deneyi: sekrete edilen sitokinler için hücre bazlı ELISA

Antijene özel sıçan IFNγ ve IL-4 sekresyonu, aşağıdaki protokol modifikasyonlartı ile R&D Systems'den kitler kullanılarak ELISA yoluyla ölçüldü. Sitokin yakalama antikoru ile kaplı plakalara, 200 µL serumsuz T hücresi ortamında (RPMI, 10 mM HEPES, 100 µM esansiyel olmayan amino asitler, 50 µM 2-mersaptoetanol ve antibiyotikler) splenositler (3-4 x 10^5 canlı, çekirdeklenmiş hücreler) ilave edildi. Hücreler, her biri 5 µM olmak üzere üç RSV F peptidi (F29-43, F49-63 ve F247-261) içeren bir kokteyl ile uyarıldı. Rekombinant sitokin protein standartları, T hücresi ortamı + %1 FBS içinde seyreltildi. 24 saat sonra sekrete edilmiş olan sitokinler, üreticinin tavsiyelerine göre saptandı. Sonuçlar, net pg/ml olarak bildirilir (uyaranlı triplikat oyukların ortalaması - uyaransız triplikat oyukların ortalaması).

Fare fonksiyonel T hücresi deneyi: Hücre içi sitokin boyaması ve akış sitometresi

Belirtilen çalışmada dalaklar hasat edildi ve tek hücreli süspansiyonlar halinde işlendi. Münferit hayvanlardan splenositlerin ayrı ayrı deneye tabi tutulduğu durumda her bir hayvan için 1 antijenle uyrılmış ve 1 uyarılmamış kültür oluşturuldu ve bir gruptaki bütün hayvanlardan

gelen splenositlerin birleştirildiği ve bir havuz halinde deneye tabi tutulduğu durumda her bir havuz için 2 adet antijenle uyarılmış kültür ve iki adet uyarılmamış kültür oluşturuldu. Antijenle uyarılmış kültürler, $1x10^6$ splenosit, RSV F peptitleri 85-93 ve 249-258 (her biri 1 mM), RSV F peptitleri 51-66, 164-178 ve 309-323 (her biri 5mM), anti-CD28 mAb (1 μg/mL) ve Brefeldin A (1:1000) ihtiva ediyordu. Uyarılmamış kültürler, RSV F peptitleri ihtiva etmiyordu ve uyarılmış kültürlere başka şekilde özdeşti. 37°C'de 6 saat süreyle kültürlendikten sonra kültürler, immünoflöresan için işlendi. Hücreler yıkandı ve daha sonra flöresan etiketli anti-CD4 ve anti-CD8 monoklonal antikorları (mAb) ile boyandı. Hücreler tekrar yıkandı ve sonra Cytofix/Cytoperm ile 20 dakika süreyle sabitlendi. Sabitlenmiş hücreler daha sonra Perm-yıkama tamponu ile yıkandı ve ardından IFNγ, TNFα, IL-2 ve IL-5'e özel floresan etiketli mAbler ile boyandı. Boyanan hücreler yıkandı ve bir LSR II akış sitometrisi üzerinde analiz edildi. Edinilen verileri analiz etmek için FlowJo yazılımı kullanıldı. CD4+8- ve CD8+4- T hücresi alt kümeleri ayrı ayrı analiz edildi. Verilen bir örnekteki her bir altküme için sitokin pozitif hücrelerin yüzdesi belirlendi. RSV F antijenine özel T hücreleri yüzdesi, antijenle uyarılmış kültürler içerisindeki % sitokin pozitif hücreler ile uyarılmamış kültürler içerisindeki yüzde sitokin poztif hücreler arasındaki fark olarak hesaplandı.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

RSV-naif bebeklerde RSV SAM aşınının kullanımını modellemek için biz, RSV SAM aşısının RSV-naif pamuk sıçanlarında ve BALB/c farelerinde immünojenisitesini ve etkililiğini değerlendirdik. RSV

gelen splenositlerin birleştirildiği ve bir havuz halinde deneye tabi tutulduğu durumda her bir havuz için 2 adet antijenle uyarılmış kültür ve iki adet uyarılmamış kültür oluşturuldu. Antijenle uyarılmış kültürler, $1x10^6$ splenosit, RSV F peptitleri 85-93 ve 249-258 (her biri 1 mM), RSV F peptitleri 51-66, 164-178 ve 309-323 (her biri 5mM), anti-CD28 mAb (1 μg/mL) ve Brefeldin A (1:1000) ihtiva ediyordu. Uyarılmamış kültürler, RSV F peptitleri ihtiva etmiyordu ve uyarılmış kültürlere başka şekilde özdeşti. 37°C'de 6 saat süreyle kültürlendikten sonra kültürler, immünoflöresan için işlendi. Hücreler yıkandı ve daha sonra flöresan etiketli anti-CD4 ve anti-CD8 monoklonal antikorları (mAb) ile boyandı. Hücreler tekrar yıkandı ve sonra Cytofix/Cytoperm ile 20 dakika süreyle sabitlendi. Sabitlenmiş hücreler daha sonra Perm-yıkama tamponu ile yıkandı ve ardından IFNγ, TNFα, IL-2 ve IL-5'e özel floresan etiketli mAbler ile boyandı. Boyanan hücreler yıkandı ve bir LSR II akış sitometrisi üzerinde analiz edildi. Edinilen verileri analiz etmek için FlowJo yazılımı kullanıldı. CD4+8- ve CD8+4- T hücresi alt kümeleri ayrı ayrı analiz edildi. Verilen bir örnekteki her bir altküme için sitokin pozitif hücrelerin yüzdesi belirlendi. RSV F antijenine özel T hücreleri yüzdesi, antijenle uyarılmış kültürler içerisindeki % sitokin pozitif hücreler ile uyarılmamış kültürler içerisindeki yüzde sitokin poztif hücreler arasındaki fark olarak hesaplandı.

2. Sonuçlar ve Çıkarımlar

RSV-naif bebeklerde RSV SAM aşınının kullanımını modellemek için biz, RSV SAM aşısının RSV-naif pamuk sıçanlarında ve BALB/c farelerinde immünojenisitesini ve etkililiğini değerlendirdik. RSV

SAM aşısı, 15 μg RSV SAM aşısının 2nci i.m. yoldan aşılanmasından 3-4 hafta sonra ölçüldüğü durumda pamuk sıçanlarında 1:776 ve farelerde 1:209'luk serum RSV nötraliyon titerleri ortaya çıkarmakla her iki türde de immünojenikti (Tablo 7 ve 8, H grupları). Farelerde RSV SAM aşısı, anlamlı bir IL-5 üretimi olmadan IFNγ, TNFα ve IL-2 üretilmesiyle karakterize edilen şekilde kuvvetli bir F'ye özel CD8+ T hücresi yanıtı ve orta düzeyde bir Th1 CD4+ T hücresi yanıtı ortaya çıkardı (Tablo 9, grup H). Her iki türde de RSV SAM RNA aşısı, 2nci RNA aşılamasından 3-4 hafta sonra uygulanan bir nazal RSV tehdidinden, pulmoner viral yüklerde, immünize edilmemiş kontrol hayvanlarına kıyasla %99.9'dan fazla azalma olmasıyla kanıtlanan şekilde, neredeyse tam koruma sağladı (Tablo 7 ve 8, grup D'ye kıyasla grup H).

RSV nötralize edici antikorlar, plasentadan geçmek suretiyle anneden bebeğe pasif şekilkde aktarılır ve bunlar, bebekleri, yaşamlarının ilk birkaç ayında ciddi RSV hastalığından korur; bununla birlikte aynı antikorlar, RSV SAM aşısına yönelik aktif immün yanıta da müdahale edebilir. Bu nedenle biz, RNA SAM aşısının kemirgenlerdeki immünojenisitesinin ve etkililiğinin, pasif şekilde edinilen RSV'ye özel antikordan etkilenip etkilenmediğini de araştırdık. RSV nötralize edici ve F'ye özel IgG yanıtları, RSV ile enfekte edilmiş, RSV F alt birim aşısı ile boost edilmiş kemirgenlerden susuz veya 1:3'lük bir seyreltme oranında serumun pasif transferinden bir gün sonra alucu kemirgenlerin serumunda kolaylıkla saptanabildi (Tablo 7-8). RSV-immün serumunun transferinden kırk sekiz gün sonra RSV nötrralizasyon titerleri, aşılanmamış alıcı pamuk sıçanlarında çok düşük veya saptanamaz seviyelere düştü ancak RNA ile aşılanmış

SAM aşısı, 15 μg RSV SAM aşısının 2nci i.m. yoldan aşılanmasından 3-4 hafta sonra ölçüldüğü durumda pamuk sıçanlarında 1:776 ve farelerde 1:209'luk serum RSV nötraliyon titerleri ortaya çıkarmakla her iki türde de immünojenikti (Tablo 7 ve 8, H grupları). Farelerde RSV SAM aşısı, anlamlı bir IL-5 üretimi olmadan IFNγ, TNFα ve IL-2 üretilmesiyle karakterize edilen şekilde kuvvetli bir F'ye özel CD8+ T hücresi yanıtı ve orta düzeyde bir Th1 CD4+ T hücresi yanıtı ortaya çıkardı (Tablo 9, grup H). Her iki türde de RSV SAM RNA aşısı, 2nci RNA aşılamasından 3-4 hafta sonra uygulanan bir nazal RSV tehdidinden, pulmoner viral yüklerde, immünize edilmemiş kontrol hayvanlarına kıyasla %99.9'dan fazla azalma olmasıyla kanıtlanan şekilde, neredeyse tam koruma sağladı (Tablo 7 ve 8, grup D'ye kıyasla grup H).

RSV nötralize edici antikorlar, plasentadan geçmek suretiyle anneden bebeğe pasif şekilkde aktarılır ve bunlar, bebekleri, yaşamlarının ilk birkaç ayında ciddi RSV hastalığından korur; bununla birlikte aynı antikorlar, RSV SAM aşısına yönelik aktif immün yanıta da müdahale edebilir. Bu nedenle biz, RNA SAM aşısının kemirgenlerdeki immünojenisitesinin ve etkililiğinin, pasif şekilde edinilen RSV'ye özel antikordan etkilenip etkilenmediğini de araştırdık. RSV nötralize edici ve F'ye özel IgG yanıtları, RSV ile enfekte edilmiş, RSV F alt birim aşısı ile boost edilmiş kemirgenlerden susuz veya 1:3'lük bir seyreltme oranında serumun pasif transferinden bir gün sonra alucu kemirgenlerin serumunda kolaylıkla saptanabildi (Tablo 7-8). RSV-immün serumunun transferinden kırk sekiz gün sonra RSV nötrralizasyon titerleri, aşılanmamış alıcı pamuk sıçanlarında çok düşük veya saptanamaz seviyelere düştü ancak RNA ile aşılanmış

olanlarda >1:50 idi (Tablp 7, grup E ve F'ye kıyasla grup A ve B). Bu veriler, RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş immün serum varlığında da bir RSV nötralize edici yanıt indükleyebildiğini ortaya koyar. Bununla brilikte RSV SAM aşısının indüklediği nötralize edici yanıt, pasif RSV'ye özel antikor varlığında, bu antikorun olmasığı durumunda yaklaşık olarak 10 kat daha düşüktü (Tablo 7, gruplar G ve H'ye kıyasla gruplar E ve F). BALB/c farelerinde ikinci RSV SAM aşılamasından sonra ölçülen RSV nötralize edici titerler, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikorun olduğu veya olmadığı durumda benzerdi (Tablo 8, G ve H gruplarına kıyasla E ve F grupları). Her ne kadar bu veriler, pasif şekilde transfer edilen antikorun, farelerde RSV SAM aşısının indüklediği antikor yanıtını inhibe etmediğini işaret etse de RSV SAM ile aşılanmış farelerde serum transferinden 44 gün sonra nötralize edici titerin, RSV SAM aşısının indüklediği titer ve pasif transferden kalanın bir kombinasyonu olduğu kaydedilmelidir (bu noktada aşılanmamış farelerde nötralize edici antikor hala saptanabiliyordu). Bu nedenle pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikorun, RSV SAM aşısının indüklediği antikor yanıtını, farelerde de bir dereceye kadar inhibe etmesi muhtemeldir.

Her ne kadar pasif şekilde transfer edilen RSV'ye özel antikor, kemirgenlerde RSV SAM'ın indüklediği antikor yanıtını kısmen baskılasa da bu, RSV SAM'ın indüklediği T hücresi yanıtını baskılamaz. Pamuk sıçanlarında RSV enfeksiyonundan 5 gün sonra splenik F'ye özl IFNγ yanıtının büyüklüğü, hayvanların aşılama öncesinde serumla dozlanmış olup olmadığından bağımsız olarak RSV SAM ile aşılanmış hayvanlarda denkti (Tablo 10, H'ye kıyasla E

olanlarda >1:50 idi (Tablp 7, grup E ve F'ye kıyasla grup A ve B). Bu veriler, RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş immün serum varlığında da bir RSV nötralize edici yanıt indükleyebildiğini ortaya koyar. Bununla brilikte RSV SAM aşısının indüklediği nötralize edici yanıt, pasif RSV'ye özel antikor varlığında, bu antikorun olmasığı durumunda yaklaşık olarak 10 kat daha düşüktü (Tablo 7, gruplar G ve H'ye kıyasla gruplar E ve F). BALB/c farelerinde ikinci RSV SAM aşılamasından sonra ölçülen RSV nötralize edici titerler, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikorun olduğu veya olmadığı durumda benzerdi (Tablo 8, G ve H gruplarına kıyasla E ve F grupları). Her ne kadar bu veriler, pasif şekilde transfer edilen antikorun, farelerde RSV SAM aşısının indüklediği antikor yanıtını inhibe etmediğini işaret etse de RSV SAM ile aşılanmış farelerde serum transferinden 44 gün sonra nötralize edici titerin, RSV SAM aşısının indüklediği titer ve pasif transferden kalanın bir kombinasyonu olduğu kaydedilmelidir (bu noktada aşılanmamış farelerde nötralize edici antikor hala saptanabiliyordu). Bu nedenle pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikorun, RSV SAM aşısının indüklediği antikor yanıtını, farelerde de bir dereceye kadar inhibe etmesi muhtemeldir.

Her ne kadar pasif şekilde transfer edilen RSV'ye özel antikor, kemirgenlerde RSV SAM'ın indüklediği antikor yanıtını kısmen baskılasa da bu, RSV SAM'ın indüklediği T hücresi yanıtını baskılamaz. Pamuk sıçanlarında RSV enfeksiyonundan 5 gün sonra splenik F'ye özl IFNγ yanıtının büyüklüğü, hayvanların aşılama öncesinde serumla dozlanmış olup olmadığından bağımsız olarak RSV SAM ile aşılanmış hayvanlarda denkti (Tablo 10, H'ye kıyasla E

grubu). Bu sonuçlar, ikinci RSV SAM aşılamasından 14 gün sonra veya RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra ölçülen splenik F'ye özel $CD4^+$ T ve $CD8^+$ yanıtlarının, pasif şekilde transfer edilmiş serum varlığında veya yokluğunda denk olduğu farelerde benzerdi (Tablo 9 ve 11, G ve H'ye kıyasla E grubu).

RSV SAM aşısının, RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim sşısı ile boost edilmiş donörlerden gelen pasif antikor varlığında bir koruyucu immün yanıt indükleyebilip indükleyemediğini belirlemek için pamuk sıçanları veya fareler, RSV-immün serumu ile inoküle edildi, iki kez RSV SAM aşısı ile aşılandı ve 3-4 hafta sonra RSV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan dört ila beş gün sonra bu hayvanlardaki akciğer viral yükü, RSV enfekisyonu öncesinde serum veya RNA ile dozlanmamış kontrol hayvanlarındakinden en az $1.4\log_{10}$ daha düşüktü (Tablo 7 ve 8, D'ye kıyasla E ve F grupları). Pasif şekilde transfer edilmiş antikor, bu süre itibariyle metabolize edilmiş olduğundan ve bu nedenle immünize edilmemiş hayvanları RSV tehdidinden korumadığından (Tablo 7 ve 8, A ve B grupları) herhangi bir koruyucu etki, RSV SAM aşısına yorulabilir. Bu veriler bu nedenle RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında bir koruyucu immün yanıt indükleyebildiğini ortaya koyar. Bununla birlikte RSV SAM aşısının koruyucu etkililiği, pasif RSV'ye özel serum olmadığı durumda daha fazla idi (Tablo 7 ve 8, G ve H grupları).

Sonuç itibariyle bu sonuçlar, RSV F alt birim aşısı ile aşılanmış annelerin doğurduğu bebeklerde RSV SAM aşısı kullanılmasını destekler çünkü bunlar, iki kemirgen modelinde, RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında bir

grubu). Bu sonuçlar, ikinci RSV SAM aşılamasından 14 gün sonra veya RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra ölçülen splenik F'ye özel $CD4^+$ T ve $CD8^+$ yanıtlarının, pasif şekilde transfer edilmiş serum varlığında veya yokluğunda denk olduğu farelerde benzerdi (Tablo 9 ve 11, G ve H'ye kıyasla E grubu).

RSV SAM aşısının, RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim sşısı ile boost edilmiş donörlerden gelen pasif antikor varlığında bir koruyucu immün yanıt indükleyebilip indükleyemediğini belirlemek için pamuk sıçanları veya fareler, RSV-immün serumu ile inoküle edildi, iki kez RSV SAM aşısı ile aşılandı ve 3-4 hafta sonra RSV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan dört ila beş gün sonra bu hayvanlardaki akciğer viral yükü, RSV enfekisyonu öncesinde serum veya RNA ile dozlanmamış kontrol hayvanlarındakinden en az $1.4\log_{10}$ daha düşüktü (Tablo 7 ve 8, D'ye kıyasla E ve F grupları). Pasif şekilde transfer edilmiş antikor, bu süre itibariyle metabolize edilmiş olduğundan ve bu nedenle immünize edilmemiş hayvanları RSV tehdidinden korumadığından (Tablo 7 ve 8, A ve B grupları) herhangi bir koruyucu etki, RSV SAM aşısına yorulabilir. Bu veriler bu nedenle RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında bir koruyucu immün yanıt indükleyebildiğini ortaya koyar. Bununla birlikte RSV SAM aşısının koruyucu etkililiği, pasif RSV'ye özel serum olmadığı durumda daha fazla idi (Tablo 7 ve 8, G ve H grupları).

Sonuç itibariyle bu sonuçlar, RSV F alt birim aşısı ile aşılanmış annelerin doğurduğu bebeklerde RSV SAM aşısı kullanılmasını destekler çünkü bunlar, iki kemirgen modelinde, RSV SAM aşısının, pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında bir

koruyucu immün yanıt indükleyebildiğine dair klinik öncesi kanıtlar sunar. Her ne kadar RSV SAM aşısının indüklediği RSV nötralizasyon yanıtı, pasif antikor tarafından bir şekilde baskılansa da T hücresi yanıtı baskılanmadı ve bu nedenle de koruma mekanizması muhtemelen hücre aracılı immünite idi.

Tablo 12'de özetlendiği gibi, Örnek 2-4'ten gelen veriler, RSV ikili aşılama stratejisini destekler; sadece 0ıncı günde RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş donörlerden gelen serum ile dozlanan ve sonra 2 ve 20nci günlerde RSV SAM aşısı ile aşılanan pamuk sıçanları, bir erken (2nci gün) ve bir geç (49uncu gün) RSV tehdidinden korundu.

koruyucu immün yanıt indükleyebildiğine dair klinik öncesi kanıtlar sunar. Her ne kadar RSV SAM aşısının indüklediği RSV nötralizasyon yanıtı, pasif antikor tarafından bir şekilde baskılansa da T hücresi yanıtı baskılanmadı ve bu nedenle de koruma mekanizması muhtemelen hücre aracılı immünite idi.

Tablo 12'de özetlendiği gibi, Örnek 2-4'ten gelen veriler, RSV ikili aşılama stratejisini destekler; sadece 0ıncı günde RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş donörlerden gelen serum ile dozlanan ve sonra 2 ve 20nci günlerde RSV SAM aşısı ile aşılanan pamuk sıçanları, bir erken (2nci gün) ve bir geç (49uncu gün) RSV tehdidinden korundu.

Tablo 7: Pamuk sıçanlarında pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM aşısının immünojenisitesi ve etkililiği

Gr.	Bir serum transferi (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 20)	Tehdit[c] (gün 49)	Serum F'ye özel IgG titeri[d]				Serum RSV nötralizasyon titeri[e]				Akciğer [f]viral yükü
				Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	1nci aşılamadan 17 gün sonra (gün 19)	2nci aşılamadan 28 gün sonra (gün 48)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)	Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	1nci aşılamadan 17 gün sonra (gün 19)	2nci aşılamadan 28 gün sonra (gün 48)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)
A	RSV + alt birim	-	RSV	2,94±0,07	2,23±0,06	0,70±0,00	0,70±0,00	2,51±0,00	2,11±0,14	1,47±0,06	1,73±0,14	4,90±0,39
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	2,36±0,06	1,67±0,06	0,70±0,00	0,70±0,00	2,09±0,01	1,73±0,09	1,17±0,17	1,72±0,13	4,82±0,39
C	normal	-	RSV	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	1,17±0,17	1,20±0,20	1,16±0,16	1,93±0,17	5,42±0,25
D	-	-	RSV	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,69±0,14	5,17±0,35
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2,83±0,09	2,14±0,16	2,03±0,30	2,42±0,30	2,44±0,02	1,91±0,04	1,86±0,10	2,23±0,09	3,82±0,42
F	1:3 RSV	RSV	RSV	2,34±0,08	2,02±0,22	2,75±0,33	2,99±0,28	2,09±0,04	1,79±0,05	1,73±0,15	2,37±0,01	3.68± 0.72

Tablo 7: Pamuk sıçanlarında pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM aşısının immünojenisitesi ve etkililiği

Gr.	Bir serum transferi (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 20)	Tehdit[c] (gün 49)	Serum F'ye özel IgG titeri[d]				Serum RSV nötralizasyon titeri[e]				Akciğer [f]viral yükü
				Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	1nci aşılamadan 17 gün sonra (gün 19)	2nci aşılamadan 28 gün sonra (gün 48)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)	Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	1nci aşılamadan 17 gün sonra (gün 19)	2nci aşılamadan 28 gün sonra (gün 48)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)	RSV tehdidinden 5 gün sonra (gün 54)
A	RSV + alt birim	-	RSV	2,94±0,07	2,23±0,06	0,70±0,00	0,70±0,00	2,51±0,00	2,11±0,14	1,47±0,06	1,73±0,14	4,90±0,39
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	2,36±0,06	1,67±0,06	0,70±0,00	0,70±0,00	2,09±0,01	1,73±0,09	1,17±0,17	1,72±0,13	4,82±0,39
C	normal	-	RSV	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	1,17±0,17	1,20±0,20	1,16±0,16	1,93±0,17	5,42±0,25
D	-	-	RSV	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	0,70±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,69±0,14	5,17±0,35
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2,83±0,09	2,14±0,16	2,03±0,30	2,42±0,30	2,44±0,02	1,91±0,04	1,86±0,10	2,23±0,09	3,82±0,42
F	1:3 RSV	RSV	RSV	2,34±0,08	2,02±0,22	2,75±0,33	2,99±0,28	2,09±0,04	1,79±0,05	1,73±0,15	2,37±0,01	3.68± 0.72

	+ alt birim	SAM										
G	normal	RSV SAM	RSV	0,70±0,00	3,14±0,19	3,52±0,19	3,67±0,14	1,00±0,00	2,36±0,13	3,06±0,02	3,18±0,01	2,18±0,19
	H	RSV - SAM	RSV	0,70±0,00	3,32±0,11	3,40±0,21	3,48±0,27	1,00±0,00	2,58±0,11	2,89±0,15	3,00±0,22	2.12± 0.17

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, trans - transfer, vacc - aşılama, chal-tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş ve 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan njekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 7-8 minferit hayvanda ortalama mean log_{10} titeri ± standart sapma

[e] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzda ortalama log_{10} titeri ± aralık

[f] grup başına 7-8 münferit hayvanda her bir g akciğer başına ortalama log_{10} pfu ± standart sapma

	+ alt birim	SAM										
G	normal	RSV SAM	RSV	0,70±0,00	3,14±0,19	3,52±0,19	3,67±0,14	1,00±0,00	2,36±0,13	3,06±0,02	3,18±0,01	2,18±0,19
	H	RSV - SAM	RSV	0,70±0,00	3,32±0,11	3,40±0,21	3,48±0,27	1,00±0,00	2,58±0,11	2,89±0,15	3,00±0,22	2.12± 0.17

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, trans - transfer, vacc - aşılama, chal-tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serum. Gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş ve 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan njekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 7-8 minferit hayvanda ortalama mean log_{10} titeri ± standart sapma

[e] grup başına 3-4 hayvan içeren 2 havuzda ortalama log_{10} titeri ± aralık

[f] grup başına 7-8 münferit hayvanda her bir g akciğer başına ortalama log_{10} pfu ± standart sapma

Tablo 8: BALB/c farelerinde pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısının immünojenisitesi ve etkililiği

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	Serum F'ye özel IgG titeri[d]	Serum RSV nötralizasyon titeri[e]							Akciğer viral yüküf
				Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	2nci aşılamadan 1 gün sonra (gün 23)	2nci aşılamadan 22 gün sonra (gün 44)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (gün 49)	Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	2nci aşılamadan 1 gün sonra (gün 23)	2nci aşılamadan 22 gün sonra (d44)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (gün 49)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (d49)
A	RSV + alt birim	-	RSV	4,88±0,06	4,30±0,07	3,69±0,32	3,98±0,06	2,87±0,01	2,26±0,08	1,83±0,04	1,86±0,01	4,91±0,24
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	4,28±0,16	3,67±0,14	3,29±0,19	3,18±0,22	2,39±0,02	1,78±0,04	1,44±0,01	1,54±0,01	5,02±0,31
C	normal	-	RSV	0,07±0,00	n.t.	0,07±0,00	0,07±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,16±0,16	5,14±0,40
D	-	-	RSV	0,07±0,00	n.t.	0,07±0,00	0,07±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	5,21±0,42
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	4,88±0,05	4,16±0,08	3,70±0,09	3,46±0,12	2,95±0,08	2,12±0,11	2,47±0,11	2,62±0,15	3,58±0,46
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	4,34±0,04	3,61±0,05	3,20±0,03	3,17±0,08	2,41±0,12	1,73±0,11	2,01±0,07	2,03±0,14	3,12±0,47

Tablo 8: BALB/c farelerinde pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısının immünojenisitesi ve etkililiği

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	Serum F'ye özel IgG titeri[d]	Serum RSV nötralizasyon titeri[e]							Akciğer viral yüküf
				Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	2nci aşılamadan 1 gün sonra (gün 23)	2nci aşılamadan 22 gün sonra (gün 44)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (gün 49)	Serum transferinden 1 gün sonra (gün 1)	2nci aşılamadan 1 gün sonra (gün 23)	2nci aşılamadan 22 gün sonra (d44)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (gün 49)	RSV tehdidinden 4 gün sonra (d49)
A	RSV + alt birim	-	RSV	4,88±0,06	4,30±0,07	3,69±0,32	3,98±0,06	2,87±0,01	2,26±0,08	1,83±0,04	1,86±0,01	4,91±0,24
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	4,28±0,16	3,67±0,14	3,29±0,19	3,18±0,22	2,39±0,02	1,78±0,04	1,44±0,01	1,54±0,01	5,02±0,31
C	normal	-	RSV	0,07±0,00	n.t.	0,07±0,00	0,07±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,16±0,16	5,14±0,40
D	-	-	RSV	0,07±0,00	n.t.	0,07±0,00	0,07±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	5,21±0,42
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	4,88±0,05	4,16±0,08	3,70±0,09	3,46±0,12	2,95±0,08	2,12±0,11	2,47±0,11	2,62±0,15	3,58±0,46
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	4,34±0,04	3,61±0,05	3,20±0,03	3,17±0,08	2,41±0,12	1,73±0,11	2,01±0,07	2,03±0,14	3,12±0,47

G	normal	RSV SAM	RSV	0,07±0,00	3,55±0,42	4,38±0,55	4,29±0,53	1,00±0,00	1,00±0,00	1,85±0,13	2,24±0,22	2,11±0,22
	-	RSV SAM	RSV	0,07±0,00	3,35±0,90	4,11±0,40	3,98±0,37	1,00±0,00	1,00±0,00	2,32±0,12	2,18±0,40	2,10±0,18

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, trans - transfer, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş ve 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan njekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 8-13 münferit hayvanda ortalama mean $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 3-4 hayvan içeren 2-3 havuzdan 2 havuzda ortalama $\log_{10}$ titeri ± aralık

[f] grup başına 8 münferit hayvanda her bir g akciğer başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

G	normal	RSV SAM	RSV	0,07±0,00	3,55±0,42	4,38±0,55	4,29±0,53	1,00±0,00	1,00±0,00	1,85±0,13	2,24±0,22	2,11±0,22
	-	RSV SAM	RSV	0,07±0,00	3,35±0,90	4,11±0,40	3,98±0,37	1,00±0,00	1,00±0,00	2,32±0,12	2,18±0,40	2,10±0,18

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, trans - transfer, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş ve 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan njekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 8-13 münferit hayvanda ortalama mean $\log_{10}$ titeri ± standart sapma

[e] grup başına 3-4 hayvan içeren 2-3 havuzdan 2 havuzda ortalama $\log_{10}$ titeri ± aralık

[f] grup başına 8 münferit hayvanda her bir g akciğer başına ortalama $\log_{10}$ pfu ± standart sapma

Tablo 9: BALB/c farelerinde pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısının indüklediği F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	2nci aşılamadan 14 gün sonra $CD4^{-d}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$ (gün 36)				2nci aşılamadan 14 gün sonra $CD8^{+e}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$ (gün 36)			
				IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5	IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5
A	RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,02	0,01±0,01	0,00±0,01	0,02±0,02
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
C	normal	-	RSV	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
D	-	-	RSV	0,00±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,01	0,01±0,02	0,01±0,01	0,02±0,03
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,08±0,05	0,12±0,08	0,12±0,07	0,00±0,00	0,77±0,50	0,69±0,42	0,17±0,10	0,01±0,02
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,07±0,02	0,16±0,04	0,15±0,03	0,01±0,01	1,11±0,62	1,00±0,64	0,27±0,06	0,01±0,01
G	normal	RSV SAM	RSV	0,04±0,02	0,09±0,02	0,10±0,02	0,00±0,01	1,16±0,30	1,06±0,25	0,26±0,09	0,03±0,03
H	-	RSV SAM	RSV	0,05±0,03	0,12±0,05	0,12±0,06	0,01±0,01	2,47±1,55	2,24±1,38	0,51±0,33	0,01±0,02

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d-e] grup başına 4-5 münferit hayvanda (dalaklar) ortalama % yanıt ± standart sapma

Tablo 9: BALB/c farelerinde pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısının indüklediği F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	2nci aşılamadan 14 gün sonra $CD4^{-d}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$ (gün 36)				2nci aşılamadan 14 gün sonra $CD8^{+e}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$ (gün 36)			
				IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5	IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5
A	RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,02	0,01±0,01	0,00±0,01	0,02±0,02
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
C	normal	-	RSV	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
D	-	-	RSV	0,00±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,01	0,01±0,02	0,01±0,01	0,02±0,03
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,08±0,05	0,12±0,08	0,12±0,07	0,00±0,00	0,77±0,50	0,69±0,42	0,17±0,10	0,01±0,02
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,07±0,02	0,16±0,04	0,15±0,03	0,01±0,01	1,11±0,62	1,00±0,64	0,27±0,06	0,01±0,01
G	normal	RSV SAM	RSV	0,04±0,02	0,09±0,02	0,10±0,02	0,00±0,01	1,16±0,30	1,06±0,25	0,26±0,09	0,03±0,03
H	-	RSV SAM	RSV	0,05±0,03	0,12±0,05	0,12±0,06	0,01±0,01	2,47±1,55	2,24±1,38	0,51±0,33	0,01±0,02

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d-e] grup başına 4-5 münferit hayvanda (dalaklar) ortalama % yanıt ± standart sapma

Tablo 10: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısı ile aşılanmış pamuk sıçanlarında RSV tehdidi sonrası F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 20)	Tehdit[c] (gün 49)	RSV tehdidinden 5 gün sonra F'ye özel sekrete edilen sitokin (gün 54)[d]	
				IFNγ	IL-4
A	RSV + alt birim	-	RSV	342±138	2,6±0,8
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	1412±404	3,0±0,8
C	normal	-	RSV	176±45	1,0±0,6
D	-	-	RSV	860±187	0,6±0,6
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2941±482	5,4±0,2
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2505±606	3,4±0,7
G	normal	RSV SAM	RSV	4444±1224	5,0±2,8
H	-	RSV SAM	RSV	3011±461	2,8±1,4

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 4-5 münferit hayvanda (dalaklar) ortalama net pg/ml ± standart sapma

Tablo 10: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısı ile aşılanmış pamuk sıçanlarında RSV tehdidi sonrası F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 20)	Tehdit[c] (gün 49)	RSV tehdidinden 5 gün sonra F'ye özel sekrete edilen sitokin (gün 54)[d]	
				IFNγ	IL-4
A	RSV + alt birim	-	RSV	342±138	2,6±0,8
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	1412±404	3,0±0,8
C	normal	-	RSV	176±45	1,0±0,6
D	-	-	RSV	860±187	0,6±0,6
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2941±482	5,4±0,2
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	2505±606	3,4±0,7
G	normal	RSV SAM	RSV	4444±1224	5,0±2,8
H	-	RSV SAM	RSV	3011±461	2,8±1,4

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") pamuk sıçanlarından havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 10 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

[d] grup başına 4-5 münferit hayvanda (dalaklar) ortalama net pg/ml ± standart sapma

Tablo 11: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısı ile aşılanmış BALB/c'de RSV tehdidi sonrası F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra (gün 49) $CD4^{+d}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$				RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra (gün 49) $CD8^{+c}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$			
				IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5	IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5
A	RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,02	-0,02±0,02	0,00±0,01	0,00±0,02	0,00±0,03	0,01±0,03	0,02±0,02
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	-0,01±0,01	0.00± 0.01	0,00±0,00	0,02±0,02	0,01±0,04	0,00±0,03	0,02±0,02
C	Normal	-	RSV	0,01±0,01	0,00±0,02	0,00±0,01	0,00±0,01	0,01±0,03	0,00±0,04	-0.01± 0.03	0,00±0,02
D	-	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,01	0,01±0,01	-0,02±0,02	-0,02±0,04	0,01±0,03	-0,01±0,02
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,02±0,01	0,08±0,03	0,16±0,04	0,01±0,01	0,42±0,09	0,26±0,07	0,10±0,05	0,01±0,03
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,03±0,02	0,14±0,03	0,20±0,04	0,01±0,01	0,38±0,09	0,25±0,08	0,08±0,04	0,00±0,02
G	Normal	RSV SAM	RSV	0,04±0,02	0,12±0,03	0,19±0,04	0,00±0,01	0,59±0,11	0,52±0,10	0,16±0,06	0,01±0,02
H	-	RSV SAM	RSV	0,01±0,01	0,06±0,02	0,10±0,03	0,00±0,01	0,27±0,08	0,25±0,07	0,08±0,04	0,00±0,03
I	-	-	-	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,01	-0,01±0,01	0,00±0,01	-0,04±0,04	0,00±0,03	0,00±0,03

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 μg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d-c] grup başına (grup I'da 4 hayvan) 8 hayvan (dalaklar) içeren bir havuzdan 2 replikatta ortalama % yanıt ± %95 CI

Tablo 11: Pasif şekilde transfer edilmiş RSV'ye özel antikor varlığında veya yokluğunda RSV SAM RNA aşısı ile aşılanmış BALB/c'de RSV tehdidi sonrası F'ye özel T hücresi yanıtları

Gr.	Serum transferi[a] (gün 0)	Aşılama[b] (gün 2 ve 22)	Tehdit[c] (gün 45)	RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra (gün 49) $CD4^{+d}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$				RSV enfeksiyonundan 4 gün sonra (gün 49) $CD8^{+c}$ başına % F'ye özel $sitokin^{+}$			
				IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5	IFNγ	TNFα	IL-2	IL-5
A	RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,02	-0,02±0,02	0,00±0,01	0,00±0,02	0,00±0,03	0,01±0,03	0,02±0,02
B	1:3 RSV + alt birim	-	RSV	0,00±0,00	-0,01±0,01	0.00± 0.01	0,00±0,00	0,02±0,02	0,01±0,04	0,00±0,03	0,02±0,02
C	Normal	-	RSV	0,01±0,01	0,00±0,02	0,00±0,01	0,00±0,01	0,01±0,03	0,00±0,04	-0.01± 0.03	0,00±0,02
D	-	-	RSV	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,01	0,01±0,01	-0,02±0,02	-0,02±0,04	0,01±0,03	-0,01±0,02
E	RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,02±0,01	0,08±0,03	0,16±0,04	0,01±0,01	0,42±0,09	0,26±0,07	0,10±0,05	0,01±0,03
F	1:3 RSV + alt birim	RSV SAM	RSV	0,03±0,02	0,14±0,03	0,20±0,04	0,01±0,01	0,38±0,09	0,25±0,08	0,08±0,04	0,00±0,02
G	Normal	RSV SAM	RSV	0,04±0,02	0,12±0,03	0,19±0,04	0,00±0,01	0,59±0,11	0,52±0,10	0,16±0,06	0,01±0,02
H	-	RSV SAM	RSV	0,01±0,01	0,06±0,02	0,10±0,03	0,00±0,01	0,27±0,08	0,25±0,07	0,08±0,04	0,00±0,03
I	-	-	-	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,01	-0,01±0,01	0,00±0,01	-0,04±0,04	0,00±0,03	0,00±0,03

Kısaltmalar: Gr - grup, d - gün, vacc - aşılama, chal-tehdit, n.t. -test edilmedi

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile boost edilmiş ("RSV + alt birim") veya naif ("normal") farelerden gelen havuz haline getirilmiş serum. gösterildiği gibi 20 ml/kg seyreltilmemiş veya 1:3 oranında seyreltilmiş serum, alıcı fare gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi

[b] i.m. yoldan 15 μg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $3x10^6$ pfu RSV i.n.

[d-c] grup başına (grup I'da 4 hayvan) 8 hayvan (dalaklar) içeren bir havuzdan 2 replikatta ortalama % yanıt ± %95 CI

Tablo 12: Pamuk sıçanı modelinden gelen sonuçların özeti

Pamuk sıçanı tedavisi		**Tehditten 5 gün sonra akciğer viral yüküyle ölçülen şekilde, belirtilen günde RSV tehdidinden korunma[c]**	
Transfer edilen serumun tipi[a] i.p. (gün 0)	**RNA aşılaması[b] i.m. (gün 2 ve 20)**	**Gün 2**	**Gün 49**
yok	yok	hayır	hayır
Sadece RSV	yok	hayır	*test edilmedi*
RSV + alt birim	yok	evet	hayır
yok	RSV SAM	hayır	evet
RSV + alt birim	RSV SAM	evet	evet (ancak tam değil)

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") veya RSV ile enfekte edilmiş, aşılanmamış ("RSV") pamuk sıçanlarından gelen havuz haline getirilmiş serum. 10 ml/kg seyreltilmemiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

Yukarıdaki açıklama, genel bir tariftir. Sadece açıklama amaçları için verilmiş olan aşağıdaki spesifik örneklere bakılarak daha tam bir anlayış elde edilebilir.

Tablo 12: Pamuk sıçanı modelinden gelen sonuçların özeti

Pamuk sıçanı tedavisi		**Tehditten 5 gün sonra akciğer viral yüküyle ölçülen şekilde, belirtilen günde RSV tehdidinden korunma[c]**	
Transfer edilen serumun tipi[a] i.p. (gün 0)	**RNA aşılaması[b] i.m. (gün 2 ve 20)**	**Gün 2**	**Gün 49**
yok	yok	hayır	hayır
Sadece RSV	yok	hayır	*test edilmedi*
RSV + alt birim	yok	evet	hayır
yok	RSV SAM	hayır	evet
RSV + alt birim	RSV SAM	evet	evet (ancak tam değil)

[a] RSV ile enfekte edilmiş, F alt birim aşısı ile immünize edilmiş ("RSV + alt birim") veya RSV ile enfekte edilmiş, aşılanmamış ("RSV") pamuk sıçanlarından gelen havuz haline getirilmiş serum. 10 ml/kg seyreltilmemiş serum, alıcı pamuk sıçanları gruplarına i.p. yoldan enjekte edildi.

[b] i.m. yoldan 15 µg RSV SAM aşısı veya aşılama yok

[c] $1x10^5$ pfu RSV i.n.

Yukarıdaki açıklama, genel bir tariftir. Sadece açıklama amaçları için verilmiş olan aşağıdaki spesifik örneklere bakılarak daha tam bir anlayış elde edilebilir.

SEKANS LİSTESİ

<110> NOVARTIS AG

<120> RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

<130> PAT054473-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/436,355

<151> 2011-01-26

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> İnsan respiratuar sinsitiyal virüsü

<400> 1

SEKANS LİSTESİ

<110> NOVARTIS AG

<120> RSV İMMÜNİZASYON REJİMİ

<130> PAT054473-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/436,355

<151> 2011-01-26

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> İnsan respiratuar sinsitiyal virüsü

<400> 1

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

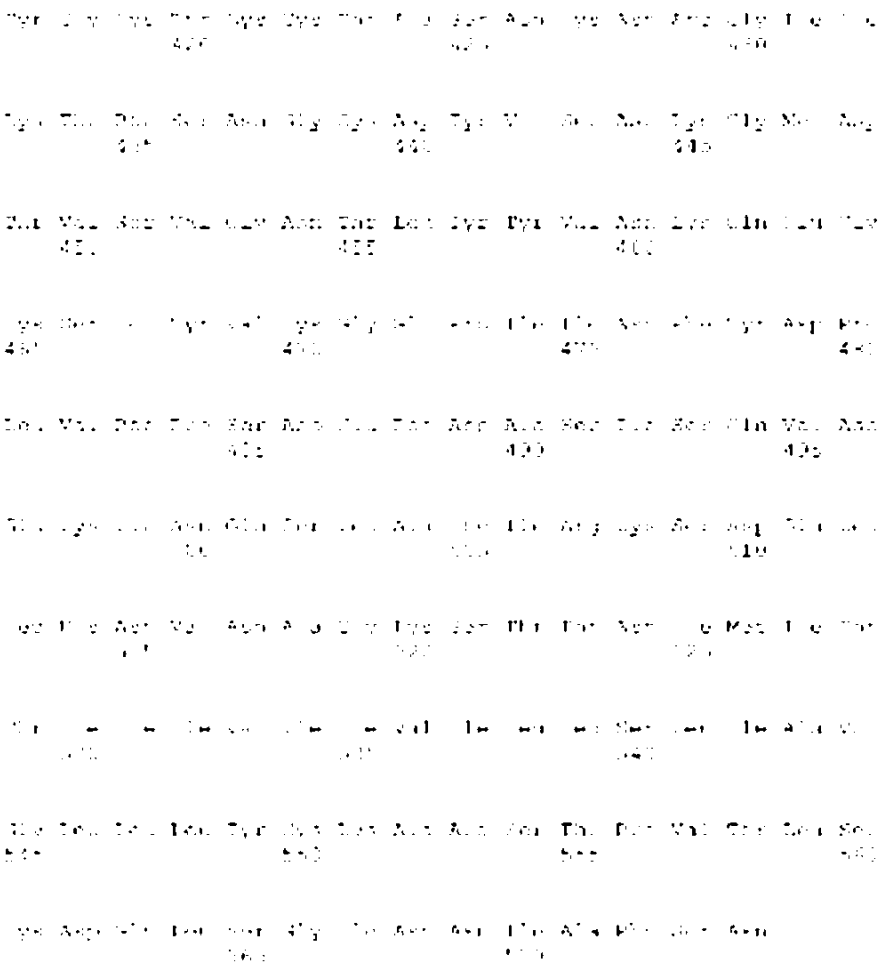
Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

```
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
                165                 170                 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415
```

```
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
                165                 170                 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415
```



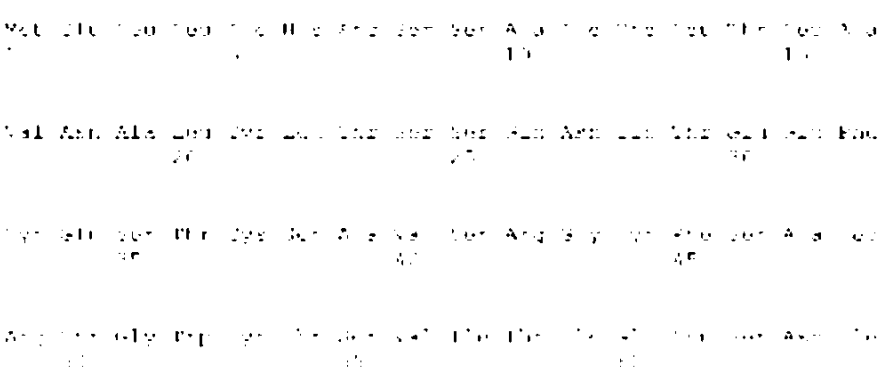
<210> 2

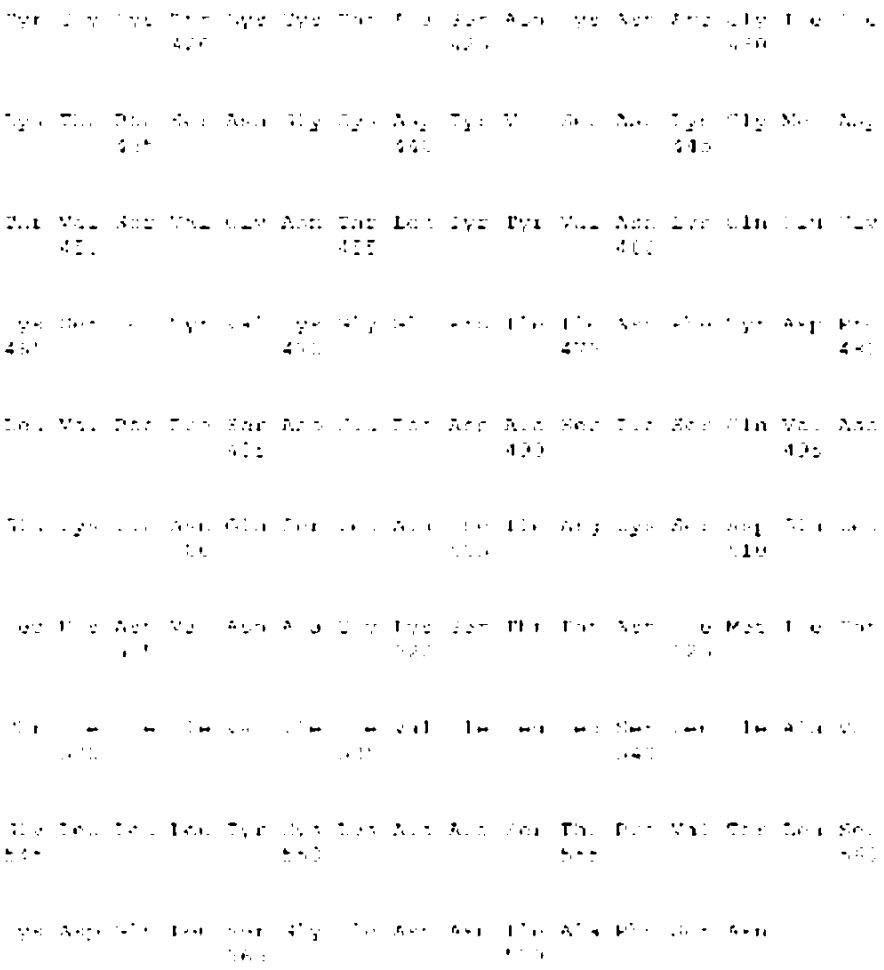
<211> 574

<212> PRT

<213> İnsan respiratuar sinsitiyal virüsü

<400> 2





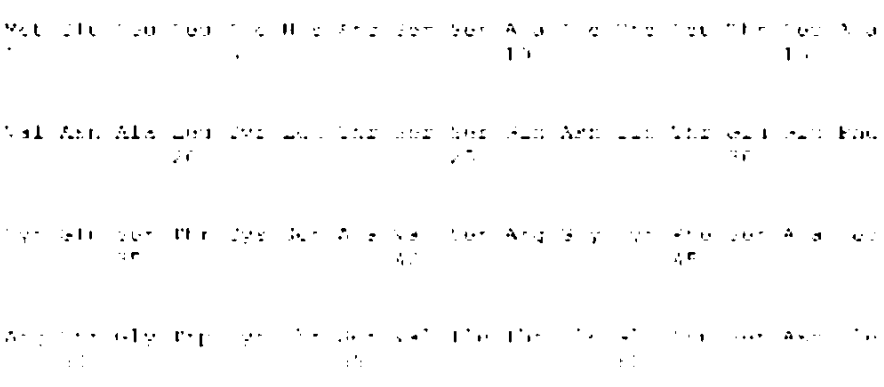
<210> 2

<211> 574

<212> PRT

<213> İnsan respiratuar sinsitiyal virüsü

<400> 2



Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys

565 570

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 3
Arg Ala Arg Lys
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 4
Arg Ala Arg Gln
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 5
Gln Ala Gln Asn
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

565 570

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 3
Arg Ala Arg Lys
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 4
Arg Ala Arg Gln
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 5
Gln Ala Gln Asn
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 6

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 7

Arg Lys Lys Lys
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 8

Gln Asn Gln Asn
1

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 9

Gln Gln Gln Arg
1

<210> 10
<211> 4

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 6

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 7

Arg Lys Lys Lys
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 8

Gln Asn Gln Asn
1

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 9

Gln Gln Gln Arg
1

<210> 10
<211> 4

<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 10

```
Ile Glu Gly Arg
1
```

<210> 11
<211> 42
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<400> 11

```
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30

Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser
        35                  40
```

<210> 12
<211> 45
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak

<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<400> 12

<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik peptit"

<400> 10

```
Ile Glu Gly Arg
1
```

<210> 11
<211> 42
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<400> 11

```
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30

Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser
        35                  40
```

<210> 12
<211> 45
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak

<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<400> 12

```
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30

Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
        35                  40                  45
```

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Bilinmeyenin Tarifi: Alfaviral genom altı promoter sekansı"

<400> 13
ctctctacgg ctaacctgaa tgga 24

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik konsensüs sekans"

<220>
<221> VARYANT
<222> (2)..(2)
<223> /değiştir="Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /not="Sekansta verilen tortunun, bilgi notuna göre adı geçen pozisyon için hiçbir tercihi yoktur"

<220>
<221> MOD_RES

```
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30

Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
        35                  40                  45
```

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Bilinmeyenin Tarifi: Alfaviral genom altı promoter sekansı"

<400> 13
ctctctacgg ctaacctgaa tgga 24

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik konsensüs sekans"

<220>
<221> VARYANT
<222> (2)..(2)
<223> /değiştir="Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /not="Sekansta verilen tortunun, bilgi notuna göre adı geçen pozisyon için hiçbir tercihi yoktur"

<220>
<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
<223> Herhangi bir amino asit

<400> 14

```
Asp Val Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1               5
```

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Ayak ve ağız hastalığı virüsü

<400> 15

```
Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1               5
```

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> Bilinmiyor

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Bilinmeyenin Tarifi: İntegrin reseptörü bağlayıcı yarım peptidi"

<400> 16

```
Arg Gly Asp
1
```

.<210> 17
<211> 4
<212> DNA
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotit"

<400> 17

tttt 4

.<210> 18
<211> 4
<212> DNA
<213> Suni Sekans

<222> (4)..(4)
<223> Herhangi bir amino asit

<400> 14

```
Asp Val Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1               5
```

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Ayak ve ağız hastalığı virüsü

<400> 15

```
Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1               5
```

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> Bilinmiyor

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Bilinmeyenin Tarifi: İntegrin reseptörü bağlayıcı yarım peptidi"

<400> 16

```
Arg Gly Asp
1
```

.<210> 17
<211> 4
<212> DNA
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotit"

<400> 17

tttt 4

.<210> 18
<211> 4
<212> DNA
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotit"

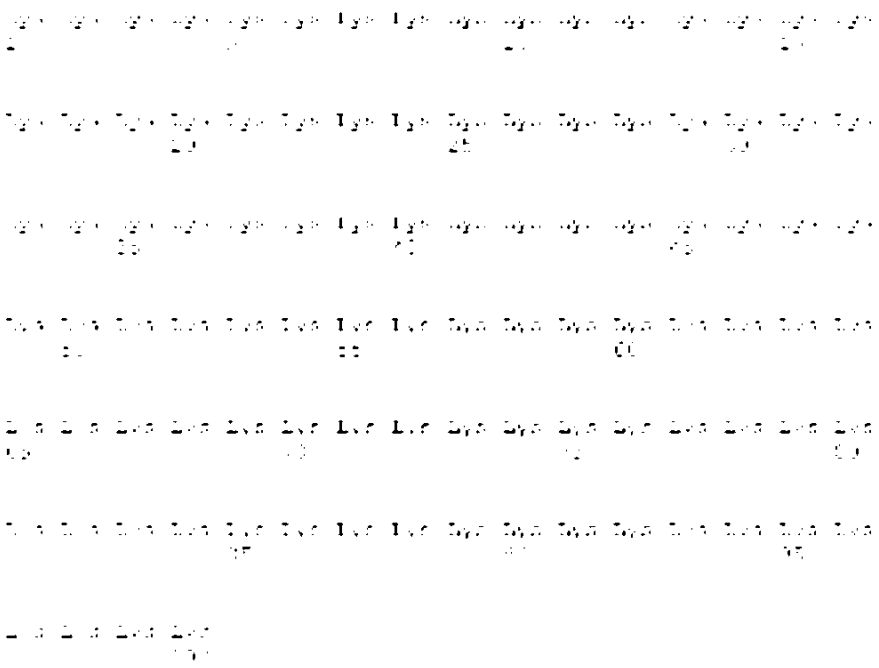
<400> 18
cccc 4

<210> 19
<211> 100
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(100)
<223> /not="Bu sekans, 3-100 arası tortuyu kapsayabilir"

<400> 19



<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotit"

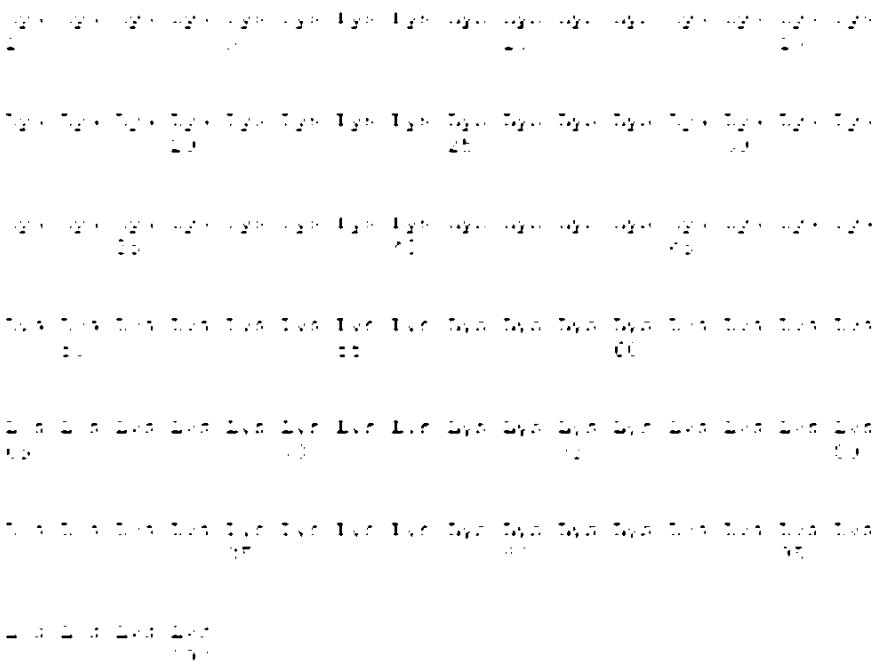
<400> 18
cccc 4

<210> 19
<211> 100
<212> PRT
<213> Suni Sekans

<220>
<221> kaynak
<223> /not="Suni Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptit"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(100)
<223> /not="Bu sekans, 3-100 arası tortuyu kapsayabilir"

<400> 19



TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 61436355 A **[0001]**
- US 6299884 B **[0029]**
- US 7641911 B **[0029]**
- US 7306805 B **[0029]**
- US 20070207090 A **[0029]**
- WO 2005042728 A **[0048] [0065]**
- US 5340740 A **[0049]**
- US 5656479 A **[0049]**
- US 5830510 A **[0049]**
- US 6114168 A **[0049]**
- US 6500668 B **[0049]**
- EP 0787180 B **[0049]**
- EP 03291813 A **[0049]**
- WO 03043415 A **[0049]**
- WO 03076601 A **[0049]**
- US 6592874 B **[0058]**
- US 5814482 A **[0062]**
- WO 2010019437 A **[0062]**
- US 7445924 B **[0065]**
- WO 0138362 A **[0066]**
- WO 0240665 A **[0066]**
- WO 9737001 A **[0066]**
- US 5494807 A **[0071]**
- WO 2004076645 A **[0072]**
- US 4373071 A **[0089]**
- US 4458066 A **[0089]**
- US 4500707 A **[0089]**
- US 4668777 A **[0089]**
- US 4973679 A **[0089]**
- US 5047524 A **[0089]**
- US 5132418 A **[0089]**
- US 5153319 A **[0089]**
- US 5262530 A **[0089]**
- US 5700642 A **[0089]**
- US 5547472 A **[0134]**
- US 5674192 A **[0134]**
- US 6129705 A **[0134]**
- US 6355271 B **[0145]**
- WO 0023105 A **[0145]**
- WO 2009111337 A **[0145] [0159]**
- US 5057540 A **[0145]**
- WO 9633739 A **[0145]**
- WO 96337391 A **[0145]**
- EP 0109942 A **[0145]**
- WO 9611711 A **[0145]**
- WO 0007621 A **[0145]**
- WO 9517211 A **[0145]**
- WO 9842375 A **[0145]**
- WO 9927960 A **[0145]**
- US 6090406 A **[0145]**
- US 5916588 A **[0145]**
- EP 0626169 A **[0145]**
- WO 9952549 A **[0145]**
- WO 0121207 A **[0145]**
- FR 2859633 **[0145]**
- WO 2004064715 A **[0145]**
- US 5936076 A **[0145]**
- US 20050192248 A **[0145]**
- WO 2005102049 A **[0145]**
- WO 03105769 A **[0145]**
- WO 9014837 A **[0155]**
- WO 9511700 A **[0155]**
- US 6080725 A **[0155]**
- WO 2005097181 A **[0155]**
- US 4680338 A **[0159]**
- US 4988815 A **[0159]**
- WO 9215582 A **[0159]**
- US 4689338 A **[0159]**

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 61436355 A **[0001]**
- US 6299884 B **[0029]**
- US 7641911 B **[0029]**
- US 7306805 B **[0029]**
- US 20070207090 A **[0029]**
- WO 2005042728 A **[0048] [0065]**
- US 5340740 A **[0049]**
- US 5656479 A **[0049]**
- US 5830510 A **[0049]**
- US 6114168 A **[0049]**
- US 6500668 B **[0049]**
- EP 0787180 B **[0049]**
- EP 03291813 A **[0049]**
- WO 03043415 A **[0049]**
- WO 03076601 A **[0049]**
- US 6592874 B **[0058]**
- US 5814482 A **[0062]**
- WO 2010019437 A **[0062]**
- US 7445924 B **[0065]**
- WO 0138362 A **[0066]**
- WO 0240665 A **[0066]**
- WO 9737001 A **[0066]**
- US 5494807 A **[0071]**
- WO 2004076645 A **[0072]**
- US 4373071 A **[0089]**
- US 4458066 A **[0089]**
- US 4500707 A **[0089]**
- US 4668777 A **[0089]**
- US 4973679 A **[0089]**
- US 5047524 A **[0089]**
- US 5132418 A **[0089]**
- US 5153319 A **[0089]**
- US 5262530 A **[0089]**
- US 5700642 A **[0089]**
- US 5547472 A **[0134]**
- US 5674192 A **[0134]**
- US 6129705 A **[0134]**
- US 6355271 B **[0145]**
- WO 0023105 A **[0145]**
- WO 2009111337 A **[0145] [0159]**
- US 5057540 A **[0145]**
- WO 9633739 A **[0145]**
- WO 96337391 A **[0145]**
- EP 0109942 A **[0145]**
- WO 9611711 A **[0145]**
- WO 0007621 A **[0145]**
- WO 9517211 A **[0145]**
- WO 9842375 A **[0145]**
- WO 9927960 A **[0145]**
- US 6090406 A **[0145]**
- US 5916588 A **[0145]**
- EP 0626169 A **[0145]**
- WO 9952549 A **[0145]**
- WO 0121207 A **[0145]**
- FR 2859633 **[0145]**
- WO 2004064715 A **[0145]**
- US 5936076 A **[0145]**
- US 20050192248 A **[0145]**
- WO 2005102049 A **[0145]**
- WO 03105769 A **[0145]**
- WO 9014837 A **[0155]**
- WO 9511700 A **[0155]**
- US 6080725 A **[0155]**
- WO 2005097181 A **[0155]**
- US 4680338 A **[0159]**
- US 4988815 A **[0159]**
- WO 9215582 A **[0159]**
- US 4689338 A **[0159]**

- US 6090619 A **[0096]**
- US 6083741 A **[0096]**
- US 6071890 A **[0097]**
- WO 9324640 A, Debs and Zhu **[0098]**
- US 5279833 A, Rose **[0098]**
- WO 9106309 A, Brigham **[0098]**
- US 9405700 W, Wong-Staal **[0098]**
- US 4797368 A, Carter **[0098]**
- WO 9324641 A, Carter **[0098]**
- US 5173414 A, Lebkowski **[0098]**
- WO 2009132206 A **[0111]**
- US 20080085870 A **[0120]**
- US 20080057080 A **[0120]**
- US 4186745 A **[0134]**
- US 5397307 A **[0134]**
- US 6664265 B **[0159]**
- US 6667312 B **[0159]**
- US 6677347 B **[0159]**
- US 6677348 B **[0159]**
- US 6677349 B **[0159]**
- US 6683088 B **[0159]**
- US 6703402 B **[0159]**
- US 6743920 B **[0159]**
- US 6800624 B **[0159]**
- US 6809203 B **[0159]**
- US 6888000 B **[0159]**
- US 6924293 B **[0159]**
- US 2010047587 W **[0159]**
- WO 2004060308 A **[0159]**
- WO 2004064759 A **[0159]**
- US 6924271 B **[0159]**
- US 20050070556 A **[0159]**
- US 5658731 A **[0159]**
- US 5011828 A **[0159]**
- WO 200487153 A **[0159]**
- US 6605617 B **[0159]**
- WO 0218383 A **[0159]**
- WO 2004018455 A **[0159]**
- US 4929624 A **[0159]**
- US 5238944 A **[0159]**
- US 5266575 A **[0159]**
- US 5268376 A **[0159]**
- US 5346905 A **[0159]**
- US 5352784 A **[0159]**
- US 5389640 A **[0159]**
- US 5395937 A **[0159]**
- US 5482936 A **[0159]**
- US 5494916 A **[0159]**
- US 5525612 A **[0159]**
- US 6083505 A **[0159]**
- US 6440992 B **[0159]**
- US 6627640 B **[0159]**
- US 6664264 B **[0159]**
- WO 03082272 A **[0159]**
- WO 2006002422 A **[0159]**
- WO 0226757 A **[0164]**
- WO 9962923 A **[0164]**
- WO 9840100 A **[0164]**
- US 6207646 B **[0164]**
- US 6239116 B **[0164]**
- US 6429199 B **[0164]**
- WO 0195935 A **[0164]**
- WO 03035836 A **[0164]**
- WO 0122972 A **[0165]** **[0166]**
- GB 2220211 A **[0168]** **[0190]**
- WO 9421292 A **[0175]**
- WO 9400153 A **[0176]**
- WO 9517210 A **[0176]**
- WO 9626741 A **[0176]**
- WO 9319780 A **[0176]**
- WO 03011223 A **[0177]**
- US 6586409 B **[0177]**
- US 20050215517 A **[0177]**
- US 4666886 A **[0179]**
- WO 61436355 A **[0250]**

- US 6090619 A **[0096]**
- US 6083741 A **[0096]**
- US 6071890 A **[0097]**
- WO 9324640 A, Debs and Zhu **[0098]**
- US 5279833 A, Rose **[0098]**
- WO 9106309 A, Brigham **[0098]**
- US 9405700 W, Wong-Staal **[0098]**
- US 4797368 A, Carter **[0098]**
- WO 9324641 A, Carter **[0098]**
- US 5173414 A, Lebkowski **[0098]**
- WO 2009132206 A **[0111]**
- US 20080085870 A **[0120]**
- US 20080057080 A **[0120]**
- US 4186745 A **[0134]**
- US 5397307 A **[0134]**
- US 6664265 B **[0159]**
- US 6667312 B **[0159]**
- US 6677347 B **[0159]**
- US 6677348 B **[0159]**
- US 6677349 B **[0159]**
- US 6683088 B **[0159]**
- US 6703402 B **[0159]**
- US 6743920 B **[0159]**
- US 6800624 B **[0159]**
- US 6809203 B **[0159]**
- US 6888000 B **[0159]**
- US 6924293 B **[0159]**
- US 2010047587 W **[0159]**
- WO 2004060308 A **[0159]**
- WO 2004064759 A **[0159]**
- US 6924271 B **[0159]**
- US 20050070556 A **[0159]**
- US 5658731 A **[0159]**
- US 5011828 A **[0159]**
- WO 200487153 A **[0159]**
- US 6605617 B **[0159]**
- WO 0218383 A **[0159]**
- WO 2004018455 A **[0159]**
- US 4929624 A **[0159]**
- US 5238944 A **[0159]**
- US 5266575 A **[0159]**
- US 5268376 A **[0159]**
- US 5346905 A **[0159]**
- US 5352784 A **[0159]**
- US 5389640 A **[0159]**
- US 5395937 A **[0159]**
- US 5482936 A **[0159]**
- US 5494916 A **[0159]**
- US 5525612 A **[0159]**
- US 6083505 A **[0159]**
- US 6440992 B **[0159]**
- US 6627640 B **[0159]**
- US 6664264 B **[0159]**
- WO 03082272 A **[0159]**
- WO 2006002422 A **[0159]**
- WO 0226757 A **[0164]**
- WO 9962923 A **[0164]**
- WO 9840100 A **[0164]**
- US 6207646 B **[0164]**
- US 6239116 B **[0164]**
- US 6429199 B **[0164]**
- WO 0195935 A **[0164]**
- WO 03035836 A **[0164]**
- WO 0122972 A **[0165]** **[0166]**
- GB 2220211 A **[0168]** **[0190]**
- WO 9421292 A **[0175]**
- WO 9400153 A **[0176]**
- WO 9517210 A **[0176]**
- WO 9626741 A **[0176]**
- WO 9319780 A **[0176]**
- WO 03011223 A **[0177]**
- US 6586409 B **[0177]**
- US 20050215517 A **[0177]**
- US 4666886 A **[0179]**
- WO 61436355 A **[0250]**

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

• **KIM, H.W. et al.** *Am. J. Epidemiol.,* 1969, vol. 89,422-434 **[0006]**
• **ENGLUND J.** *Vaccine,* 1998, vol. 16, 1456-1463 **[0006]**
• *Vaccine,* 2009, vol. 27, 4975-4982 **[0048] [0065]**
• **SUMMERS ; SMITH.** *Texas Agricultural ExperimentStation Bulletin No. 1555,* 1987 **[0049]**
• Yeast Genetic Engineering. Butterworths, 1989 **[0049]**
• **RUIZ-ARGUELLO et al.** *J. Gen. Virol.,* 2004, vol. 85,3677-3687 **[0051]**
• **STRAUSS ; STRAUSS.** The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.,*September 1994, vol. 58 (3), 491-562 **[0058]**
• **DONNELLY et al.** *J.Gen.Virol.,* 2001, vol. 82, 1013-1025 **[0060]**
• **TRICHAS et al.** Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.,* 15 September 2008, vol. 6, 40 **[0060]**
• **HALPIN et al.** Self-processing 2A-polyproteins—a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *Plant J.,* February 1999, vol. 17 (4), 453-9 **[0060]**
• **PERRI et al.** *J. Virol.,* 2003, vol. 77, 10394-403 **[0061]**
• **POLO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1999, vol. 96, 4598-603 **[0068]**
• **LIMBACH et al.** *Nucleic Acids Research,* 1994, vol. 22 (12), 2183-2196 **[0089]**
• **MASUDA et al.** *Nucleic Acids Symposium Series,* 2007, vol. 51, 3-4 **[0093]**
• **FELGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1987, vol. 84, 7413-7414 **[0098]**
• **BERNS et al.** *Ann. NY Acad. Sci.,* 1995, vol. 772, 95-104 **[0098]**
• **ALI et al.** *Gene Ther.,* 1994, vol. 1, 367-384 **[0098]**
• **BEAUCAGE S L et al.** *Tetrahedron Lett,* 1981, vol. 22, 1859 **[0093]**
• **GAREGG P et al.** *Tetrahedron Lett,* 1986, vol. 27, 4051-4 **[0093]**
• **FROEHLER B C et al.** *Nucl Acid Res,* 1986, vol. 14, 5399-407 **[0093]**
• **GAREGG P et al.** *Tetrahedron Lett,* 1986, vol. 27, 4055-8 **[0093]**
• **GAFFNEY B L et al.** *Tetrahedron Lett,* 1988, vol. 29, 2619-22 **[0093]**
• **UHLMANN et al.** *Chem Rev,* 1990, vol. 90, 544-84 **[0093]**
• **GOODCHILD J.** *Bioconjugate Chem,* 1990, vol. 1, 165 **[0093]**
• Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988, vol. 2 **[0093]**
• **GLOVER.** DNA Cloning. IRL Press, 1986, vol. II **[0093]**
• **BITTER et al.** *Methods in Enzymology,* 1987, vol. 153, 516-544 **[0093]**
• The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Press, 1982, vol. I, II **[0093]**
• **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 **[0093]**
• **WU; WU.** *J. Biol. Chem.,* 1988, vol. 263, 14621 **[0096]**
• **CURIEL et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1991, vol. 88, 8850 **[0096]**
• **MANNINO ; GOULD-FOGERITE.** *BioTechniques,* 1988, vol. 6 (7), 682-691 **[0098]**
• **SJOLANDERET et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews,* 1998, vol. 32, 321-338 **[0145]**
• **PIZZA et al.** *Int J Med Microbiol,* 2000, vol. 290, 455-461 **[0145]**
• **SINGH et al.** *J Cont Release,* 2001, vol. 70, 267-276 **[0145]**
• **DYAKONOVA et al.** *Int Immunopharmacol,* 2004, vol. 4 (13), 1615-23 **[0145]**
• **SIGNORELLI ; HADDEN.** *Int*

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

• **KIM, H.W. et al.** *Am. J. Epidemiol.,* 1969, vol. 89,422-434 **[0006]**
• **ENGLUND J.** *Vaccine,* 1998, vol. 16, 1456-1463 **[0006]**
• *Vaccine,* 2009, vol. 27, 4975-4982 **[0048] [0065]**
• **SUMMERS ; SMITH.** *Texas Agricultural ExperimentStation Bulletin No. 1555,* 1987 **[0049]**
• Yeast Genetic Engineering. Butterworths, 1989 **[0049]**
• **RUIZ-ARGUELLO et al.** *J. Gen. Virol.,* 2004, vol. 85,3677-3687 **[0051]**
• **STRAUSS ; STRAUSS.** The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.,*September 1994, vol. 58 (3), 491-562 **[0058]**
• **DONNELLY et al.** *J.Gen.Virol.,* 2001, vol. 82, 1013-1025 **[0060]**
• **TRICHAS et al.** Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.,* 15 September 2008, vol. 6, 40 **[0060]**
• **HALPIN et al.** Self-processing 2A-polyproteins—a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *Plant J.,* February 1999, vol. 17 (4), 453-9 **[0060]**
• **PERRI et al.** *J. Virol.,* 2003, vol. 77, 10394-403 **[0061]**
• **POLO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1999, vol. 96, 4598-603 **[0068]**
• **LIMBACH et al.** *Nucleic Acids Research,* 1994, vol. 22 (12), 2183-2196 **[0089]**
• **MASUDA et al.** *Nucleic Acids Symposium Series,* 2007, vol. 51, 3-4 **[0093]**
• **FELGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1987, vol. 84, 7413-7414 **[0098]**
• **BERNS et al.** *Ann. NY Acad. Sci.,* 1995, vol. 772, 95-104 **[0098]**
• **ALI et al.** *Gene Ther.,* 1994, vol. 1, 367-384 **[0098]**
• **BEAUCAGE S L et al.** *Tetrahedron Lett,* 1981, vol. 22, 1859 **[0093]**
• **GAREGG P et al.** *Tetrahedron Lett,* 1986, vol. 27, 4051-4 **[0093]**
• **FROEHLER B C et al.** *Nucl Acid Res,* 1986, vol. 14, 5399-407 **[0093]**
• **GAREGG P et al.** *Tetrahedron Lett,* 1986, vol. 27, 4055-8 **[0093]**
• **GAFFNEY B L et al.** *Tetrahedron Lett,* 1988, vol. 29, 2619-22 **[0093]**
• **UHLMANN et al.** *Chem Rev,* 1990, vol. 90, 544-84 **[0093]**
• **GOODCHILD J.** *Bioconjugate Chem,* 1990, vol. 1, 165 **[0093]**
• Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988, vol. 2 **[0093]**
• **GLOVER.** DNA Cloning. IRL Press, 1986, vol. II **[0093]**
• **BITTER et al.** *Methods in Enzymology,* 1987, vol. 153, 516-544 **[0093]**
• The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Press, 1982, vol. I, II **[0093]**
• **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 **[0093]**
• **WU; WU.** *J. Biol. Chem.,* 1988, vol. 263, 14621 **[0096]**
• **CURIEL et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1991, vol. 88, 8850 **[0096]**
• **MANNINO ; GOULD-FOGERITE.** *BioTechniques,* 1988, vol. 6 (7), 682-691 **[0098]**
• **SJOLANDERET et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews,* 1998, vol. 32, 321-338 **[0145]**
• **PIZZA et al.** *Int J Med Microbiol,* 2000, vol. 290, 455-461 **[0145]**
• **SINGH et al.** *J Cont Release,* 2001, vol. 70, 267-276 **[0145]**
• **DYAKONOVA et al.** *Int Immunopharmacol,* 2004, vol. 4 (13), 1615-23 **[0145]**
• **SIGNORELLI ; HADDEN.** *Int*

• **HADDADA et al.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 1995, vol. 199, 297-306 **[0098]**
• **BUCHSCHER et al.** *J. Virol.,* 1992, vol. 66 (5), 2731-2739 **[0098]**
• **JOHANN et al.** *J. Virol.,* 1992, vol. 66 (5), 1635-1640 **[0098]**
• **SOMMERFELT et al.** *Virol.,* 1990, vol. 176, 58-59 **[0098]**
• **WILSON et al.** *J. Virol.,* 1989, vol. 63, 2374-2378 **[0098]**
• **MILLER et al.** *J. Virol.,* 1991, vol. 65, 2220-2224 **[0098]**
• **ROSENBURG ; FAUCI.** Fundamental Immunology. Raven Press, Ltd, 1993 **[0098]**
• **YU et al.** *Gene Therapy,* 1994 **[0098]**
• **WEST et al.** *Virology,* 1987, vol. 160, 38-47 **[0098]**
• **KOTIN.** *Human Gene Therapy,* 1994, vol. 5, 793-801 **[0098]**
• **MUZYCZKA.** *J. Clin. Invst.,* 1994, vol. 94, 1351 **[0098]**
• **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.,* 1985, vol. 5 (11), 3251-3260 **[0098]**
• **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.,* 1984, vol. 4, 2072-2081 **[0098]**
• **HERMONAT ; MUZYCZKA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 6466-6470 **[0098]**
• **SAMULSKI et al.** *J. Virol.,* 1989, vol. 63, 03822-3828 **[0098]**
• **HEYES et al.** *J Controlled Release,* 2005, vol. 107, 276-87 **[0102] [0105]**
• Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. Liposomes: Methods and Protocols. Humana Press, 2009, vol. 1 **[0105]**
• Liposome Technology. Informa Healthcare, 2006, vol. I, II, III **[0105]**
• Microspheres, microcapsules & liposomes. Functional Polymer Colloids and Microparticles. Citus Books, 2002, vol. 4 **[0105] [0111]**
• Polymers in Drug Delivery. CRC Press, 2006 **[0111]**
• Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. *Immunopharmacol,* 2003, vol. 3 (8), 1177-86 **[0145]**
• **DE LIBERO et al.** *Nature Reviews Immunology,* 2005, vol. 5, 485-496 **[0145]**
• **OLD et al.** *J Clin Investig,* vol. 113, 1631-1640 **[0145]**
• **YANG et al.** *Angew Chem Int Ed,* 2004, vol. 43, 3818-3822 **[0145]**
• **GOFFET et al.** *Am Chem Soc,* 2004, vol. 126, 13602-13603 **[0145]**
• **COOPER.** *Pharm Biotechnol,* 1995, vol. 6, 559-80 **[0145]**
• Methods in Molecular Medicine. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. vol. 42 **[0146] [0155]**
• **PODDA ; DEL GIUDICE.** *Expert Rev Vaccines,* 2003, vol. 2, 197-203 **[0155]**
• **PODDA.** *Vaccine,* 2001, vol. 19, 2673-2680 **[0155]**
• **ALLISON; BYARS.** *Res Immunol,* 1992, vol. 143, 519-25 **[0155]**
• **HARIHARAN et al.** *Cancer Res,* 1995, vol. 55, 3486-9 **[0155]**
• **TASSIGNON et al.** *J Immunol Meth,* 2005, vol. 305, 188-98 **[0158]**
• **MYERS et al.** *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions,* 1990, 145-156 **[0159] [0190]**
• Methods in Molecular Medicine. **ULRICH.** Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. 2000, vol. 42, 273-282 **[0159]**
• **JOHNSON et al.** *J Med Chem,* 1999, vol. 42, 4640-9 **[0159] [0190]**
• **BALDRICK et al.** *Regulatory Toxicol Pharmacol,* 2002, vol. 35, 398-413 **[0159] [0190]**
• **STANLEY.** *Clin Exp Dermatol,* 2002, vol. 27, 57 1-577 **[0159]**
• **WU et al.** *Antiviral Res.,* 2004, vol. 64 (2), 79-83 **[0159]**
• **VASILAKOS et al.** *Cell Immunol.,* 2000, vol. 204 (1), 64-74 **[0159]**
• **JONES.** *Curr Opin Investig Drugs,*

• **HADDADA et al.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 1995, vol. 199, 297-306 **[0098]**
• **BUCHSCHER et al.** *J. Virol.,* 1992, vol. 66 (5), 2731-2739 **[0098]**
• **JOHANN et al.** *J. Virol.,* 1992, vol. 66 (5), 1635-1640 **[0098]**
• **SOMMERFELT et al.** *Virol.,* 1990, vol. 176, 58-59 **[0098]**
• **WILSON et al.** *J. Virol.,* 1989, vol. 63, 2374-2378 **[0098]**
• **MILLER et al.** *J. Virol.,* 1991, vol. 65, 2220-2224 **[0098]**
• **ROSENBURG ; FAUCI.** Fundamental Immunology. Raven Press, Ltd, 1993 **[0098]**
• **YU et al.** *Gene Therapy,* 1994 **[0098]**
• **WEST et al.** *Virology,* 1987, vol. 160, 38-47 **[0098]**
• **KOTIN.** *Human Gene Therapy,* 1994, vol. 5, 793-801 **[0098]**
• **MUZYCZKA.** *J. Clin. Invst.,* 1994, vol. 94, 1351 **[0098]**
• **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.,* 1985, vol. 5 (11), 3251-3260 **[0098]**
• **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.,* 1984, vol. 4, 2072-2081 **[0098]**
• **HERMONAT ; MUZYCZKA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 6466-6470 **[0098]**
• **SAMULSKI et al.** *J. Virol.,* 1989, vol. 63, 03822-3828 **[0098]**
• **HEYES et al.** *J Controlled Release,* 2005, vol. 107, 276-87 **[0102] [0105]**
• Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. Liposomes: Methods and Protocols. Humana Press, 2009, vol. 1 **[0105]**
• Liposome Technology. Informa Healthcare, 2006, vol. I, II, III **[0105]**
• Microspheres, microcapsules & liposomes. Functional Polymer Colloids and Microparticles. Citus Books, 2002, vol. 4 **[0105] [0111]**
• Polymers in Drug Delivery. CRC Press, 2006 **[0111]**
• Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. *Immunopharmacol,* 2003, vol. 3 (8), 1177-86 **[0145]**
• **DE LIBERO et al.** *Nature Reviews Immunology,* 2005, vol. 5, 485-496 **[0145]**
• **OLD et al.** *J Clin Investig,* vol. 113, 1631-1640 **[0145]**
• **YANG et al.** *Angew Chem Int Ed,* 2004, vol. 43, 3818-3822 **[0145]**
• **GOFFET et al.** *Am Chem Soc,* 2004, vol. 126, 13602-13603 **[0145]**
• **COOPER.** *Pharm Biotechnol,* 1995, vol. 6, 559-80 **[0145]**
• Methods in Molecular Medicine. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. vol. 42 **[0146] [0155]**
• **PODDA ; DEL GIUDICE.** *Expert Rev Vaccines,* 2003, vol. 2, 197-203 **[0155]**
• **PODDA.** *Vaccine,* 2001, vol. 19, 2673-2680 **[0155]**
• **ALLISON; BYARS.** *Res Immunol,* 1992, vol. 143, 519-25 **[0155]**
• **HARIHARAN et al.** *Cancer Res,* 1995, vol. 55, 3486-9 **[0155]**
• **TASSIGNON et al.** *J Immunol Meth,* 2005, vol. 305, 188-98 **[0158]**
• **MYERS et al.** *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions,* 1990, 145-156 **[0159] [0190]**
• Methods in Molecular Medicine. **ULRICH.** Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. 2000, vol. 42, 273-282 **[0159]**
• **JOHNSON et al.** *J Med Chem,* 1999, vol. 42, 4640-9 **[0159] [0190]**
• **BALDRICK et al.** *Regulatory Toxicol Pharmacol,* 2002, vol. 35, 398-413 **[0159] [0190]**
• **STANLEY.** *Clin Exp Dermatol,* 2002, vol. 27, 57 1-577 **[0159]**
• **WU et al.** *Antiviral Res.,* 2004, vol. 64 (2), 79-83 **[0159]**
• **VASILAKOS et al.** *Cell Immunol.,* 2000, vol. 204 (1), 64-74 **[0159]**
• **JONES.** *Curr Opin Investig Drugs,*

CRC Press, 1996 **[0111]**
• **O'HAGAN et al.** *J Virology,* 2001, vol. 75, 9037-9043 **[0111]**
• **SINGH et al.** *Pharmaceutical Research,* 2003, vol. 20, 247-251 **[0111]**
• **GENNARO.** Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2000 **[0139]**
• Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995 **[0145] [0146] [0155] [0182] [0183] [0184]**
• **BARR et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews,* 1998, vol. 32, 247-271 **[0145]**
• **KANDIMALLA et al.** *Nucleic Acids Research,* 2003, vol. 31, 2393-2400 **[0164]**
• **KRIEG.** *Nature Medicine,* 2003, vol. 9, 831-835 **[0164]**
• **MCCLUSKIE et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology,* 2002, vol. 32, 179-185 **[0164]**
• **KANDIMALLA et al.** *Biochemical Society Transactions,* 2003, vol. 31, 654-658 **[0164]**
• **BLACKWELL et al.** *J Immunol,* 2003, vol. 170, 4061-4068 **[0164]**
• **KRIEG.** *Trends Immunol,* 2002, vol. 23, 64-65 **[0164]**
• **KANDIMALLA et al.** *BBRC,* 2003, vol. 306, 948-953 **[0164]**
• **BHAGAT et al.** *BBRC,* 2003, vol. 300, 853-861 **[0164]**
• **THOMPSON et al.** The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol,* 2005, 78 **[0168]**
• **MERALDI et al.** *Vaccine,* 2003, vol. 21, 2485-249 1 **[0177]**
• **PAJAK et al.** *Vaccine,* 2003, vol. 21, 836-842 **[0177]**
• **WONG et al.** *J Clin Pharmacol,* 2003, vol. 43 (7), 735-42 **[0177]**
2003, vol. 4, 214-218 **[0159]**
• **JOHNSON et al.** *Bioorg Med Chem Lett,* 1999, vol. 9, 2273-2278 **[0159]**
• **EVANS et al.** *Expert Rev Vaccines,* 2003, vol. 2, 219-229 **[0159]**
• **ANDRIANOV et al.** *Biomaterials,* 1998, vol. 19, 109-115 **[0159]**
• **PAYNE et al.** *AdvDrug Delivery Review,* 1998, vol. 31, 185-196 **[0159]**
• **THOMPSON et al.** *Methods in Molecular Medicine,* 2003, vol. 94, 255-266 **[0162]**
• **AKDIS et al.** *Eur. J. Immunology,* 2003, vol. 33, 2717-26 **[0180]**
• **HANTKE et al.** *Eur. J. Biochem.,* 1973, vol. 34, 284-296 **[0181]**
• **BASCHANG et al.** *Tetrahedron,* 1989, vol. 45 (20), 6331-6360 **[0181]**
• Methods in Molecular Medicine series. **ULRICH.** Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. 2000, vol. 42, 273-282 **[0190]**
• **PAPPAIOANOU M et al.** Accurate Detection of Maternal Antibodies to HIV in Newborn Whole Blood Dried on Filter Paper. *AIDS,* 1993, vol. 7 (4), 483-488 **[0205]**
• **PINON J.M. et al.** Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobin G, M, and A Antibodies. *J. Clin. Microbiol.,* 2001, vol. 39 (6), 2267-2271 **[0205]**
• **OTT et al.** *Journal of Controlled Release,* 2002, vol. 79, 1-5 **[0236]**

CRC Press, 1996 **[0111]**
• **O'HAGAN et al.** *J Virology,* 2001, vol. 75, 9037-9043 **[0111]**
• **SINGH et al.** *Pharmaceutical Research,* 2003, vol. 20, 247-251 **[0111]**
• **GENNARO.** Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2000 **[0139]**
• Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995 **[0145] [0146] [0155] [0182] [0183] [0184]**
• **BARR et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews,* 1998, vol. 32, 247-271 **[0145]**
• **KANDIMALLA et al.** *Nucleic Acids Research,* 2003, vol. 31, 2393-2400 **[0164]**
• **KRIEG.** *Nature Medicine,* 2003, vol. 9, 831-835 **[0164]**
• **MCCLUSKIE et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology,* 2002, vol. 32, 179-185 **[0164]**
• **KANDIMALLA et al.** *Biochemical Society Transactions,* 2003, vol. 31, 654-658 **[0164]**
• **BLACKWELL et al.** *J Immunol,* 2003, vol. 170, 4061-4068 **[0164]**
• **KRIEG.** *Trends Immunol,* 2002, vol. 23, 64-65 **[0164]**
• **KANDIMALLA et al.** *BBRC,* 2003, vol. 306, 948-953 **[0164]**
• **BHAGAT et al.** *BBRC,* 2003, vol. 300, 853-861 **[0164]**
• **THOMPSON et al.** The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol,* 2005, 78 **[0168]**
• **MERALDI et al.** *Vaccine,* 2003, vol. 21, 2485-249 1 **[0177]**
• **PAJAK et al.** *Vaccine,* 2003, vol. 21, 836-842 **[0177]**
• **WONG et al.** *J Clin Pharmacol,* 2003, vol. 43 (7), 735-42 **[0177]**
2003, vol. 4, 214-218 **[0159]**
• **JOHNSON et al.** *Bioorg Med Chem Lett,* 1999, vol. 9, 2273-2278 **[0159]**
• **EVANS et al.** *Expert Rev Vaccines,* 2003, vol. 2, 219-229 **[0159]**
• **ANDRIANOV et al.** *Biomaterials,* 1998, vol. 19, 109-115 **[0159]**
• **PAYNE et al.** *AdvDrug Delivery Review,* 1998, vol. 31, 185-196 **[0159]**
• **THOMPSON et al.** *Methods in Molecular Medicine,* 2003, vol. 94, 255-266 **[0162]**
• **AKDIS et al.** *Eur. J. Immunology,* 2003, vol. 33, 2717-26 **[0180]**
• **HANTKE et al.** *Eur. J. Biochem.,* 1973, vol. 34, 284-296 **[0181]**
• **BASCHANG et al.** *Tetrahedron,* 1989, vol. 45 (20), 6331-6360 **[0181]**
• Methods in Molecular Medicine series. **ULRICH.** Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. 2000, vol. 42, 273-282 **[0190]**
• **PAPPAIOANOU M et al.** Accurate Detection of Maternal Antibodies to HIV in Newborn Whole Blood Dried on Filter Paper. *AIDS,* 1993, vol. 7 (4), 483-488 **[0205]**
• **PINON J.M. et al.** Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobin G, M, and A Antibodies. *J. Clin. Microbiol.,* 2001, vol. 39 (6), 2267-2271 **[0205]**
• **OTT et al.** *Journal of Controlled Release,* 2002, vol. 79, 1-5 **[0236]**

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1A

A = pamuk sıçanları

B = pfu/g akciğer

C= %60 RSV nötralizasyon titeri

ŞEKİL 1B

D = BALB/c fareleri

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1A

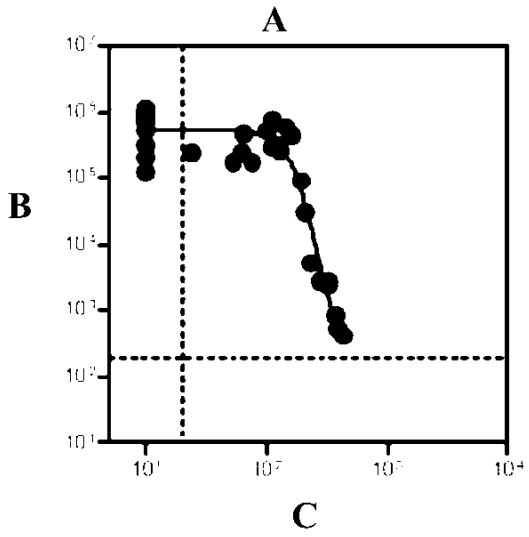
A = pamuk sıçanları

B = pfu/g akciğer

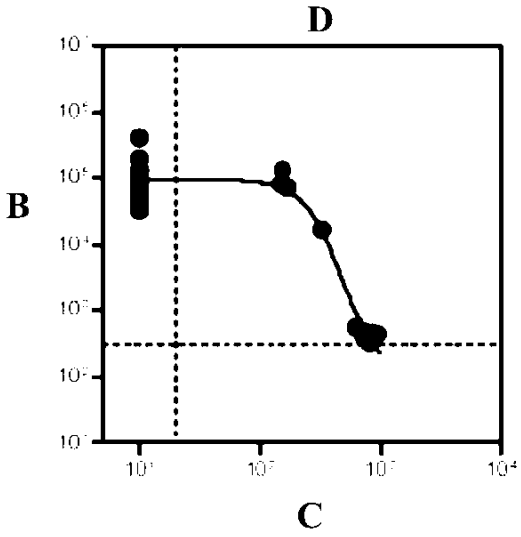
C= %60 RSV nötralizasyon titeri

ŞEKİL 1B

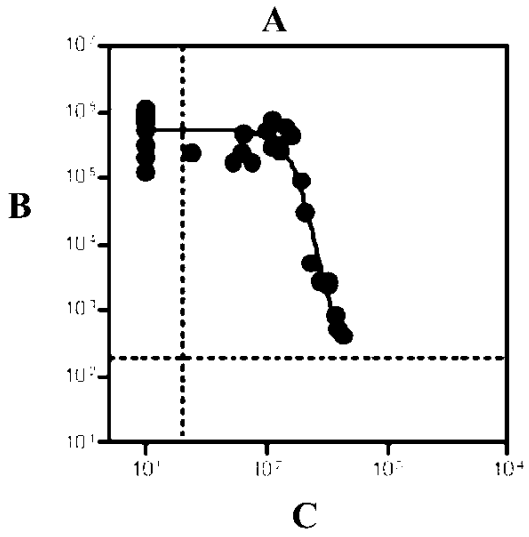
D = BALB/c fareleri



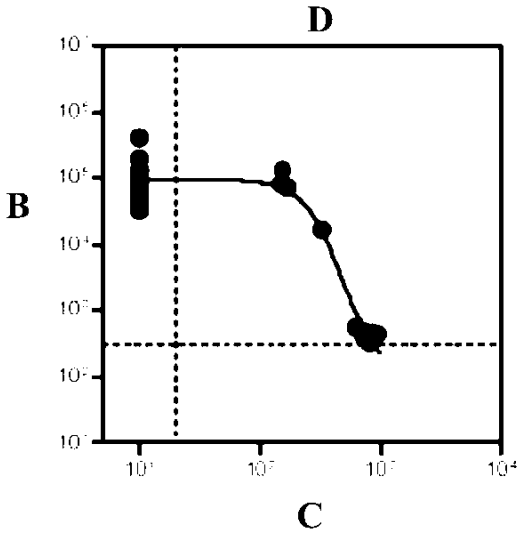
ŞEKİL 1A



ŞEKİL 1B



ŞEKİL 1A



ŞEKİL 1B