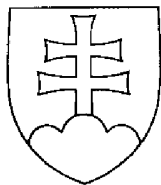


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288411

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2016.01):

A61K 39/00

A61K 9/00

A61P 31/00

A61P 35/00

A61P 37/00

- (21) Číslo prihlášky: **1041-2002**
(22) Dátum podania prihlášky: **15. 1. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0000891.2**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **14. 1. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 5. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **5/2003**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **17. 8. 2016**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/GB01/00142**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO 01/51082**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **ALLERGY THERAPEUTICS LIMITED, Worthing, West Sussex, GB;**
CORIXA CORPORATION, Seattle, WA, US;

(72) Pôvodca: **Wheeler Alan, Worthing, West Sussex, GB;**
Elliott Garry, Hamilton, MT, US;
Cluff Christopher Wallace, Hamilton, MT, US;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans a kompozícia na sublinguálne podávanie**

(57) Anotácia:
Sublinguálne podávateľná kompozícia, obsahujúca najmenej jeden antigén a glykolipidové adjuvans, ktorá je určená na použitie na vyvolanie sliznicovej a systémovej imunitnej reakcie, pričom sliznicová imunitná reakcia je IgA reakcia a systémová imunitná reakcia je sérová IgG reakcia. Opísané je tiež použitie najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans na prípravu sublinguálne podávateľného liečiva na vyvolanie sliznicovej a systémovej imunitnej reakcie, pričom sliznicová imunitná reakcia je IgA reakcia a systémová imunitná reakcia je sérová IgG reakcia.

SK 288411 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans a farmaceutickej zmesi vo forme sublinguálne podávanej kompozície vhodnej najmä, ale nie výlučne, na imunizáciu ako profylaktická alebo terapeutická vakcína alebo pri liečení alergie.

Doterajší stav techniky

Imunitný systém sa vyvinul špecificky na to, aby u hostiteľa detegoval a eliminoval cudzí alebo nový materiál. Tento materiál môže mať vírusový, bakteriálny alebo parazitický pôvod a môže sídlieť mimo buniek alebo v bunkách hostiteľa alebo môže byť neoplastického pôvodu. Môže tiež byť z iných zdrojov a nemusí byť patogénny alebo nemusí nevyhnutne poškodzovať všetky subjekty.

Mukotický imunitný systém (MIS) pozostáva z lymfoidných tkanív v epitelovej výstelke respiračného, genitourinárneho a gastrointestinálneho traktu a priamo pod ňou, ako aj pod duktálnym systémom slinnej, slznej a mliečnej žľazy. Primárnym produktom MIS je IgA.

Vakcinácia je najlepšia známa a najúspešnejšia aplikácia imunologického princípu pre ľudské zdravie. Prirodzene, aby sa zaviedla a schválila vakcína, musí byť účinná a účinnosť všetkých vakcín sa z času na čas prehodnocuje. Účinnosť vakcín ovplyvňujú mnohé faktory. Vakcína sa napríklad obvykle podáva subkutánnou alebo intramuskulárnou cestou. Poslednou dobou sa na podávanie terapeutických vakcín proti alergii používa sublinguálna cesta. Účinná vakcína musí vyvolať príslušnú imunitu v zmysle kvantitatívnych a kvalitatívnych efektov a musí byť stabilná pri uskladnení. Konkrétne pri neživých vakcínach je často potrebné posilniť ich imunogenicitu nejakým adjuvans. Toto sa môže tiež použiť pri niektorých živých, napríklad oslabených, vakcínach. Adjuvans je látka, ktorá zosilňuje imunitnú odozvu na antigén.

Počas práce v roku 1920 na výrobe antisér zo zvierat na liečenie ľudí sa zistilo, že niektoré látky, menovite soli hliníka pridané do antigénov alebo do emulzií, ktoré obsahujú antigén, silne zvyšujú tvorbu protilátok, t. j. pôsobia ako adjuvans. Hydroxid hlinitý sa stále široko používa napríklad s toxoidom záškrtu a tetanu a nerozpustný tyrozín sa používa s niektorými vakcínami proti alergii. Iné rozpustnejšie adjuvans majú tiež požadované účinky, ako je napríklad vyvolanie zvýšenej imunitnej odozvy alebo riadenie odozvy napríklad smerom k odozve TH1 typu.

3-De-O-acylovaný monofosforyl-lipid A je známy z GB-A-2220211 (Ribi). Chemicky to môže byť zmes 3-de-O-acylovaného monofosforyl-lipidu A so 4, 5 alebo 6 acylovanými reťazcami a teraz ho vyrába Corixa Corporation. Výhodná forma 3-de-O-acylovaného monofosforyl-lipidu A (v tomto dokumente tiež označovaná ako MPL(r) adjuvans) je opísaná v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 92/16556.

Medzinárodná patentová prihláška č. WO 98/44947 opisuje prípravok určený na použitie v znečlivujúcej terapii pacientov s alergiou, ktorý zahŕňa voliteľne modifikovaný alergén, tyrozín a 3-de-O-acylovaný monofosforyl-lipid A.

Značné úsilie sa venovalo príprave lepších adjuvans, zvlášť pre T-bunkami sprostredkované odozvy, ale treba zdôrazniť, že len málokteré z týchto novších adjuvans sú už akceptované pre rutinné použitie u ľudí. MPL(r) adjuvans však bolo schválené na použitie s Melanom vakcínou a vakcínou proti alergii, ktoré obsahujú MPL(r) adjuvans, sú dostupné ako špeciality v Nemecku, Taliansku a Španielsku.

WO 00/50078 od Chiron opisuje zmes, ktorá obsahuje bioadhezíva v kombinácii s adjuvans a antigénmi na podávanie sliznicou. To však len demonštruje produkciu IgG imunitnej odozvy touto zmesou. Okrem toho bioadhezívum je činidlom, ktoré sa fyzikálne alebo chemicky viaže na sliznicu. Predpokladá sa, že v spojení s takouto bioadheziou niektorých antigén obsahujúcich zmesí môžu existovať bezpečnostné problémy. Sublinguálne podávanie sa nepredpokladá; testovaná zmes sa podáva intranazálne.

Stále jasne existuje potreba zmesi, ktorá generuje mukotickú a systemickú imunitnú odozvu na ochranu proti baktériám, vírusom a iným parazitickým organizmom a ktorá sa môže používať ako vakcína proti alergii. Ideálne by takáto zmes mala byť podávateľná cestou, ktorá je spojená s dobrou akceptovateľnosťou pre pacienta, ako napríklad sublinguálny spôsob. Tiež sa zistilo, že sublinguálne podávanie môže poskytnúť rýchlu absorpciu a dobrú biodostupnosť podávanej látky. Sublinguálne podávanie môže tiež byť výhodné oproti prerušovaným injekciám pri udržiavaní adekvátnych koncentrácií podávanej látky v krvi. Výhodne by zmes mala obsahovať obvyčajne dostupné adjuvans.

Podstata vynálezu

Vynález sa týka systému na sublinguálne podávanie a má výhody spojené s týmito prostriedkami podávania. Podrobnejšie povedané, teraz sa zistilo, že s antigénom na vyvolanie mukotickej imunitnej odozvy (MIR) je možné použiť glykolipidové adjuvans, ako napríklad MPL(r) adjuvans, keď sa podávajú sublingu-

álne. Prihlasovatelia predpokladajú, že sú prví, čo spozorovali, že takéto použitie glykolipidových adjuvans sublinguálne môže vyvolať systemickú IgG-, ako aj mukotickú IgA-sprostredkovanú odozvu. Prekvapivo sa tiež zistilo, že MIR môže byť generovaná aj na mieste, ktoré je vzdialen, ale aj blízke sublinguálnemu miestu podávania. IgA môže byť zistený napríklad v iných lymfoidných tkanivách, ako napríklad v intestinálnom trakte, respiračnom trakte a genitourinárnom trakte. To má zvlášť významné dôsledky na liečenie napríklad sexuálne prenosných chorôb, pretože sublinguálna aplikácia je pohodlná a môže teda viesť k dobrému dodržiavaniu dávkového režimu pacientom.

Zdá sa, že účinok adjuvans je spôsobený hlavne dvoma aktivitami: trvalou koncentráciou antigénu na mieste, kde sú ním lymfocyty alebo iné vhodné bunky exponované (účinok zachytenia), a indukciou cytokínov, ktoré regulujú funkciu lymfocytov. Novšie prípravky, ako napríklad lipozómy a imunitu-stimulujúce komplexy (ISCOMS), môžu dosiahnuť rovnaký účel zabezpečením toho, že antigény v nich zachytené sú dodávané do antigén prezentujúcich buniek. Predpokladá sa, že bakteriálne produkty, ako napríklad mykobaktériálne bunkové steny, endotoxín atď., pôsobia stimulovaním tvorby cytokínov. Indukcia cytokínov môže byť zvlášť užitočná u pacientov s potlačenou imunitou, ktorí často nemajú odozvu na normálne vakcíny. Predpokladá sa, že takáto indukcia cytokínov by mohla tiež byť užitočná v riadení imunitnej odozvy v požadovanom smere, napríklad pri chorobách, kde sa potrebuje citlivosť len TH1 alebo TH2 buniek (Roitt a spol. Immunology, 4. vydanie).

Tiež poskytujeme antigénový prípravok, ktorý môže preklopiť TH1-TH2 rovnováhu v prospech TH1 odozvy, ktorý môže byť podávaný na sliznice, výhodne do úst a konkrétne na sublinguálne miesto. Prípravok je užitočný pri imunoterapii, zvlášť na poli vakcín. Je tiež užitočný pri študovaní imunitných odoziev a pri výrobe protilátok.

Vo svojom najširšom zmysle sa tento vynález týka zistenia, že glykolipidy budú viesť k systemickej a mukotickej humorálnej odozve na antigén, keď sa zmes, ktorá ich obsahuje, podáva sublinguálne ľuďom alebo zvieratám. Zistilo sa, že sa môže použiť akýkoľvek vhodný sublinguálne podávateľný excipient. Schopnosť glykolipidového adjuvans, keď sa podáva s antigénom sublinguálne, viesť k sérovému IgG, IgG1 a IgG2a ukazuje, že vynález je aplikovateľný na profylaktické vakcíny, ako aj na desenzibilizáciu pri alergii. Schopnosť glykolipidového adjuvans viesť k mukotickému IgA po sublinguálnom podaní ďalej ukazuje, že vynález je užitočným spôsobom generovania mukotickej imunity. Generovanie mukotickej imunity je užitočné pri ochrane proti vzduchom šíreným patogénom a zvlášť proti sexuálne prenášaným chorobám.

Podstatou vynálezu je zmes, ktorá obsahuje (A) najmenej jeden antigén a (B) glykolipidové adjuvans.

Ďalej vynález poskytuje použitie zmesi, ktorá obsahuje najmenej jeden antigén a glykolipidové adjuvans na výrobu lieku na vyvolanie mukotickej a/alebo systemickej imunitnej odozvy u ľudí alebo zvierat, ktoré to potrebujú.

Iným spôsobom sa tento vynález týka použitia najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans na výrobu sublinguálne podávateľného lieku na liečenie mukoticky prenášaných chorôb.

Tieto spôsoby podľa tohto vynálezu generujú IgA-sprostredkovanú imunitnú odozvu.

Iným spôsobom sa tento vynález týka použitia najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans na výrobu sublinguálne podávateľného lieku na vyvolanie IgA imunitnej odozvy.

Táto zmes sa má podávať v účinnom množstve. Pojem účinné množstvo označuje netoxické, ale dostatočné množstvo zmesi na to, aby sa poskytla požadovaná imunologická odozva. Vhodné účinné množstvo môže určiť odborník v tejto oblasti.

Zmesi podľa tohto vynálezu môžu byť buď profylaktické (t. j. chránia pred infekciou), alebo terapeutické (na liečenie chorôb po infekcii).

Výhodne sa táto zmes podáva ľuďom, cicavcom a iným primátom vrátane primátov, ako sú napríklad ľudopopy a opice, hospodárskym zvieratám, ako sú napríklad dobytok, ovce, ošípané, kozy a kone, domácim cicavcom, ako sú napríklad psy a mačky, laboratórnym zvieratám vrátane hlodavcov, ako sú napríklad myši, potkany a morčatá, vtákom vrátane domácich, divokých a lovných vtákov, ako napríklad kurčatá, moriaky a iné hrabavé vtáky, kačice, husi a podobne.

Spôsob podľa tohto vynálezu môže tiež generovať IgG-sprostredkovanú imunitnú odozvu.

Podľa iného aspektu tohto vynálezu sa poskytuje zmes, ktorá obsahuje:

(A) jeden antigén alebo viaceré antigény; a

(B) glykolipidové adjuvans.

Vo zvlášť výhodnom uskutočnení je glykolipid TH1-indukujúce adjuvans.

Výhodne zmes užitočná v tomto vynáleze obsahuje sublinguálne podávateľné zriedľovadlo, excipient alebo nosič, ktorý pomáha dostupnosti (A) a (B) na mieste podávania (mukotické sublinguálne miesto pôsobenia).

Výhodne sa antigén získa z baktérií, vírusu, príónu, neoplazmy, autoantigénu, rastliny, zvierat alebo iných patogenických alebo nepatogenických organizmov, syntetického alebo rekombinantného materiálu.

Antigén môže obsahovať vybrané podiely antigénových molekúl alebo molekúl vyrobených pomocou syntetických alebo rekombinantných technológií.

Výhodne je antigénom nejaký alergén. Alergény sú typy antigénov, ktoré majú sklon vyvolať alergiu. Alergén môže obsahovať vybrané podiely alergénových molekúl alebo molekúl vyrobených pomocou syntetických alebo rekombinantných technológií.

Dalej v tomto dokumente slová antigén alebo antigény zahrnujú slovo alergén alebo alergény.

5 Výhodne je antigén vo forme polypeptidu, cukru alebo lipidu. Alternatívne môže byť antigén vo forme vektora, ktorý obsahuje polynukleotid kódujúci antigénový polypeptid a kde tento polynukleotid je fungujúco naviazaný na regulačnú sekvenciu, ktorá riadi expresiu tohto polynukleotidu.

Výhodne je TH1-indukujúcim adjuvans, ale nie je naň obmedzené, MPL(r) adjuvans, 3D-MPL alebo jeho derivát alebo soľ, alebo je to nejaké iné TH1-indukujúce adjuvans alebo kombinácia takýchto adjuvans.

10 Výhodne je zmes vo forme vakcíny.

Výhodne je zmes vo forme vodného roztoku, gélu, náplasti, pastilky, kapsuly alebo tablety, najvýhodnejšie ako vodný alebo gélový roztok.

Tento vynález tiež poskytuje použitie zmesi na výrobu lieku na liečenie alebo prevenciu bakteriálnej, vírusovej, prírónonej infekcie alebo iných chorôb, ako napríklad rakoviny, autoimunity alebo alergie u ľudí alebo zvierat.

15 Vynález ďalej poskytuje použitie zmesi v spôsobe výroby jednej protilátky alebo viacerých protilátok, ktoré rozpoznávajú tento antigén. Vyrobená protilátka môže byť použitá na výrobu lieku na liečenie bakteriálnej alebo vírusovej infekcie, rakoviny, autoimunity alebo alergie u ľudí alebo zvierat. Tento vynález je zvlášť dôležitý vo vzťahu k vzduchom prenášaným patogénom a sexuálne prenášaným chorobám.

20 Tento vynález ďalej poskytuje spôsob prípravy antisérového alebo imuno-globulínového prípravku z neho, ktorý zahrnuje imunizovanie ľudí alebo zvierat zmesou podľa vynálezu.

Tento vynález tiež poskytuje spôsob prípravy zmesi podľa tohto vynálezu, ktorý zahrnuje zmiešavanie roztoku antigénov a glykolipidového adjuvans s farmaceuticky prijateľným zried'ovadlom, nosičom alebo excipientom, výhodne vodným roztokom alebo gélom.

25 Ďalšie rôzne výhodné rysy a uskutočnenia tohto vynálezu budú teraz opísané pomocou neobmedzujúceho príkladu.

Imunitná odozva

30 Imunitná odozva je selektívna odozva spôsobená pomocou imunitného systému stavovcov, u ktorých sú špecifické protilátky a/alebo cytotoxické bunky tvorené proti napádajúcim mikroorganizmom, parazitom, transplantovanému tkanivu a mnohým iným látkam, ktoré sa rozpoznávajú ako cudzie pre telo, t. j. antigény. Tvorba protilátok cirkulujúcich v krvi je známa ako humorálna odozva; tvorba cytotoxických buniek je známa ako bunkami sprostredkovaná alebo bunková imunitná odozva.

35 Bunky zahrnuté do imunitného systému sú organizované do tkanív a orgánov tak, aby uskutočňovali svoje funkcie najúčinnejšie. Tieto štruktúry sa kolektívne označujú ako lymfatický systém. Lymfatický systém obsahuje lymfocyty, spolupracujúce bunky (makrofágy a antigén prezentujúce bunky) a v niektorých prípadoch epitelové bunky. Je usporiadaný buď do diskkrétne uzavretých orgánov, alebo zoskupení difúzneho lymfoidného tkaniva. Hlavné lymfatické orgány a tkanivá sa klasifikujú buď ako primárne (centrálne), alebo sekundárne (periférne). Tento vynález sa sústreďuje na sekundárne lymfatické orgány. Sekundárne lymfatické orgány zahrnujú so sliznicami spojené tkanivá a poskytujú prostredie, v ktorom lymfocyty môžu interagovať navzájom, so spolupracujúcimi bunkami a antigénmi.

40 Podrobnejšie povedané, generovanie lymfocytov v primárnych lymfatických orgánoch (lymfopoéza) je nasledované ich migráciou do periférnych sekundárnych tkanív. Sekundárne lymfatické tkanivá obsahujú dobre organizované uzavreté orgány - slezinu a lymfatické uzliny - a neuzavreté zoskupenia, ktoré sa nachádzajú v tele. Väčšina neorganizovaného lymfatického tkaniva sa nachádza v tkanive spojenom s mukotickými povrchmi a nazýva sa so sliznicami spojené lymfatické tkanivo (MALT).

45 Sliznicový systém chráni organizmus pred vstupom antigénov do tela priamo cez mukotické epitelové povrchy. Lymfatické tkanivá sa nachádzajú teda v spojení s povrchmi vystielajúcimi intestinálny trakt, respiračný trakt a genitourinárny trakt. Tento vynález sa zvlášť týka lymfatických tkanív, ktoré sú spojené s povrchmi vystierajúcimi sublinguálnu oblasť. Hlavný mechanizmus účinku na tomto mieste pôsobenia je vylučovanie IgA (sIgA), vylučovaného priamo na mukotické epitelové povrchy alebo do traktu.

50 Vylučovanie IgA predstavuje viac ako 95 % všetkých Ig nachádzajúcich sa v sekretoch a je primárne dimérny s dvoma monomérnymi jednotkami kovalentne spojenými s J reťazcom. Dimérny IgA sa viaže na polymérny imunoglobulínový receptor pIGR na bazálnom povrchu mukotických epitelových buniek. Tento IgA-pIGR komplex je endocytózovaný a transportovaný na apikálny (luminálny) povrch epitelovej bunky. Počas tohto transportného procesu sa malá časť pIGR štiepi, pričom sa zostávajúca zložka teraz nazýva sekrečná zložka. Teda IgA je vylučovaný ako dimérny IgA viazaný na sekrečnú zložku.

Vylučovanie IgA neaktivuje doplnkový systém, ale pokrýva baktérie a vírusy, ako napríklad vírusu detskej obrny, Cocksackie-vírusu, rotavírusu a vírusu herpesu, čím bráni ich zachyteniu na mukotický výstelkový

epitel. Niektoré vírusy na povrchu epitelu môžu tiež byť neutralizované pomocou pIGR-internalizovaného IgA.

Generovanie vylučovaného IgA, a teda generovanie mukotickej imunitnej odozvy (ďalej v tomto dokumente MIR), môže byť detegované použitím techník štandardných v tejto oblasti techniky, ako je napríklad ELISA. Len ako príklad sa opisuje v odseku Prípravná časť príkladu 1 štandardizovaný ovalbumínový ELISA test použitý v príkladoch 1 a 2.

MIR na antigén môže viesť k stavu systemickkej odozvy na rovnaký antigén, známemu ako mukotická alebo orálna tolerancia. Teda mukotická imunizácia je účinnou cestou na stimulovanie aj lokálnej a systemickkej imunitnej odozvy.

Antigén

Historicky sa v tomto odbore pojem antigén používal pre akúkoľvek molekulu, ktorá iniciuje B bunky vytvárať špecifické protilátky. Teraz však tento pojem môže byť používaný na označenie akejkoľvek molekuly, ktorá môže byť špecificky rozpoznávaná pomocou adaptívnych prvkov imunitnej odozvy, t. j. pomocou B buniek alebo T buniek, alebo pomocou oboch. Teda pojem antigén sa chápe v tejto oblasti techniky tak, že znamená molekulu, ktorá reaguje s vopred vytvorenými protilátkami a/alebo s rôznymi špecifickými receptormi na T a B bunkách. Táto definícia zahŕňa to, čo je tradične známe ako alergény, t. j. čínidlá, ako je napríklad peľový prach, ktorý spôsobuje IgE-sprostredkovanú hypersenzitivitu.

Alergia (typ I hypersenzitivity) je odozva na environmentálny antigén (alergén), pri ktorej sa IgE protilátky tvoria v relatívne veľkých množstvách u alergických subjektov v porovnaní s nealergickými osobami a je spojený so žírnyimi bunkami a konkrétne bazofilnými granulocytmi. Okamžitá hypersenzitívna reakcia je tvorená produktmi žírnych buniek (histamín atď.), keď sa uvoľnia po reakcii medzi IgE na povrchu žírnej bunky alebo bazofilného granulocytu a alergénom spôsobujúcim astmu, sennú nádchu, sérovú nemoc, systematickú anafylaxiu alebo kontaktnú dermatitídu. Existujú štyri typy hypersenzitívnej reakcie (Typy I, II, III a IV). Typ II a III sú protilátkami sprostredkované; štvrtý je sprostredkovaný hlavne pomocou T buniek a makrofágov. Vynález umožňuje imunizovať alergénom tak, aby sa odišlo od alergickej IgE imunitnej odozvy k nealergickej imunitnej odozve.

Teda antigén používaný v tomto vynáleze môže byť alergén získaný z akejkoľvek alergie spôsobujúcej látky, ako napríklad peľ (napríklad burinový alebo brezový peľ), strava, jed hmyzu, pleseň, zvieracia kožušina alebo roztoče domového prachu (*D. farinae* alebo *D. pteronyssinus*).

Antigénom používaným v tomto vynáleze je výhodne imunogén, t. j. antigén, ktorý aktivuje imunitné bunky tak, že generujú imunitnú odozvu proti sebe.

Vo výhodnom uskutočnení sa tento vynález týka prípravku určeného na použitie ako vakcína a antigén je užitočný v takejto vakcíne.

Antigénom používaným v tomto vynáleze môže byť akýkoľvek vhodný antigén, ktorý je dostupný alebo sa stáva dostupným.

Typ antigénu používaného vo vakcíne závisí od mnohých faktorov. Vo všeobecnosti, čím viac antigénov z mikrobov sa zachová vo vakcíne, tým lepšie a živé organizmy majú sklon byť účinnejšie než usmrtené organizmy. Výnimky z tohto pravidla sú choroby, kde je za patogenický účinok zodpovedný nejaký toxín. V tomto prípade vakcína môže byť založená na toxíne alebo toxoide samotnom.

Antigén používaný v tomto vynáleze môže byť získaný z akéhokoľvek žijúceho organizmu; intaktného alebo nežijúceho organizmu; subcelulárnych fragmentov; toxoidov; rekombinantných na DNA založených antigénov alebo anti-idiotypov alebo syntetických antigénov. Antigén môže byť získaný z prirodzených alebo oslabených organizmov, ktorými môžu byť vírusy alebo baktérie. Typ antigénu môže byť zapuzdrený polysacharid, povrchový alebo interný antigén. Ak je antigénom rekombinantný na DNA založený antigén, môže sa získať z klonovaných a exprimovaných génov alebo nahej DNA.

Antigén môže byť modifikovaný pomocou reakcie napríklad so sieťujúcim činidlom, ako napríklad dialdehydom, konkrétnejšie s glutaraldehydom.

Mikroorganizmy, proti ktorým sú dostupné alebo sú hľadané vakcíny, zahŕňujú napríklad *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Bordetella*, *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Brucella*, *Haemophilus* a *Escherichia coli*.

Výhodné vakcíny zahŕňujú kravské kiahne (pre pravé kiahne); vole bacillus (pre bacil tuberkulózy); obrna; osýpky, príušnice; rubeola; žltá horúčka; varicella-zoster; BCG; besnota; chrípka; hepatitída A; týfus; čierny kašeľ; brušný týfus; cholera; mor; penumokok; meningokok; *Haemophilus influenzae*; hepatitída B; hepatitída C; tetanus a záškrť. Na toxíne založené vakcíny zahŕňujú *Chlostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* a *Clostridium perfringens*.

Ďalšie hlavné choroby, pre ktoré môžu byť vakcíny užitočné, zahŕňujú HIV, herpes, vírusy, adenovírusy, rinovírusy, stafylokoky, skupina A streptokokov, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia*, *Candida*, *Pneumocystis*, malária, trypanosomiáza, Chagasova choroba, schistosomiáza a onchocerkóza.

Sexuálne prenášané choroby, pre ktoré vakcíny môžu byť užitočné, zahŕňajú okrem zmieneneho HIV a herpesu *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, chlamýdie, *Calymmatobacterium granulomatis* a hepatitídu.

5 Bola tiež demonštrovaná prítomnosť tumorových antigénov a v dôsledku toho vznikol koncept vakcinácie proti rakovine. V princípe tiež počatie a implantácia môžu byť prerušené pomocou vyvolania imunity proti širokému rozsahu tehotenských a iných reprodukčných hormónov.

Typicky bude antigénom polypeptid, ale môžu sa tiež používať alternatívne antigénové štruktúry, ako napríklad nukleové kyseliny, cukry, lipidy, celé alebo oslabené organizmy, ako napríklad vírusy, baktérie alebo prvoky.

10 Pojem polypeptid sa používa všeobecne na označenie molekúl zostavených z mnohých aminokyselín, aminokyseliny sú spojené navzájom kovalentne, napríklad pomocou peptidových väzieb. Všeobecne sa polypeptid používa zameniteľne s pojmami proteín alebo peptid, v čom sa nezahrnuje rozdiel vo veľkosti alebo funkcii. Rekombinantné polypeptidy môžu byť pripravené pomocou postupov dobre známych v tomto odbore tak, ako sú napríklad postupy opísané v Sambrook a spol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2. vydanie, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989).

Glykolipidové adjuvans

Vo všeobecnom zmysle adjuvans je látka, ktorá nešpecificky zosilňuje imunitnú odozvu na antigén, t. j. je imunostimulantom. Vo všeobecnom zmysle glykolipid je lipidová molekula bunkovej membrány s cukrovým reťazcom pripojeným na hydrofóbny koniec. Výhodnými glykolipidovými adjuvans podľa tohto vynálezu sú modifikované lipopolysacharidy. Lipopolysacharid je modifikovaný tak, že jeho toxicita je znížená v porovnaní so zodpovedajúcim divokým typom lipopolysacharidu alebo lipopolysacharidu, z ktorého bol získaný. Výhodne je glykolipidové adjuvans používané v tomto vynáleze detoxifikovaný enterobakteriálny lipopolysacharid alebo jeho lipidová A zložka. Pojem detoxifikovaný označuje aj úplne netoxický mutant, aj mutant s nízkou zvyškovou toxicitou toxínu. Výhodne zachováva detoxifikované adjuvans menej než 0,01 %, výhodnejšie 0,001 % zo zodpovedajúceho divokého typu toxínu. Toxicita môže byť meraná v CHO bunkách pomocou vyhodnotenia morfológických zmien.

Výhodne je glykolipidovým adjuvans TH1 indukujúce adjuvans. Ako TH1 indukujúce adjuvans mienime adjuvans, ktoré má vlastnosti, ktoré zvyšujú TH1 odozvu na antigén. Avšak takéto adjuvans môže tiež mať sklon jednoducho zvýšiť hladinu protilátky alebo hladinu vytvorených antigén špecifických buniek alebo dokonca pomocou indukovania modulačných cytokínov spôsobiť anergiu (neprítomnosť odozvy) v niektorých populáciách buniek.

Podrobnejšie povedané, imunitná odozva na antigén je všeobecne buď T bunkami sprostredkovaná (čo môže zahŕňať zabíjanie buniek), alebo humorálna (tvorba protilátok cestou rozpoznania epitopov antigénu). 35 Obraz cytokínovej produkcie pomocou T buniek zahrnutých v imunitnej odozve môže ovplyvniť ktorý z týchto typov odozvy prevláda; napríklad bunkami sprostredkovaná imunita (TH1) je charakterizovaná vysokou tvorbou IL-2 a IFN γ ale nízkou IL-4 tvorbou, kým pri humorálnej imunite (TH2) obrazom môže byť nízky IL-2 a IFN γ , ale vysoký IL-4, IL-13, IL-5. Odozvy sú obvykle modulované na hladine sekundárnych lymfatických orgánov alebo buniek, takže farmakologická manipulácia cytokínových obrazov špecifických T buniek a antigén prezentujúcich buniek môže ovplyvniť typ a rozsah generovanej imunitnej odozvy.

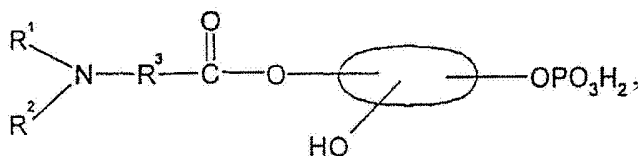
40 TH1-TH2 rovnováha označuje premenu alebo prevládanie dvoch rôznych foriem pomocných T buniek. Tieto dve formy majú veľký rozsah a často protichodné účinky na imunitný systém. Ak imunitná odozva uprednostňuje TH1 bunky, potom tieto bunky budú viesť bunkovú odozvu spojenú s tvorbou protilátok, kým TH2 bunky budú viesť protilátkovo dominujúcu odozvu. Izotyp protilátok zodpovedných za niektoré alergické reakcie IgE a s tým spojené zápalové odozvy sú vyvolané cytokínmi z TH2 buniek.

Účinnosť nejakého adjuvans ako TH1 indukujúceho adjuvans môže byť určená pomocou určenia profilu protilátok namierených proti antigénu v dôsledku podávania tohto antigénu vo vakcínach, ktoré tiež obsahovali rôzne adjuvans.

50 Výhodne je ako adjuvans použitý modifikovaný lipopolysacharid. Ako sa opisuje v US patente č. 4,912,094, enterobakteriálne lipopolysacharidy (LPS) sú silné imunostimulanty. Môže však tiež vyvolať škodlivé a niekedy zhubné odozvy. V súčasnosti je známe, že endotoxické aktivity spojené s LPS sú spôsobené jeho lipidovou A zložkou. Preto tento vynález výhodnejšie používa detoxifikovaný derivát lipidu A. Corixa Corporation vyrába derivát lipidu A pôvodne známy ako prečistený detoxifikovaný endotoxín (RDE), ktorý sa ale stal známy ako monofosforyl-lipid A (MPL(r) adjuvans). MPL(r) adjuvans môže byť vyrábané pomocou refluxovania LPS alebo lipidu A získaného z bezheptózových mutantov gram negatívnych baktérií (napríklad *Salmonella* sp.) v roztokoch minerálnych kyselín so strednou silou (napríklad 0,1 mol/l HCl) počas doby asi 30 minút. Toto opracovanie spôsobí stratu fosfátovej skupiny v polohe 1 redukujúceho konca glukozamínu. Okrem toho počas tohto opracovania môže byť odstránené zo 6' polohy neredukujúceho glukozamínu jadro cukru. MPL(r) adjuvans a 3-deacylovaný monofosforyl-lipid A a spôsoby ich výroby sú opísané v US patente č. 4,436,727 a US patente č. 4,912,094 a preverenom certifikáte B1 4,912,094.

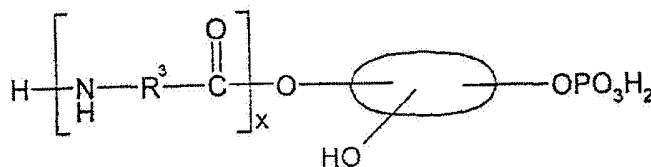
Výhodne sa však používa modifikovaný LPS alebo lipid A, v ktorom si detoxifikovaný lipid A zachováva jadro skupiny pripojenej na 6' polohu neredukujúceho glukóзамínu. Takéto deriváty LPS a lipidu A sú tiež opísané v US Patente č. 4,912,094. Podrobnejšie povedané, US patent č. 4,912,094 opisuje modifikovaný lipopolysacharid, ktorý sa získa pomocou spôsobu selektívneho odstránenia len P-hydroxymyristového acylového zvyšku lipopolysacharidu, ktorý je esterovo naviazaný na redukujúci koniec glukóзамínu v polohe 3' tohto lipopolysacharidu, ktorý zahŕňa podrobenie tohto lipopolysacharidu alkalickéj hydrolyze. Takýto de-*O*-acylovaný monofosforyl-lipid A (MPL(r) adjuvans), difosforyl-lipid A (DPL) a LPS môže byť používaný v tomto vynáleze. Teda vo výhodnom uskutočnení tento vynález používa MPL(r) adjuvans, DPL alebo LPS, v ktorých poloha 3' redukujúceho konca glukóзамínu je de-*O*-acylovaná. Tieto látky sú známe ako 3D-MPL, 3D-DPL a 3D-LPS.

V US patente č. 4,987,237 sú opísané deriváty MPL(r) adjuvans, ktoré majú vzorec:

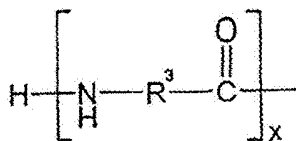


kde R¹ a R² sú H, R³ je priamy alebo rozvetvený reťazec uhl'ovodíka zložený z C, H a voliteľne O, N a S, ktoré, ak ich je viac ako jeden atóm, môžu byť rovnaké alebo rôzne, kde celkový počet C atómov nepresahuje 60, a krúžok predstavuje MPL jadro.

Alternatívne má derivát MPL(r) adjuvans vzorec



Kde segment derivátu predstavovaný



obsahuje 2 až 60 C atómov a kde R³ je priamy alebo rozvetvený reťazec uhl'ovodíka zložený z C, H a voliteľne O, N a S, ktoré, ak ich je viac ako jeden atóm, môžu byť rovnaké alebo rôzne, a x je a minimálne 1 a môže to byť akékoľvek celé číslo také, že celkový počet C atómov v celom x segmente nepresahuje 60, a kde chemická štruktúra každého R³ môže byť rovnaká alebo rôzna v každom takomto segmente a kde krúžok predstavuje MPL jadro.

Jedno komerčne dostupné adjuvans od Corixa Corporation obsahuje 2 % hmotnostné Skvalene, 0,2 % hmotnostného Tween 80 a ako aj MPL(r) adjuvans.

Iným komerčne dostupným adjuvans je Detox(r) adjuvans (Corixa Corporation), ktorý obsahuje MPL(r) adjuvans a skelet steny mykobakteriálnych buniek.

Všetky takéto deriváty alebo soli LPS alebo lipidu A, ktoré sú alebo sa stávajú dostupné, sa môžu používať v tomto vynáleze. Výhodné deriváty a soli sú tie, ktoré sú farmaceuticky prijateľné.

TH1 indukujúce adjuvans sa môže zmiešať s inými zložkami zmesi priamo pred podávaním. Alternatívne sa môže pripraviť spolu s inými zložkami počas výroby produktu. Alternatívne sa môže podávať v rôznom čase než iné zložky. Podávanie môže byť mnohými spôsobmi. Výhodne sa glykolipidové adjuvans podáva v množstve od 1,0 mg do 250 mg, výhodnejšie 25 mg až 50 mg.

Vakcíny

Jeden aspekt tohto vynálezu sa týka spôsobu vyvolania imunologickej odozvy, výhodne mukotickej imunologickej odozvy u cicavcov, výhodne ľudí, ktorý zahŕňa sublinguálne očkovanie jedinca zmesou podľa tohto vynálezu na vyvolanie protilátkovej, výhodne IgA a/alebo T bunkovej, imunitnej odozvy. Výhodne je odozva adekvátna na ochranu tohto jedinca pred infekciou, zvlášť bakteriálnou alebo vírusovou infekciou. Výhodne je odozva adekvátna na ochranu tohto jedinca pred chorobou, bez ohľadu na to, či choroba už začala u tohto jedinca alebo nie. Teda imunologická odozva sa môže používať terapeuticky alebo profylakticky.

Vakcíny môžu byť pripravené zo zmesi podľa tohto vynálezu. Príprava vakcíny obsahujúcej antigén ako aktívnu zložku je známa odborníkom v tejto oblasti techniky. Typicky sa takéto vakcíny pripravujú buď ako kvapalné roztoky, alebo suspenzie; môžu sa tiež pripraviť tuhé formy vhodné na prípravu roztoku alebo sus-

penzie v kvapaline pred podávaním. Prípravkom môže tiež byť gél, emulzia, alebo zmes zapuzdrená v lipozómoch. Vhodné excipienty sú napríklad voda, fosforečnan amónny, dextróza, glycerol, etanol alebo podobne a ich kombinácie.

Zmesi zahrnujú také normálne používané excipienty, ako je napríklad manitol, laktóza, škrob, stearan horečnatý, sacharín sodný, celulóza, uhličitan horečnatý farmaceutickej čistoty a podobne. Tieto zmesi majú formu roztokov, suspenzií, tabliet, piluliek, kapsúl, prípravkov s trvalým uvoľňovaním alebo práškov a obsahujú 10 % až 95 % hmotnostných aktívnej zložky, výhodne 25 % až 70 % hmotnostných. Ak vakcínová zmes je lyofilizovaná, lyofilizovaný materiál môže byť rekonštituovaný pred podávaním napríklad ako suspenzia. Rekonštitúcia sa výhodne uskutočňuje v pufrí.

Okrem toho, ak sa to požaduje, vakcína môže obsahovať minoritné množstvá pomocných látok, ako sú napríklad zvlhčujúce alebo emulzifikačné činidlá, pH pufrujúce činidlá a/alebo ďalšie adjuvans, ktoré zvyšujú účinnosť vakcíny.

Podiel antigénu a adjuvans sa môže meniť v širokom rozsahu, pokiaľ sú obe prítomné v účinných množstvách. Typicky sú vakcíny upravené tak, aby obsahovali konečnú koncentráciu antigénu v rozsahu 0,2 µg/ml až 200 µg/ml, výhodne 5 µg/ml až 50 µg/ml, najvýhodnejšie asi 15 µg/ml. Výhodný prípravok sa môže určiť pomocou známeho postupu rozsahu dávkovania a odkaz sa nachádza v Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company) 19. vydanie, 1995.

Po príprave môže vakcína byť včlenená do kontajnera, ktorý môže byť sterilný, ktorý sa môže potom uzavrieť a uskladniť pri nízkej teplote, napríklad 4 °C, alebo sa môže vysušiť mrazom. Lyofilizácia umožňuje dlhodobé uskladnenie v stabilizovanej forme.

Antigény používané v tomto vynáleze môžu byť upravené do vakcíny ako neutrálne alebo solné formy. Farmaceuticky prijateľné soli zahrnujú kyslé adičné soli (vytvorené s voľnými aminoskupinami peptidu) a soli, ktoré sú tvorené s anorganickými kyselinami, ako je napríklad kyselina chlorovodíková alebo fosforečná, alebo organickými kyselinami, ako je napríklad kyselina octová, šťavelová, vínna a maleínová. S voľnými karboxylovými skupinami môžu tiež byť získané soli tvorené s anorganickými bázami, ako je napríklad hydroxid sodný, draselný, amónny, vápenatý alebo železitý, a organickými bázami, ako je izopropylamín, trimetylamín, 2-etylaminoetanol, histidín a prokaín.

Zmes bude poskytovaná ako tablety, kapsuly alebo iné vhodné prípravky s excipientami požadovanými na výrobu takýchto prípravkov.

Príprava protilátok použitím zmesi podľa tohto vynálezu

Zmesi podľa tohto vynálezu sa môžu používať priamo ako imunogény pomocou spôsobov podávania opísaných v tomto dokumente, bez použitia ďalších adjuvans na generovanie antiséra, špecifických imunoglobulínov alebo monoklonálnych protilátok. Vynález teda poskytuje spôsob vyvolania tvorby antigén-špecifických imunoglobulínov, ktorý zahŕňa kroky:

- a) imunizovanie zvierat zmesou podľa vynálezu;
- b) získanie imunoglobulínu špecifického pre oblasť antigénu zmesi zo séra zvierat, a
- c) selektovanie klonov buniek produkujúcich monoklonálne protilátky.

Techniky generovania protilátok sú vysvetlené v Kohler a Milstein, Nature (1975) 256: 495-497.

Zvieratami používanými na tvorbu protilátok môžu byť akékoľvek zvieratá normálne používané na tento účel, zvlášť cicavce. Zvlášť sú indikované myši, potkany, morčatá a králiky. Zvieratá sa opracujú s prípravkami opísanými v tomto dokumente.

Konkrétnejšie povedané, prípravok podľa tohto vynálezu, ktorý obsahuje antigén, sa môže používať na výrobu protilátok, aj polyklonálnych, aj monoklonálnych. Ak sa požadujú polyklonálne protilátky, imunizuje sa vybraný cicavec (napríklad myš, králik, koza, kôň atď.). Odoberie sa sérum imunizovaných zvierat a spracuje sa podľa známych postupov. Ak sérum obsahuje polyklonálne protilátky na iné antigény, požadované polyklonálne protilátky sa môžu čistiť pomocou imuno-afinitnej chromatografie. Techniky na vyvolanie a spracovanie polyklonálnych antisér sú známe v tomto odbore.

Monoklonálne protilátky namierené proti antigénom používaným v tomto vynáleze môžu tiež byť ľahko vyrábané odborníkmi v tejto oblasti techniky. Všeobecná metodológia výroby monoklonálnych protilátok pomocou hybridómov je dobre známa. Nesmrteľné protilátky produkujúce bunkové kmene sa môžu vytvoriť pomocou fúzie buniek a tiež pomocou iných techník, ako napríklad priamou transformáciou β-lymfocytov s onkogénnou DNA, alebo transfekciou s vírusom Epstein-Barr. Panely monoklonálnych protilátok vytváraných proti antigénom môžu byť triedené podľa rôznych vlastností; t. j. podľa izotypu a epitopovej afinity.

Alternatívna technika zahŕňa skríning fágových zobrazovacích knižníc, kde napríklad fág exprimuje scFv fragmenty na povrchu svojho pokrytia s veľmi rôznymi hypervariabilnými úsekmi imunoglobulínových reťazcov (CDR). Táto technika je dobre známa v tomto odbore.

Protilátky, aj monoklonálne, aj polyklonálne, ktoré sú namierené proti antigénom, sú zvlášť užitočné v diagnostike a tie, ktoré sú neutralizujúce, sú užitočné pri pasívnej imunoterapii. Monoklonálne protilátky,

konkrétne môžu byť používané na vznik antiidiotypových protilátok. Antiidiotypové protilátky sú imunoglobulíny, ktoré nesú vnútorný obraz antigénu infekčného činiteľa, proti ktorému sa požaduje ochrana.

Techniky vzniku antiidiotypových protilátok sú známe v tomto odbore. Tieto antiidiotypové protilátky môžu tiež byť užitočné na liečenie, ako aj na objasnenie imunogénnych oblastí antigénov.

- 5 Na tieto účely tohto vynálezu zahrnuje pojem protilátky, ak to nie je špecifikované inak, fragmenty celkových protilátok, ktoré si zachovávajú ich aktivitu viazania sa na cieľový antigén. Takéto fragmenty zahŕňajú Fv, F(ab') a F(ab')₂ fragmenty, ako aj jednotlivé reťazce protilátok (scFv). Ďalej protilátky a ich fragmenty môže byť humanizovanými protilátkami, ako sa napríklad opisuje v EP-A- 239400.

10 Príprava zmesi

- Zmes podľa tohto vynálezu môže byť pripravená pomocou zmiešavania vodného roztoku antigénu s glykolipidovým adjuvans a pridaním mukoticky podáateľného zriedovadla, excipienta alebo nosiča buď pred zmieneným zmiešaním alebo po zmienenom zmiešaní. Alternatívne môže byť glykolipidové adjuvans spoluzrážané s antigénom. Aj zmiešané alebo aj spoluzrážané s inými zložkami zmesi pred podávaním môže byť glykolipidové adjuvans podávané na rôzne miesta a/alebo v inom čase než iné zložky. Zmes glykolipidového adjuvans a antigénu môže tiež byť včlenená do gélov, kapsúl, pastiliek atď., alebo môže tiež byť poskytovaná v rôznych úpravách, ako sú náplasti, ktoré môžu byť dvoj- alebo výhodne jednostranné.

- MPL (alebo iné TH1-indukujúce adjuvans), ktoré bolo rozpustené pomocou opracovania ultrazvukom alebo inými prostriedkami (opísané neskôr v časti Príprava roztoku MPL(r) adjuvans), môže byť pred jeho pridaním k antigénom zriedené rôznymi prostriedkami. Prípravok MPL sa počiatočne vyrobí s koncentráciou typicky medzi 0,5 mg na ml a 4 mg na ml, napríklad 1 mg na ml. Môže potom byť zriedený na koncentráciu medzi 500 µg/ml a 20 µg/ml, výhodne 100 µg/ml. Toto zriedenie sa môže urobiť v čistej vode alebo v iných rozpúšťadlách, ako napríklad vo vodnom roztoku glycerolu obsahujúcom medzi 1 % a 50 % hmotnostnými glycerolu.

- 25 Vhodné fyziologicky prijateľné nosiče a zriedovadlá zahŕňujú sterilnú vodu alebo vodný roztok 5 % hmotnostných dextrózy. Zmesi sú určené na humánne alebo veterinárne použitie a sú upravené na podávanie na sliznicu, výhodne na sublinguálne podávanie.

- Cesty podávania a dávkovanie opísané v tomto dokumente sú zamýšľané len ako návod, pretože skúsený praktik bude schopný ľahko určiť optimálnu mukotickú cestu podávania a dávku pre akéhokoľvek konkrétneho pacienta a stav.

Príprava, dávkovanie a podávanie zmesí

- Zmes podľa tohto vynálezu môže vhodne byť pripravená s farmaceuticky prijateľným zriedovadlom, nosičom alebo excipientom vhodným na sublinguálne podávanie. Podrobnosti farmaceutických excipientov sa môžu nájsť v Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2. vydanie (1994), The Pharmaceutical Press, London, Editors: Wade & Weller.

- Zistili sme, že dôležitým aspektom tohto vynálezu je sublinguálne podávanie zmesi podľa tohto vynálezu. Môže sa očakávať, že gélový alebo iný viskózný prípravok bude výhodný v dôsledku zvýšeného kontaktu antigénu so sublinguálnym povrchom. Tento výsledok sa však môže tiež dosiahnuť s inými prípravkami, ako je napríklad vodný roztok. Pri myšiach, sa zistilo, že jednoduchý roztok poskytuje podobné výsledky ako gélový prípravok. Nie je požadované, ani vhodné, aby prípravok bol fyzikálne alebo chemicky viazaný na tkanivo sliznice.

- Prípravky vhodné na sublinguálne podávanie zahŕňujú vodné a nevodné sterilné roztoky, ktoré môžu obsahovať antioxidanty, pufre, bakteristické látky a rozpustené látky, ktoré robia prípravok izotonickým s telesnou kvapalinou jedinca, výhodne sliznicou, vodné a nevodné sterilné suspenzie, ktoré môžu zahŕňovať suspenzačné činidlá alebo zahusťujúce činidlá. Prípravky môžu byť poskytované v jednodávkovom alebo multidávkovom kontajneri, napríklad ako uzavreté ampuly a liekovky, a môžu sa uskladniť v mrazom vysušenom stave vyžadujúcom bezprostredne pred použitím len pridanie sterilného kvapalného nosiča.

- 50 Výhodne je tiež v zmesi podľa tohto vynálezu prítomný nosič. Nosičom môže byť emulzia olej vo vode alebo hlinitá soľ, ako napríklad fosforečnan hlinitý alebo hydroxid hlinitý.

Netoxické emulzie olej vo vode výhodne obsahujú netoxický olej, napríklad skvalán alebo skvalén, emulzifikátor, napríklad Tween 80, vo vodnom nosiči. Vodným nosičom môže byť napríklad fosfátom pufrovaný soľný roztok.

- Tento vynález tiež poskytuje polyvalentnú vakcínovú zmes, ktorá obsahuje vakcínový prípravok podľa tohto vynálezu v kombinácii s inými antigénmi, zvlášť antigénmi užitočnými na liečenie rakoviny, autoimunitných chorôb a príbuzných stavov.

Všeobecne nosiče môžu zahŕňovať, ale nie sú na ne obmedzené, dextrózu, vodu, glycerol, etanol a ich kombinácie.

- 60 Vynález sa ďalej týka farmaceutických pakov a kítov, ktoré obsahujú jeden kontajner alebo viac kontajnerov naplnených s jednou zložkou alebo viacerými zložkami zmienených zmesí podľa vynálezu.

Podávanie týchto zmesí môže byť vo forme hojivých masťí, pást, gélov, roztokov, práškov a podobne. Gély môžu vhodne byť pripravené použitím karbopolu, tiež známeho ako karbomér - karboxyvinylový polymér, alebo zahusťujúceho činidla založeného na celulóze, ako napríklad hydroxyetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza alebo hydroxypropylmetylcelulóza, vápenatá soľ karboxymetylcelulózy, sodná soľ karboxymetylcelulózy, etylcelulóza, metylcelulóza. Gély môže tiež byť vhodne pripravené použitím látok: arabská guma, kyselina alginová, bentonit, cetostearylalkohol, želatína, guarová guma, kremičitan horečnato-hlinitý, maltodextrín, polyvinylalkohol, propylénkarbonát, propylénglykolalginát, koloidný oxid kremičitý, alginát sodný, tragakantová a/alebo xantánová guma. Zvlášť výhodné sú karbopol a činidlá založené na celulóze.

Zmesi sa podávajú spôsobom kompatibilným s prípravkom zvoleným na dávkovanie a v takom množstve, že budú profylakticky a/alebo terapeuticky účinné. Podávané množstvo, ktoré je všeobecne v rozsahu 0,5 µg až 250 µg antigénu na dávku, závisí od liečeného subjektu, kapacity imunitného systému subjektu syntetizovať protilátky a stupňa požadovanej ochrany. Výhodný rozsah je od asi 2 µg do asi 40 µg na dávku. V niektorých prípadoch pacient bude liečený so sériou dávok, ktoré budú zahrňovať režim so stúpajúcou dávkou.

Vhodná veľkosť dávky je asi 0,1 ml, ale v režime dávkovania dávka môže začať s menším objemom a končiť pri vyššom objeme. Presné podávané množstvá aktívnej zložky môžu závisieť od posúdenia praktickým lekárom a môžu byť zvlášť pre každý jednotlivý subjekt.

Zmes môže byť podávaná v rozvrhu jedinej dávky alebo výhodne v mnohonásobnom dávkovom rozvrhu. Mnohonásobný dávkový rozvrh je taký, pri ktorom primárny priebeh vakcinácie môže byť s 1 až 10 oddelenými dávkami, nasledovanými inými dávkami danými v postupných časových intervaloch požadovaných na udržanie a/alebo zosilnenie imunitnej odozvy, napríklad 1 až 4 mesiace pre druhú dávku, a ak je to potrebné, ďalšia dávka(y) po niekoľkých mesiacoch. Keď sa tento produkt používa na liečenie alergie, režimy podávania budú zahrňovať častejšie dávkovanie. Dávkový režim bude tiež najmenej čiastočne určený potrebami jednotlivca a bude závisieť od posúdenia praktickým lekárom.

Okrem toho, zmes obsahujúca antigén(y) môže byť podávaná v spojení s inými imunoregulačnými činidlami, napríklad imunoglobulínmi.

Vynález bude opísaný pomocou nasledujúcich príkladov, ktoré sú uvažované len ako ilustračné, a nie obmedzujúce.

30 Príklady uskutočnenia vynálezu

Príprava roztoku MPL(r) adjuvans

Pripravil sa roztok 4 mg/ml 1,2-dipalmitoyl-SN-glycero-3-fosfocholínu (DPPC) v absolútnom etanole. Na každý 1,0 mg MPL-TEA (trietylamínovej) soli, ktorá sa má solubilizovať, sa pridalo 27 µl DPPC na rozpustenie MPL. MPL môže byť pripravený tak, ako sa opisuje skôr. Etanol sa odstránil pomocou prefúkajúceho prúdom N₂ jemne cez liekovku. Pridal sa ďalší 1,0 ml bezpyrogénovej vody pre injekcie na každý mg MPL vo vysušenej MPL/DPPC zmesi. Roztok sa opracoval ultrazvukom v ultrazvukovom kúpeli pri 60 až 70 °C, kým nebol číry. MPL/DPPC roztok sa potom filtračne sterilizoval pomocou filtrácie cez SFCA 290-4520 Nalgene 0,2 µm filter. MPL/DPPC roztok sa asepticky nadávkoval po 1,0 mg/ml do depyrogenovaných liekoviek, označených MPL-AF (MPL solubilizovaný v povrchovo aktívnom DPPC), a uskladnili sa pri 4 °C.

Prípravok - ovalbumín (XOA)/MPL(r) adjuvans/sublinguálny gél

TH1 indukujúca aktivita u myší môže byť porovnávaná s tvorbou špecifických IgG2a a IgG2b protilátok a TH2 indukujúca aktivita s tvorbou špecifických IgG1 protilátok a IgE protilátok. Špecifické sekrečné IgA protilátky môžu identifikovať, či sa po sublinguálnej imunizácii prejavila mukotická odozva, či už je lokálna (slinné protilátky) alebo dištančná (vaginálne protilátky). Imunogenický potenciál prípravku môže však byť skúmaný pomocou merania samostatnej špecifickej IgG odozvy v sére.

Preto sa ako príklad uskutočnil experiment na myšiach na demonštrovanie profilov na alergén špecifických protilátok k jednému príkladu, ovalbumínu (XOA), ktorý je prijatý ako modelový antigén a je tiež dobre známym alergénom získaným zo slepačích vajčiek.

Zásobné materiály

I. Karbopol TR-1 NF zásoba (0,83 %)

A. 100 mg karbopol TR-1 NF v 20 ml WFI (voda pre injekcie) = 0,9 % hmotn./obj. gél.

B. Do A sa pridalo 0,8 ml 10 % objemových TEOA (trietanolamín) = 0,8 % hmotn./obj. gél.

II. MPL AF glycerol (20 mg/ml)

A. MPL 40 mg

DPPC 4,32 mg

Glycerol 800 µl

Voda pre injekcie - doplnenie 40 ml

Opracovanie ultrazvukom na veľkosť častíc približne 80 nm.

B. Lyofilizovanie

C. Rekonštituovanie s 1,2 ml vody pre injekcie - 20 mg/ml MPL.

III. Zásobný ovalbumín (33 mg/ml)

5 Ovalbumín 33 mg
Voda pre injekcie 1,0 ml

Prípravok pre injekcie

10 Zásobný karbopol 1920 µl
Zásobný ovalbumín 480 µl
Glycerol 480 µl
Voda pre injekcie 720 µl
MPL glycerol 400 µl

1. Karbopol, XOA, glycerol a voda pre injekcie sa pridali do 5 ml liekovky a zmiešali sa pomocou zvierania.

2. Do uvedenej zmesi sa pridal MPL glycerol a uskutočnilo sa premiešanie zvrátením.

15

Imunizácia myší

20 Skupiny piatich osem týždňov starých samíc Balb/C myší sa anestetizovali s ketamínom. Keď myši boli v bezvedomí, 20 µl príslušného gélu obsahujúceho rôzne množstvá XOA sa umiestnilo pod jazyk na dobu 5 minút. Gély sa z úst vypláchli po 5 minútach s 10 ml 0,9 % hmotnostných soľného roztoku použitím striekačky a hrubej ihly.

O tri týždne neskôr sa myši opracovali identicky ako pri prvom opracovaní.

Myšiam sa odobrala krv 2 týždne po druhom opracovaní a odobrali sa séra. Tieto sa testovali na XOA špecifické IgG protilátky použitím ELISA testu.

25

Výsledky

Antiovalbumín IgG odozvy u myší, ktorým sa podávalo buď 83,2 µg, alebo 3,4 µg ovalbumínu a 33,6 µg MPL v 20 µl karbopolového gélu sublinguálnou cestou, opakovane po 3 týždňoch a odber krvi 2 týždne neskôr. (Priemerné OD (optická hustota) hodnoty piatich myší na skupinu).

30

OD hodnoty pri rôznych zriedeniach séra

	1/10	1/30	1/90	1/270	1/610
Skupina 1 dávka 83,2 µg XOA	1,1	1,0	0,75	0,5	0,3
Skupina 2 dávka 3,4 µg XOA	0,6	0,5	0,35	0,15	0,05
Skupina 3 len karbopol	0,15	0,1	0,05	0,05	0,05

Príklad 2

Príprava materiálov na imunizáciu myší

35 Imunizujúce dávky XOA/MPL v karbopole alebo alternatívne v zried'ovadle (vodný prípravok) bez MPL boli pripravené tak, ako sa opisuje v príklade 1 s výnimkou použitia rôznych dávok.

Imunizácia myší

1. Myši sa pred podávaním anestetizovali

2. 20 µl príslušného materiálu sa umiestnilo pod jazyk na dobu 5 minút.

40

Teda každej skupine myší bolo podávané nasledujúce množstvo látky v 20 µl.

Skupina	Antigén	MPL	Excipient
1	80 µg ovalbumínu	20 µg MPL	Karbopol
2	80 µg ovalbumínu	0 µg MPL	Karbopol
3	0 µg ovalbumínu	160 µg MPL	Karbopol
4	80 µg ovalbumínu	40 µg MPL	Zried'ovadlo

3. Materiál sa vypláchol z úst po 5 minútach s 1,0 ml 0,9 % hmotnostného soľného roztoku.

4. Tri týždne po primárnej vakcinácii a znova o dva týždne neskôr sa myši znova opracovali.

45

5. Myšiam sa odobrala krv 2 týždne po tretej aplikácii a séra sa uskladnili až do použitia pri -20 °C. Urobilo sa nazálne a pulmonálne premytie a roztoky sa uskladnili za rovnakých podmienok.

6. Séra a premývacie roztoky sa testovali na ovalbumínové špecifické protilátky tak, ako je uvedené skôr.

Výsledky

Sérové IgG protilátky špecifické pre XOA: titer $\log(2)$ /referenčný titer $(\log)2$ (SD)

5

Skupina	Sérový IgG1	Sérový IgG2a	Sérový IgG
1	0,625 (0,375)	0,35 (0,4)	0,6 (0,3)
2	0	0	0,2 (0,05)
3	0	0	0,25 (0,02)
4	0,95 (0,01)	0,85 (0,2)	1,0(0,05)

Geometrický priemer Anti XOA IgA protilátok v rôznych tekutinách (SD)

Skupina	Sérum	Tekutina z nosa	Tekutina z pľúc
1	0	73,6(154,2)	238,5 (533,4)
2	0	0	0
3	0	0	0
4	2291,3 (2577,1)	568,5 (395,4)	2518,4(3403,1)

10 Silná sérová IgG odozva na XOA vyžaduje prídanie MPL, pri ktorom sa tiež zdá, že stimuloval TH1 typ odozvy indikovanej pomocou IgG2a protilátkovej odozvy.

Novým a neočakávaným zistením bola silná indukcia XOA-špecifickej IgA odozvy, keď sa ako adjuvans používal MPL.

15 Pri myšiach nebola zjavná žiadna výhoda použitia karbopolu ako excipienta. V skutočnosti sa pozoroval silný dôkaz, že vodný prípravok XOA a MPL bol imunogenickejší aj pre IgG aj pre IgA indukciu bez karbopolu. To zahŕňa sérový IgA, jediný viditeľný v neprítomnosti karbopolu. Avšak v prípravku vakcíny je potrebné použiť excipienty a karbopol môže byť užitočným a vhodným excipientom prípravku na použitie u ľudí alebo zvierat.

20 Prípravná časť príkladu 1 - ovalbumínový ELISA test

1. Séra (zriedené 1 : 2 v boritanovom pufri) od každej z piatich myší v každej skupine sa testovali ELISA testom na určenie titrov antiovalbumín IgG alebo IgA protilátok.

2. Na uskutočnenie testu ELISA sa vyžaduje nasledujúce zariadenie a materiály:

25 A. Immulon 2 platňa, 96 kalíškov, ploché dno, DYNATECH LABORATORIES katalógové č. 011-010-3455, tri platne na dávku testovaného produktu (dosť na testovanie séra z 10 myší pri duplikovaní).

B. Ovalbumín (slepačie vajcia), Sigma Grade 5, zásobný roztok (1 mg/ml vo vode pre injekcie) sa vyrobil čerstvý vždy, keď sa robila skúška

C. Čisté (autoklávované) pipetové špičky

D. 20, 100, 200, 1000 (I automatické pipety)

30 E. 8-kanálová automatická pipeta; 200 μ l veľkosť

F. Čisté (nové) 13 mm skúmavky alebo 2 ml kryoliekovky a stojan

G. Parafilm alebo saranová fólia

H. 1 mol/l H_2SO_4

35 I. chren-peroxidázou označené anti-IgG alebo anti-IgA sekundárne protilátky (použité pri 1 : 5000). Southern Biotechnology Associates, Inc.

J. OPD kit: o-fenyléndiamínové tablety, jedna na platňu a zriedčovač. Abbott Labs' *in vitro* Test č. 7181 E. Často dostupné v laboratóriu.

K. Testované séra myší. Séra bolo treba zriediť 1 : 2 v boritanovom pufri na dlhodobé uskladnenie.

L. Boritanový pufer (BB):

40 Nasledujúce zložky sa rozpustia v 4 l sterilnej vody pre injekcie.

12,4 g kyseliny boritej, Fisher Scientific #A73-500

0,764 g boritanu sodného (Borax), Fisher Scientific #S248-500

17,53 g chloridu sodného, Fisher Scientific #5271-500

Roztok sa uskladní pri laboratórnej teplote, expiruje o šesť mesiacov.

45 M. Boritanový pufer + 0,1 % hmotnostného Tween 20 (BB-T20):

Pridá sa ml, Tween-20 (Sigma #P-1379) do 1 litra BB, dôkladne sa premieša. Uskladní sa pri laboratórnej teplote, expiruje o šesť mesiacov.

N. Boritanový pufer-Tween-20-1 % hmotnostné BSA (BB-BSA):

- Rozpustí sa 1,90 g EDTA (tetrasodná soľ, Fisher Scientific #BP 121-500) a 10 g BSA (Fraction V, bez proteázy, Boehringer Mannheim #100-350) v 1 litri BB-T20,
- O. 0,05 mol/l uhličitan/hydrogenuhlčitanový pufrový roztok:
 Rozpustí sa 4,2 g NaHO₃ a 5,3 g Na₂CO₃ v 1 litri RO vody alebo sterilnej vody na irigovanie a nastaví sa pH na 9,6. Uskladní sa pri 4 °C, expiruje o tri mesiace. Pred použitím sa zahreje na laboratórnu teplotu.
- 5 P. Automatická pipeta
 Q. Trepáčka Vortex
 R. Mikrocentrifugačný stojan
 S. Čítač platní, schopný snímať O.D. pri 490 nm
- 10 T. Inkubátor nastavený na 37 °C
 U. 25 ml sérologické pipety (Fisher Scientific)
 V. 15 ml polypropylénové kónické skúmavky (Fisher Scientific)
 W. Misky na činidlá pre multikanálovú pipetu
 X. Automatické zariadenie na umývanie platní
- 15 3. Postup ELISA testu
 A. Viazanie testovaného antigénu
 I. Použitá antigénová koncentrácia na viazanie na platni v teste adjuvans je 50 µg/ml:
 2,5 ml zásobného 1 mg/ml ovalbumínového roztoku sa pridá do 47,5 ml 0,05 mol/l roztoku uhličitan/hydrogenuhlčitan. Toto množstvo je dostatočné na pokrytie štyroch 96 kalíškových platní pri 100 µl na kalíšok.
- 20 II. Platne sa potom prikryjú saranovou fóliou a nechajú sa vyrovnat' a nechajú sa nerušené pri 4 °C v tme počas noci.
 B. Zriedenia séra: Vzorky séra sa krátko zvrú pred zriedením a každá zriedená vzorka sa krátko zvrú pred pridaním na platne. Nová pipetová špička sa používa na odstránenie séra zo zásobných skúmaviek pri príprave zriedení.
- 25 I. Začiatkové zriedenie pre séra získané z myší imunizovaných s adjuvans a ovalbumínom je 1:6.
 C. Blokovanie platní
 I. Keď sa všetky sérové vzorky zriedia, pripravia sa platne pomocou prudkého pretrepania pokrývacieho pufra pri potopení.
- 30 II. Platne sa ostro oklepú na vrstvu papierovej utierky, aby sa odstránil prebytok roztoku. Platne sa premyjú trikrát s BB-T10 premývacím roztokom použitím automatického zariadenia na umývanie platní naprogramovaného na umývanie s 350 µl a dobu čakania 5 sekúnd medzi každým premývaním.
 III. Použitím multikanálovej automatickej pipety sa pridá 250 µl BB-BSA na kalíšok. Prikryje sa a uzavrie so saranovou fóliou a inkubuje sa pri 37 °C počas 30 minút.
- 35 D. Nanášanie na platne
 I. Platne sa prudko pretrepú pri ponorení v blokujúcom puffri a ostro sa oklepú na vrstvu papierovej utierky, aby sa odstránil prebytok roztoku.
 II. Do všetkých kalíškov na platniach sa pridá 100 µl BB-BSA. Pridá sa 100 µl príslušne zriedenej vzorky séra do príslušného kalíška v stĺpci č. 1. Každá vzorka séra sa testovala dvakrát.
- 40 III. Použitím multikanálovej automatickej pipety sa pipetuje 100 µl hore a dolu osemkrát v stĺpci č. 1, aby sa vzorka premiešala, a potom sa 100 µl preniesie na stĺpec č. 2. Znova sa na premiešanie pipetuje hore a dolu osemkrát a 100 µl sa preniesie na stĺpec č. 3. Opakujú sa postupné zriedenia po stĺpec č. 12. Po tom, ako je stĺpec 12 premiešaný 100 µl v špičke pipety, sa vyhodí. Teraz má byť 100 µl v každom kalíšku platne.
- E. Inkubácia
 45 Platne sa prikryjú a uzavrujú saranovou fóliou alebo parafilmom. Platne sa inkubujú počas 1 hodiny pri 37 °C. Nenaviazané protilátky sa odstránia pomocou postupu uvedeného v kroku 3a, znova sa platne premyjú trikrát s BB-T20.
- F. Konjugácia
 I. Pripraví sa peroxidázou označený anti-IgG sekundárne protilátky konjugát zriedením 1 : 5000 v BB-BSA (10 µl protilátky v 50 ml BB-BSA v 50 ml kónickej skúmavke). Skúmavka sa prevráti >20-krát a mieša sa na trepačke počas 30 sekúnd, aby sa dôkladne premiešala. Zriedené protilátky sa vylejú do čistej reakčnej misky. Anti-IgA konjugát môže byť pripravený zodpovedajúcim spôsobom.
- 50 II. 100 µl konjugátového roztoku sa pridá do každého kalíšku platne, vrátane blankových kalíškov.
 III. Platne sa zakryjú a inkubujú počas 1 hodiny pri 37 °C.
 IV. Konjugátový roztok sa odstráni a platne sa premyjú trikrát ako v kroku 3a.
- 55 G. Vyvolanie zafarbenia:
 I. Pripraví sa zmes substrát/kolorimetrické činidlo 10 až 15 minút pred použitím (aby sa mu poskytol čas na úplné rozpustenie) rozpustením 3 tabliet na vyvolanie optickej hustoty v 30,4 ml substrátového pufra vo fóliou prikrytej 50 ml polypropylénovej kónickej skúmavke.

II. Použitím multikanálovej automatickej pipety sa pridá 100 µl činidla do každého kalíšku. Inkubuje sa pri laboratórnej teplote počas 15 minút.

III. Reakcia sa zastaví po 15 minútach pridaním 50 µl 1 mol/l roztoku kyseliny sírovej do každého kalíšku s multikanálovou automatickou pipetou.

5 H. Meranie platní

I. Platne treba zastavovať sekvenčným spôsobom, s 1 až 2 minútami medzi platňami, takže čas od stop po odčítanie je konzistentný medzi platňami (po zastavení reakcie na poslednej platni sa odčíta prvá platňa pomocou príslušného čítača platní pri 490 nm. Druhá platňa sa odčíta 1 až 2 minúty neskôr a tretia platňa 1 až 2 minúty po nej).

10 I. Určenie titra imunoglobulínu

Titer vzoriek séra je definovaný ako recipročná hodnota prvého postupného dvojnásobného zriedenia, ktoré má OD hodnotu, ktorá je väčšia než dvojnásobná hodnota pozadia alebo rovnaká ako táto hodnota. Z OD hodnôt pre kontrolné zvieratá sa určí priemer pri každom zriedení a určí sa stredný titer pre skupinu. Odkazy uvedené skôr v tomto dokumente sú včlenené ako odkaz.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Použitie najmenej jedného antigénu a glykolipidového adjuvans na prípravu sublinguálne podávateľného liečiva na vyvolanie sliznicovej a systémovej imunitnej reakcie, pričom sliznicová imunitná reakcia je IgA reakcia a systémová imunitná reakcia je sérová IgG reakcia.

2. Použitie podľa nároku 1, kde liečivo je vo forme vodného roztoku, gélu, kapsuly, pastilky alebo tablety.

25 3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, pričom najmenej jeden antigén a glykolipidové adjuvans sú prítomné v jednej kompozícii.

4. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, pričom IgA imunitná reakcia je mimo sublinguálneho miesta podávania, ako aj v mieste sublinguálneho podávania.

5. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, na liečenie bakteriálnej alebo vírusovej infekcie, rakoviny, autoimunity alebo alergie u človeka alebo zvieratá.

30 6. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, pričom glykolipidovým adjuvans je TH1 indukujúci adjuvans.

7. Použitie podľa nároku ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, pričom glykolipidovým adjuvans je 3-de-O-acylovaný monofosforyl lipid A - MPL alebo jeho derivát, alebo soľ.

35 8. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, pričom antigén je odvodený z baktérie, vírusu, príónu, neoplazmy, autoantigénu, zvieratá, rastliny, rekombinantného materiálu alebo syntetického materiálu.

9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, pričom antigén je vo forme polypeptidu.

10. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, pričom antigén je vo forme vektora zahŕňajúceho polynukleotid kódujúci antigénny polypeptid a tento polynukleotid je operatívne spojený s regulačnou sekvenciou, ktorá reguluje jeho expresiu.

40 11. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, pričom antigénom je alergén.

12. Použitie podľa nároku 11, pričom alergén je odvodený z peľu, napr. peľu ambrózie alebo peľu brezy, potraviny, hmyzieho jedu, plesne, zvieracej srsti alebo roztočov prítomných v prachu v domácnosti.

13. Sublinguálne podávateľná kompozícia obsahujúca najmenej jeden antigén a glykolipidové adjuvans na použitie na vyvolanie sliznicovej a systémovej imunitnej reakcie, pričom sliznicová imunitná reakcia je IgA reakcia a systémová imunitná reakcia je sérová IgG reakcia.

45 14. Kompozícia na použitie podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje aj sublinguálne podávateľné zriedovadlo, excipient alebo nosič.

15. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 alebo 14, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že je vo forme vodného roztoku, gélu, kapsuly, pastilky alebo tablety.

50 16. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 15, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že najmenej jeden antigén a glykolipidové adjuvans sú prítomné v jednej kompozícii.

17. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 16, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že glykolipidovým adjuvans je TH1 indukujúci adjuvans.

55 18. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 17, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že glykolipidovým adjuvans je 3-de-O-acylovaný monofosforyl lipid A - MPL alebo jeho derivát, alebo soľ.

19. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 18, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že antigén je odvodený z baktérie, vírusu, príónu, neoplazmy, autoantigénu, zvieratá, rastliny, rekombinantného materiálu alebo syntetického materiálu.

60 20. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 19, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že antigén je vo forme polypeptidu.

21. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 19, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že antigén je vo forme vektora zahŕňajúceho polynukleotid kódujúci antigénny polypeptid a tento polynukleotid je operatívne spojený s regulačnou sekvenciou, ktorá reguluje jeho expresiu.

5 22. Kompozícia na použitie podľa nároku 13 až 19, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že antigénom je alergén.

23. Kompozícia na použitie podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že alergén je odvodený z peľu, napr. peľu ambrózie alebo peľu brezy, potraviny, hmyzieho jedu, plesne, zvieracej srsti alebo roztočov prítomných v prachu v domácnosti.

10

Koniec dokumentu
