



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 167 124 B1**

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/39 (2006.01)*  
*A61P 37/04 (2006.01)*

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
 PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E006884</b>	(73) Patendiomanik:  <b>Statens Serum Institut    Orestads Boulevard 5,    2300 Copenhagen S, DK</b>
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 167 124</b>	(72) Leiutise autorid:  <b>AGGER, Else, Marie    Krudtmøllegårds Allé 9,    DK-2300 Copenhagen S, DK</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>29.06.2007    DK 200700965</b>	<b>ANDERSEN, Claire    Via Fritallo 2B, I-16031 Bogliasco, IT</b>
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>26.06.2008</b>	<b>ANDERSEN, Peter    Sparresholmvej 47, DK-2700 Brønshøj, DK</b>
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>08758248.2</b>	<b>BERSRA, Gurdyal    The University of Birmingham Edgbaston,    Birmingham B 15 2TT, GB</b>
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: <b>01.08.2012</b>	<b>MINIKIN, David    The University of Birmingham Edgbaston,    Birmingham B 15 2TT, GB</b>
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 167 124</b>	(74) Patendivolinik:  <b>Leevi Markus    Patendibüroo Käosaar &amp; Co OÜ    Tähe 94, 50107 Tartu, EE</b>
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>04.09.2012</b>	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>15.10.2012</b>	

(54) **Monomükolüüglütserooli (MMG) kasutamine adjuvandina**

## Monomükolüülgütserooli (MMG) kasutamine adjuvandina

### LEIUTISE VALDKOND

Käesolev leiutis avalikustab monomükolüülgütserooli (MMG), selle sünteetilise homoloogi, analoogi või modifitseeritud versiooni kasutamist immunomodulaatori, adjuvandi, adjuvandi ja vaktsiini või kohaletoimetamissüsteemi, mis sisaldab antud adjuvanti, valmistamisel.

### TEHNIKA TASE

Esimesed vaktsiinid sisaldasid elusaid nõrgestatud patogeene. Nõrgestatud vormid olid kas looduslikult esinevad lähedases suguluses organismid või saadi neid kultuuris mitmete passaažide tulemusena. Näiteks on inimese puhul võideldud mitmeid aastaid tuberkuloosi (TB) vastu, vaktsineerides *Mycobacterium bovis*'e nõrgestatud tüvega, *M. bovis*'e BCG vaktsiin töötati välja rohkem kui 80 aastat tagasi. Kuigi manustatud on rohkem kui 3 miljardit doosi BCG vaktsiini (rohkem kui ükskõik millist teist vaktsiini), ei anna see alati kõikides populatsioonides rahuldavat kaitset inimese TB vastu.

Hetkel on tänapäevasem lähenemisviis kasutada kõrgpuhastatud ühendeid, nt. puhastatud rekombinantseid valke või peptiide. Need vaktsiinid on täpselt defineeritud ja nende kõrvaltoimed on minimaalsed. Kahjuks ei ole paljud kõrgpuhastatud ühendid eriti immunogeensed ja ei indutseeri kaitse tagamiseks piisavat immuunvastust. Selle saavutamiseks vajab antigeen mõningast abi immuunvastust potentseerivatelt ühenditelt nimetusega adjuvandid. Sõltuvalt patogeenist võib kaitse tagamine vajada kas humoraalse või rakulise immuunvastuse domineerimist. Immuunreaktsiooni, mida on võimalik üle kanda immuunseerumiga, tuntakse humoraalse immuunsuse all ja see viitab resistentsusele, mida vahendavad infektsioosse osakesega seostatud antigeense materjaliga seostuvad antikehad, mis seeläbi vallandavad antud osakese vastu immuunvastuse. Rakuline immuunsus (*Cell Mediated Immunity* - CMI) sõltub immuunvastuse taga olevatest immuunsüsteemi rakkudest. CM1 või T-helper 1 (Th1) immuunvastust seostatakse tavaliselt reaktsiooniga rakusiseste patogeenide, sealhulgas leišmaania ja tuberkuloosi, vastu, kuid sellel on samuti

roll teiste infektsioonitüüpide vastu võitlemisega, nt. pärmseene *Candida* infektsioon. Humoraalne või Th2 immuunvastus on vajalik rakuväliste patogeenide, nt. helmintide infektsiooni, vastu võitlemiseks.

5 Mitmetel juhtudel, nt. gripi, C-hepatiidi (HCV), inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV), klamüüdia ja malaaria puhul, võib sõltuvalt infektsiooni staadiumist olla vajalik sega Th1/Th2 vastus (Mosmann ja Sad 1996). Need vajavad nii Th1 kui Th2, kuna osa nende infektsioonitekitajate elutsüklis toimub raku sees, kuid neil esineb ka rakuväliseid faase, nt. ülekanne rakkude vahel.

10 Spetsiifilist tüüpi (humoraalse või rakulise) immuunvastuse arengut on võimalik määrata adjuvandi valimisel. Näiteks vajab immuunkaitse rakusiseste patogeenide, nagu näiteks *M. tuberculosis*'e, vastu rakulist immuunvastust ning sobiv adjuvant TB vastu suunatud alamühiku vaktsiinis peaks suurendama Th1 vastust (Lindblad jt. 1997).

15 Esineb palju adjuvante, kuid enamikul nendest esineb mitmeid probleeme, mis eelnevad nende kasutamisele inimesel. Ainult mõned adjuvandid sobivad inimese peal kasutamiseks, nt. alumiiniumil põhinevad adjuvandid (AIOH soolad) ja MF-59, kuid mõlemad indutseerivad Th2 poole suunatud vastuseid, mis teevad nad ebasobivaks TB vaktsiini ja teiste Th1 vastust nõudvate vaktsiinide jaoks (Lindblad jt. 1997).

20 Viimase 20-30 aasta jooksul on kindlaks tehtud mitmeid uusi adjuvantsüsteeme ja hetkel on mõned neist arendamisprotsessis. Hoolimata sellest vajatakse siiski uusi adjuvantsüsteeme (Moingeon jt. 2001), mida tõestab kliiniliseks kasutamiseks sobivate valikute vähesus.

25 Adjuvanti (ladina keelest *adjuvare* – aitama) võib defineerida kui ükskõik millist ühendit, mis manustamisel vaktsiinis toimib spetsiifilise immuunvastuse suunaja, kiirendaja, pikendaja ja/või parandajana. Adjuvante on jaotatud kahte põhilisse kategooriasse: kas kohaletoiimetamissüsteemid või immunomodulaatorid/immunostimulaatorid. Kohaletoiimetamissüsteemid võivad olla nt. emulsioonid, polüstüreeni osakesed, niosoomid, ISCOM-id, virosoomid, 30 mikrosfäärid või surfaktandi-laadsed liposoomid, mis on lipiidsetest kaksikkihtidest

koosnevad vesiiklid. Liposoomid toimivad kui antigeeni kandjad (kas vesiiklite sees või kinnitatuna nende pinnale) ja võivad moodustada vaktsineerimiskohas depoo, mis võimaldab antigeeni aeglast, pidevat vabanemist. Mõni aeg pärast süsti ja fagotsütoosi kindlustab liposomaalne süsteem, et spetsiifiline kogus antigeeni on

5 ligipääsetav antigeeni esitlevatele rakkudele (Gluck 1995). Immunomodulaatorite sihtmärgiks on teatud rakud või retseptorit, nt. Tolli-sarnased retseptorid antigeeni esitlevate rakkude (APC) pinnal. Kohaletoimetamissüsteeme ja immunomodulaatoreid võib kasutada koos, nt. nagu Glaxo adjuvantide seeria puhul. Seetõttu saab kohaletoimetamissüsteemi lisaks vaktsiini antigeeni

10 kohaletoimetamisele kasutada immunomodulaatorite kohaletoimetamiseks.

Lisaks vaktsiini komponendiks olemisele võib immunomodulaatoreid manustada ilma antigeeni(de)ta. Antud lähenemise kaudu on immuunvastust võimalik aktiveerida lokaalselt, nt. nagu antigeeni esitlevate rakkude küpsemisel tsütokiinide tootmine, mis on tähtis kasvajakasvatase ja viirusevastase aktiivsuse

15 jaoks. Seetõttu võib immunomodulaatorite manustamine nt. toetada kasvaja ja nahanaiguste elimineerimist. Immunomodulaatorite, mida on võimalik manustada lokaalselt, näideteks on taksaanid, nt. Taxol, Tolli-sarnase retseptori 7/8 ligand Resiquimod, Imiquimod, Gardiquimod.

Dimetüüldioktadetsüülammooniumbromiid, -kloriid, -fosfaat, -atsetaat või teised

20 orgaanilised või anorgaanilised soolad (DDA) on lipofiilne kvaternaarne lämmastikühend, mis moodustab vesilahustes temperatuuridel üle 40°C katioonseid liposoomi. DDA on väga tõhus kohaletoimetamissüsteem, mis suurendab vaktsiini antigeeni omastamist APC-desse. Kirjeldatud on DDA ja immunomoduleerivate ainete kombinatsioone. DDA sisaldava Arquad 2HT

25 manustamine inimestele oli paljulubav ja ei indutseerinud silmnähtavaid kõrvaltoimeid (Stanfield, 1973). DDA ja TDB või DDA ja MPL kombinatsiooni puhul oli näha väga selget sünergia kohaletoimetamissüsteemi (DDA) ja immunomodulaatori (TDB või MPL) vahel, mis väljendus oluliselt suurenenud CMI vastuse tasemetena võrreldes vastustega, mis saadi üksikuid komponente

30 kasutades. Seetõttu on DDA vaktsiini antigeeni ja immunomodulaatori paljulubav kohaletoimetamissüsteem nt. TB ja teiste rakusiseste patogeenide vastase vaktsiini adjuvantsüsteemi väljaarendamisel.

On teatatud, et mitmed mükobakterite komponendid on immunomoduleeriva toimega. Kui *M. bovis* BCG-st eraldatud lipiide kasutati adjuvandina, saadi merisigadel naha testvastus ovalbumiinile (Hiu 1975). Kõrgenenud temperatuuride juures *M. bovis* BCG täielikult polaarsetest lipiididest moodustunud liposoomid on

5 võimelised genereerima ovalbumiini vastu humoraalse immuunvastuse ning antud polaarsetest lipiididest valmistatud vaktsiin andis hiirtele kaitse kasvajakude vastu (WO 03/011336). Dascher jt. (2003) uurisid *M. tuberculosis* H37Rv-st pärinevate lipiidide koguefeki antigeenina eksperimentaalses TB vaktsiinis merisigadel. Antud uuringus segati kolesteroolil ja 1,2-distearoüül-sn-glütsero-3-

10 fosfokoliinil (DSPC) põhinevad liposoomid *M. tuberculosis* H37Rv lipiidi koguekstraktiga. Pärast lahusti eemaldamist taastati lipiidid dimetüüldioktadetsüülammooniumiga (DDA) kui PBS puhvri adjuvandina. Antud vaktsiiniga immuniseeritud merisead ei väljendanud bakterite arvu olulist langust, mis viitas sellele, et antud DDA-ga segatud liposoomide formulatsioonil puudub

15 tugev antigeen või mükobakteriaalsete lipiidide formulatsioon kolesterool-DSPC-ga ennetab DDA adjuvantefekti. Kui manustatakse erinevate lipiidide segu, võivad efektiivsed lipiidid moodustada ka liiga väikese osa kogu lipiidide hulgast.

Samuti on uuritud mükobakteritest pärinevate erinevate puhastatud komponentide adjuvantset aktiivsust. Puhastatud proteiiniderivaat (PPD) üksi ei indutseeritud

20 hilinenud tüüpi ülitundlikkusreaktsiooni, kuid kui adjuvandina lisati Wax D (mükobakteriaalse rakuseina peptidoglükaani fragment-arabinogalaktaan-mükoolhappe kompleks), täheldati tugevat reaktsiooni (Yamazaki S., 1969). Immunomodulaatoril SSM või Z-100, *M. tuberculosis*'elt eraldatud lipiididel arabinomannaanil, on kasvavastane aktiivsus (Suzuki F., 1986). Teine

25 mükobakteriaalsest rakust tuledatud ühend on rehaloos 6,6'-dimükolaat (TDM) (*cord factor*; glükolipiidi sisaldav mükoolhappe) (Saito jt., 1976). Lisaks on TDM-il (või selle sünteetilistel analoogidel) immunostimulaatorsed efektid ja seda on kasutatud mitmetes adjuvandi formulatsioonides (McBride jt., 1998) (Koike jt., 1998).

30 Silva jt. (1985) publikatsioonis süstiti viie komponendiga puhastatud fra *Mycobacterium bovis* BCG intravenoosselt lipiidkattega söeosakestena ja see põhjustas hiire kopsudes põletikulist reaktsiooni. Viie komponendi hulka kuulus

TDM, trehaloosmonomükolaat (MMT), glükoosmonomükolaat (MMGlc), arabinoosmonomükolaat (MMAr) ja glütseroolmonomükolaat (MMGlyc). Publikatsioonis kirjeldatakse monomükolüülglütserool pearühma, samas kui mükoolhapete kompositsioon on kehvalt defineeritud ja ei ole antud struktuurseid andmeid. Lisaks on lipiidide manustamisel tekkivat reaktsiooni kirjeldatud ainult kui kopsudes aset leidvat põletikulist aktiivsust, samas kui adjuvantefektina tuntud spetsiifilist immuunvastust suurendavat võimet ei ole kirjeldatud.

Leech jt. (1985) kirjeldas L-ala-glütseroolmükolaadi adjuvandina kasutamist, et valmistada loom ette hapteni toimeks. Leiti, et L-ala-glütseroolmükolaat oli kasulik adjuvandi puudumisel kitsas doosivahemikus.

Kuigi mükobakteriaalset päritolu lipiidide immunostimulatoorset ja põletikulist toimet on teatud mitu aastakümnet ning looma (hiire) mudelitel immuunvastuse stimuleerimise võimeliste lipiidide kohta avaldatakse järjest uut kirjandust, ei ole siiani tuvastatud individuaalset lipiidi (individuaalseid lipiide), mis oleks võimelised stimuleerima inimese dendriittrakte (DC). Näiteks kuigi TDM on proinflammatoorsete vastuste seisukohalt kõige aktiivsem mükobakteriaalne lipiid, ei ole stimuleerimisel TDM-iga täheldatud dendriittrakkude aktiveerumist (Uehori jt., 2003). Niisiis kuigi TDM on väljendandu põletikulist aktiivsust mitmetes publikatsioonides, ei suuda antud lipiid ilmselt piisavalt aktiveerida immuunvastuse algatamiseks hädavajalikke dendriittrakte. Sellise inimese dendriittrakkude aktiveerimise võimega lipiidi tuvastamine võimaldaks selle kasutamist uues adjuvandi süsteemis, mis oleks sobilik inimestel kasutamiseks. Lisaks on inimesel kasutamiseks sobilike Th1 indutseerivate adjuvantide puudumise tõttu üheainsa mükobakteriaalset päritolu Th1 soodustava võimega lipiidi avastamine märkimisväärne leid.

Dendriittrakud (DC-d) on professionaalsed antigeeni esitlevad rakud (APC), mis mängivad patogeenide, nagu näiteks *M. tuberculosis*'e, poolt esile kutsutud infektsiooni korral tekkiva immuunvastuse suunamisel olulist rolli. Seetõttu väljendab aktiveeritud DC poolt IL-12 tootmine *M. tuberculosis*'e infektsiooni kontrollimisel olulist etappi, kuna antud tsütokiinil on suur tähtsus Th1 rakkudes IFN- $\gamma$  tootmise käivitamisel, mis omakorda soodustab makrofaagide aktivatsiooni (Nathan jt., 1983). Lisaks on viimastel aastatel leitud tõendeid, et mükobakterite

sihtmärgiks on immuunvastuse moduleerimise eesmärgiga ka DC-d, ning tuvastatud on mükobakteriaalsete lipiidide ülioluline roll antud protsessis.

Lipiidid moodustavad kuni 40% mükobakterite rakuümbrise kuivkaalust (Minnikin, 1982). Antud lipiide on kaua aega seostatud antud organismide perekonna iseloomuliku patogeensusega ja on kindlaks tehtud nende oluline roll peremeesraku vastuses mükobakteriaalsele infektsioonile )Brennan ja Goren, 1979). Nende lipiidide hulgas tõusevad esile ftiotserooldimükotserosaat (PDIM) vahad (Minnikin jt., 2002), mille puhul on näidatud, et nende olemasolu on korrelatsioonis nende patogeensusega; PDIM-defitsiitsetel *M. tuberculosis*'e mutantidel on hiirtes vähenenud kasv (Sirakova jt., 2003). PDIM-idega lähedalt suguluses on nn „fenoolsed glükolipiidid“ (PGL-id), mille hea näide on *Mycobacterium bovis*'es leiduv 2-metüülramnosüülfenoolftiotsetüüldimükotserosaadid („mükosiid B“). Hiljuti on näidatud seost antud monoglükosüül PGL ja *M. tuberculosis*'e teatud isolaatide hüpervirulentsuse vahel (Reed jt., 2004).

Veel üks huvipakkuv lipiidide klass on trehaloos-6,6-dimükolaadid (TDM), niinimetatud „cord factor“. TDM soodustab granulomatoosete kollete säilimist, stimuleerides proinflammatoorsete tsütokiinide, nagu näiteks TNF- $\alpha$ , IL-6 ja IL-12, ja Th1 soodustava tsütokiini IFN- $\gamma$  vabanemist (Lima jt., 2001) ning sellel on roll *M. tuberculosis*'e ellujäämise soodustamises makrofaagides, pärssides fagosoomlüsosoomi liitumist (Indigo jt., 2002). TDM-i mükolaatkomponentide peen struktuur on tähtis varases infektsioonifaasis makrofaagide proinflammatoorse aktivatsiooni puhul (Rao jt., 2005).

Hoolimata oma rollist mükobakterite ellujäämise soodustamisel, võib mükobakteriaalsete lipiidide immunomoduleerivaid võimeid rakendada ka Th1 indutseerivate adjuvantide uue põlvkonna loomisel. Potentsiaalse immunostimulatoorse aktiivsusega individuaalsete lipiidide tuvastamisel võib olla võimalik vältida toksisilisusega seotud probleeme, mida seostatakse *M.tuberculosis*'e kuumusega surmatud täisrakkude ja õli segu – Freund'i täieliku adjuvandi (FCA) – kasutamisega samas säilitades potentsiaalset adjuvantset aktiivsust. Tõepoolest, *M. bovis Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) polaarsetest lipiididest moodustunud liposoomide puhul on hiljuti demonstreeritud nende võimet

aktiveerida hiirelise luuüdist tuletatud dendriitrakkusid (BM-DC). Enamik antud aktiivsusest omistati lipiidsele glükofosfolipiid fosfatidüülinoosiitoolimannosiidile (Sprott jt., 2004).

- 5 Meie laboratooriumites huljuti läbi viidud uuringud on iseloomustanud *M. bovis* BCG-st eraldatud mükobakteriaalse lipiidi ja dimetüüldioktadetsüülammooniumbromiidi (DDA) uut adjuvantset kombinatsiooni, mis on võimeline andma nii tugeva humoraalse kui rakulise komponendiga kompleksi ja püsiva immuunvastuse (Rosenkrands jt., 2005). Enamik üldisest BCG lipiidide adjuvantsest aktiivsusest omistati mittepolaarsetele lipiididele.
- 10 Samas kui antud uuringud kinnitavad veelgi mükobakteriaalsete lipiidide potentsiaalsust toimida adjuvantidena, oleks optimaalne lahendus tuvastada üksainus kõige suurema immunostimulatoorse võimega lipiid, mis üksinda esinedes omaks potentset aktiivsust. See annaks veel lihtsama ja odavama adjuvandi ning annaks võimaluse valmistada lipiidi sünteetilisi analooge, mis
- 15 võimaldaks üle maailma manustatavates vaktsiinides kasutamiseks vajaliku adjuvandi suuremate koguste tootmiseks puhtamat süsteemi.

#### LEIUTISE KOKKUVÕTE

- Käesoleva leiutise ulatus on defineeritud patendinõudlustes ja ükskõik milline informatsioon, mis ei esine patendinõudlustes, on esile toodud ainult
- 20 informatsiooni korras.

- Käesolev leiutis avalikustab immunostimulatoorse lipiidi, monomükolüülglütserooli (MMG) ja selle sünteetilised homologid, analoogid ja modifitseeritud versioonid, mis on võimelised aktiveerima inimese DC-sid. MMG on tuletatud üldisest BCG lipiidide mittepolaarsest fraktsioonist ja see vastutab adjuvandi indutseerimise ja
- 25 antud lipiididega seostatud kaitsva efekti eest. Väiksema süsinikkarkassiga sünteetiline MMG on võimeline suurendama loodusliku MMG-i stimuleerivaid omadusi inimese dendriitrakkudel *in vitro* ning samuti indutseerib see tugeva Th1 vastuse *in vivo*, mis viib hiire mudelil pikaajalise kaitsva TB vastu suunatud immuunvastuse tekkeni.



## LEIUTISE ÜKSIKAJALIK KIRJELDUS

- Käesoleva leiutise ulatus on defineeritud patendinõudlustes ja ükskõik milline informatsioon, mis ei esine patendinõudlustes, on esile toodud ainult informatsiooni korras. Käesolev leiutis avalikustab monomükolüüglütserooli (MMG) või selle sünteetiliste homologide, analoogide ja modifitseeritud versioonide patendinõudlustes defineeritud kasutamise immunomodulaatori, adjuvandi ja vaktsiini või antud adjuvandi, millel on ainulaadne omadus stimuleerida inimese dendriittrakke, sisaldava kohaletimetamissüsteemi valmistamiseks.
- 5
- 10 Patendinõudlustes defineeritud MMG või selle sünteetilisi homologe, analooge ja modifitseeritud versioone manustatakse immunomodulaatoritena ilma antigeeni(de)ta. Antud lähenemise kaudu on võimalik aktiveerida immuunsüsteem lokaalselt, nt. nagu antigeeni esitlevate rakkude küpsemisel tsütokiinide tootmine, mis on tähtis kasvajakasvustase ja viirusevastase aktiivsuse jaoks.
- 15 Adjuvanti (ladina keelest *adjuvare* – aitama) võib defineerida kui ükskõik millist ühendit, mis manustamisel vaktsiinis toimib spetsiifilise immuunvastuse suunaja, kiirendaja, pikendaja ja/või parandajana. Sõltuvalt adjuvandi olemusest võib see soodustada rakulist immuunvastust, humoraalset immuunvastust või nende kahe segu. Vaktsiini adjuvandina kasutamisel lisatakse adjuvandile antigeenne
- 20 komponent. Kuna adjuvantide poolt vahendatud immuunvastuse suurendamine on mittespetsiifiline, on arusaadav, et sama adjuvandi saab kasutada erinevate antigenidega, soodustamaks vastuseid erinevate sihtmärkide vastu, nt. *M. tuberculosis*'est pärinev antigen *M. tuberculosis*'e-vastase immuunsuse parandamiseks või kasvajakasvustase saadud antigen konkreetse kasvaja vastase
- 25 immuunsuse parandamiseks.
- Käesoleva leiutise poolt avalikustatud eelistatud adjuvant on patendinõudlustes defineeritud MMG või selle sünteetilist homoloogi, analoogi või modifitseeritud versiooni sisaldav adjuvant, mis sisaldaks veel kohaletimetamiskeskkonda, nt. emulsioone, polüstüreeni osakesi, niosoome, ISCOM-e, virosoome, mikrosfääre
- 30 või surfaktandi-sarnaseid liposoomi. Eelistatud surfaktandid on kõige eelistataval

juhul dimetüüldioktadetsüülammooniumbromiidil või –kloriidil põhinevad katioonsed lipiidid (DDA-B või DDA-C) või nende sulfaat-, fosfaat- või atsetaatsool (DDA-X) või dimetüüldioktadetsenüülammooniumbromiid või –kloriid (DODA-B või DODA-C) või nende sulfaat-, fosfaat- või atsetaatühend (DODA-X). Teiste

5 käesolevas leiutises kasutatavate eelistatud katioonsete lipiidide hulka kuuluvad muuhulgas 1,2-dioleoüül-3-trimetüülammooniumpropaan (DOTAP), 1,2-dimüristoüül-3-trimetüülammooniumpropaan, 1,2-dipalmitoüül-3-trimetüülammooniumpropaan, 1,2-distearoüül-3-trimetüülammooniumpropaan (DODAP) ja N-[1-(2,3-dioleüülloksü)propüül]-N,N,N-trimetüülammoonium (DOTMA). Teised

10 surfaktandid valitakse DXPC, DXPE, DXPG või nende kombinatsioonide hulgast, kus X on ahelapikkuse kirjelduse asendus, nt. P=palmitoüül (16C), S=stearoüül (18C), A=arahhidoüül (20C).

Kohalettoimetamiskeskonda võib samuti kasutada teiste immunomodulaatorite puhul, nagu näiteks TLR ja mitte-TLR ligandid, nt. MPL (monofosforüüllipiid A),

15 polüinosiinpolütsütidüülhape (polü-IC), muramüüldipeptiid (MDP), sümosaan, kaheahelaline RNA (dsRNA), DC-Chol, CpG oligodeoksünukleotiidid, katioonsed peptiidid, TDM, TDB, tamoksifeen või ükskõik milliste nende molekulide ükskõik millised analoogid. Seetõttu sisaldab eelistatud adjuvant patendinõudlustes defineeritud MMG või selle homoloogi, analoogi või modifitseeritud versiooni ja

20 lisaks sisaldab see kohalettoimetamiskeskonnas TLR või mitte-TLR ligandeid.

Patendinõudlustes defineeritud MMG või selle sünteetilisi homolooge, analooge või modifitseeritud versioone sisaldavaid kohalettoimetamissüsteeme võib kasutada kasvaja, autoimmuunse haiguse, närvihaiguse, nt. Alzheimeri tõve, hingamisteede põletiku, põletikuliste haiguste, nakkushaiguste, nahahaiguste,

25 allergia, astma või patogeeni poolt põhjustatud haiguse ravimisel. Patendinõudlustes defineeritud MMG või selle sünteetilisi homolooge, analooge või modifitseeritud variante manustatakse kombinatsioonis ühe või enama vaktsiini, antigeeni, antikeha, tsütotoksilise ühendi, allergeeni, antibiootikumi, antisenss-oligonukleotiidi, TLR ja mitte-TLR agonisti, TLR ja mitte-TLR antagonisti,

30 peptiidi, valgu, geeniteraapia vektori, DNA-vaktsiini või kostimulaatorse molekuliga.

- Antigeenne komponent või ühend on molekul, mis reageerib eelnevalt moodustunud antikeha ja/või T- ja B-rakkudel olevate spetsiifiliste retseptoritega. Vaktsineerimise kontekstis on see molekul, mis suudab stimuleerida spetsiifiliste T- või B-rakkude arengut, viies immuunrakkude mälupopulatsiooni moodustumiseni, mis soodustab antigeeni teistkordisel kokkupuutel immuunrakkudega kiiremat „mälu“ vastust. Kuna mälupopulatsioonid on harva klonaalsed, tähendab see praktikas seda, et antigeen on ükskõik milline molekul või molekulide kogum, mis suudab stimuleerida immuunvastuste tõusu, kui see kohtub uuesti eelnevalt antigeenile eksponeeritud indiviidi immuunrakkudega.
- 5
- 10 Käesolev leiutis avalikustab ka parenteraalseks, oraalseks või mukoosseks manustamiseks mõeldud vaktsiini või adjuvandi sisaldava kohaletoitamissüsteemi. Eelistatud vaktsiin sisaldab antigeenset epitoopi, mis pärineb rakusiseselt patogeenilt, nagu näiteks virulentne mükobakter (nt. liitproduktid Ag85b\_TB10.4, Ag85b\_ESAT-6\_Rv2660, Ag85b\_TB\_10.4\_Rv2660 ja
- 15 Ag85a\_TB10.4\_Rv2660), *Plasmodium falciparum* (Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 või CSP), *Chlamydia trachomatis* (nt. CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 või C681), HIV, gripp või B- või C-hepatiit. Adjuvanti või kohaletoitamissüsteemi võib samuti kasutada kasvaja, allergia või autoimmuunsete haiguste raviks kasutatavates vaktsiinides.
- 20 Mükobakteriaalse lipiidi koguekstrakt on mükobakteritest, nt. BCG, *M. microti*, *M. tuberculosis* ja *M. vaccae*'st, keemilise või füüsikalise protsessi teel saadud lipiidide segu. Käesoleva töö puhul on eraldamiseks kasutatud meetod orgaaniliste lahustite põhine (kirjeldatud allpool), kuid võimalik on kasutada ka teisi antud valdkonnas tuntud meetodeid.
- 25 Mittepolaarne lipiidi fraktsioon on defineeritud kui mittepolaarsed lipiidid. Mittepolaarne lipiidi fraktsioon saadakse mükobakterite töötlemisel metanooli/füsioloogilise lahuse ja petrooleumeetri bifaasilise seguga. Petrooleumeetri ekstrakt koosneb mittepolaarsetest lipiididest. Edaspidi saadakse polaarne lipiidi fraktsioon mükobakteritele kloroformi lisamise ja ülejäägi vesifaasi
- 30 teel. Kloroformi ekstrakt sisaldab ülejäävaid polaarset lipiide. Mittepolaarse lipiidi fraktsiooni peamised komponendid on ftiotseroolimükotserosaadid, triatsüülglütseroolid, trehaloosmükolipenaadid ja menakinoonid. Polaarse lipiidi

fraktsiooni peamised komponendid on fosfolipiidid, nagu näiteks fosfatidüületanolamiin, foafatidüülgütserool ja fosfatidüülinositool. Keskmise polaarsusega lipiidid on sulfolipiidid, trehaloosmükolaadid, glükosüülitud fenoolftiotsetoolid (sealhulgas fenoolsed glükolipiidid, PGL-id) ja atsüülitud trehaloosid (Dobson jt., 1985).

MMG viitab mittepolaarsest lipiidi fraktsioonist saadud lipiidsele monomükolüülgütseroolile ja selle derivaatidele, nt. alfa-MMG ja keto-MMG, ning looduslikele ja sünteetilistele analoogidele. MMG on võimalik isoleerida toluenis/atsetoonis (95:5) voolutatud TLC-des. PGL ja MMG eraldatakse antud meetodi abil koos, kuid neid on võimalik eraldada 1-D-TLC-s kloroform:metanool:0,880 ammoniaagis (97:3:0,5). MMG, alfa-MMG ja keto-MMG derivaate on võimalik saada üleöö kuumutamisel 100°C juures 5% TBAH vesilahusega (2,5 ml) 16 x 100 mm tuubis (Minnikin, 1988).

MMG sünteetilist homoloogi, analoogi või modifitseeritud versiooni on võimalik toota ükskõik millise keemilise sünteesi tavapärasel meetodil. Analoo viitab ühele ühendite rühmale, mis on struktuurilt sarnased, kuid algkoostise poolest erinevad, ning homoloog viitab ühendite homoloogse seeria ükskõik millisele liikmele. Antud ühenditel võib olla erinev süsinikahela pikkus; konkreetselt on vähenenud suurus seostatud vähenenud toksilisusega ja võib seetõttu vähendada analoogide väljenduvat toksilisust. Seega võivad sünteetilised versioonid põhineda alküülahelatel, millel on nt. 8-36 süsinikku ja igal lipiidi sabal 0-3 kaksiksidet. Alternatiivselt on võimalik saada lihtsustatud vorm, eemaldades ühe lipiidi sabadest. Sünteetilise MMG süsinikkarkassi suurus on eelitatult C8-C36, nt. 3-hüdroksü-2-etüülheksaanhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C8), 3-hüdroksü-2-butüül-oktaanhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C12), 3-hüdroksü-2-heksüül-dekaanhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C16), 3-hüdroksü-2-heptüül-undekaanhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C18), 3-hüdroksü-2-tetradetsüül-oktadekaanhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C32) või 3-hüdroksü-2-heksadetsüüleikoseenhape-2,3-dihüdroksüpropüülester (C36), ja kõige eelistataval juhul C8 või C16. Modifitseeritud versioone on võimalik valmistada, asendades glütseroolosa teise polüool-pearühmaga, nt. polüpropüüleenglükooli ja polüetüleenglütsetooliga. Sünteetilise monomükolaadi ja samuti glütserooli C2 ja

C3 ümbruse stereokeemiat on võimalik varieerida. Järgnevalt tähendab ainult MMG tähis ka ülalpool kirjeldatud MMG sünteetilist homoloogi, analoogi või modifitseeritud versiooni.

Antigeenne komponent või ühend võib olla polüpeptiid või polüpeptiidi osa, mis kutsub esile loomas või inimeses ja/või bioloogilises näidises immuunvastuse, mida on võimalik kindlaks määrata siin kirjeldatud ükskõik millise analüüsi abil. Polüpeptiidi immunogeenne osa või olla T-raku epitoop või B-raku epitoop. Et tuvastada asjassepuutuvad T-raku epitoobid, mis tuntakse ära immuunvastuse ajal, on võimalik kasutada „toore jõu“ („*brute force*“) meetodit: kuna T-raku epitoobid on lineaarsed, paljastavad süsteemse konstrueerimise korral polüpeptiidi deletsiooni mutandid, millised polüpeptiidi piirkonnad on vajalikud immuunseks äratundmiseks, nt. viies antud deletsiooni mutantide peal läbi nt. siin kirjeldatud IFN-gamma analüüsi. Teine meetod kasutab polüpeptiidist tuletatud kattuvaid oligopeptiide (eelistatult sünteetilisi, mille pikkus on nt. 20 aminohappe jääki). Antud peptiide on võimalik testida bioloogilistes analüüsides (nt. siin kirjeldatud IFN-gamma analüüs) ja mõned neist testidest annavad positiivse vastuse (ja on seetõttu immunogeensed) kui tunnuse T-raku epitoobi esinemisest peptiidis. Lineaarseid B-raku epitoope on võimalik kindlaks määrata, analüüsides B-raku äratundmist huvipakkuvat polüpeptiidi katvate kattuvate peptiididega, nagu on kirjeldatud nt. Harboe jt., 1998 publikatsioonis.

Kuigi T-raku epitoobi minimaalseks pikkuseks on näidatud vähemalt 6 aminohapet, on tavaline, et antud epitoobid koosnevad aminohapete pikematest tükkidest. Seetõttu eelistatakse, et käesoleva leiutise alla kuuluva polüpeptiidi fragmendi pikkus on vähemalt 7 aminohappe jääki, nagu näiteks vähemalt 8, vähemalt 9, vähemalt 10, vähemalt 12, vähemalt 14, vähemalt 16, vähemalt 18, vähemalt 20, vähemalt 22, vähemalt 24 ja vähemalt 30 aminohappe jääki. Seetõttu eelistatakse käesoleva leiutise alla kuuluvate tähtsate teostuste puhul, et polüpeptiidi fragmendi pikkuseks on kõige enam 50 aminohappe jääki, nagu näiteks kõige enam 40, 35, 30, 25 ja 20 aminohappe jääki. Eeldatakse, et 10 ja 20 aminohappe jäägi pikkusvahemikku jäävad peptiidid osutuvad diagnostiliste vahenditena kõige efektiivsemaks ja seetõttu on leiutise meetodis kasutatava

polüpeptiidi eriti eelistatud pikkuseks 18, nagu näiteks 15, 14, 13, 12 ja isegi 11 aminohapet.

Konkreetselt võib antigeenne ühend olla tuletatud *Mycobacterium tuberculosis*'t, *Mycobacterium bovis*'t ja teisi keskkonnast pärinevaid mükobaktereid, nagu

5 näiteks *Mycobacterium avium*'it, metaboliseerivast kultuurist. Konkreetselt on antud mükobakterite filtraadist pärinevad huvipakkuvad ühendid ESAT-6 geeniperekonna valgud (nagu näiteks ESAT6 ja TB10.4), samuti teised varajased antigeenid, nagu näiteks Ag85A, Ag85B, ORF2c, Rv1036 ja Rv0285, mis on TB patsientide ja erinevate loomamudelite puhul tuberkuloosi varajases faasis

10 rakulise immuunsuse domineerivad sihtmärgid. Tähtsad on ka teised antigeenid, nagu näiteks Rv2653, Rv2655, Rv2656, Rv2657, Rv2658, Rv2659, Rv2660, mis on domineerivad sihtmärgid TB infektsiooni hilisemate staadiumite ajal. Eraldi võetuna on nende immunogeensus madal, kuid kombinatsioonis käesoleva leiutise alla kuuluva adjuvandiga on need osutunud potentsiaalseteks

15 kandidaatideks kõrge ja püsiva tuberkuloosivastase immuunsuse tekitamises, nagu demonstreeritakse käesoleva kirjelduse järgnevas üksikasjalikus osas.

Tänapäeval on võimalik kunstlikult toota ESAT-6 geeniperekonna valke, samuti mitmeid teisi antigeene, mida on sobiv kasutada kombinatsioonis käesoleva leiutise alla kuuluvate adjuvandi kombinatsioonidega, nt. sünteetiliselt või

20 geneetiliste rekombinantsete meetodite kaudu.

Liitvalgud on osutunud vaktsiinides eriti hästi sobivateks antigeenseteks ühenditeks, nt. liitproduktid Ag85b\_TB\_10.4, Ag85b\_ESAT-6\_Rv2660, Ag85b\_TB\_10.4\_Rv2660 ja Ag85a\_TB10.4\_Rv2660 on ostunud TB vastu väga tõhusaks.

25 Vaktsiin on defineeritud kui surnud, nõrgestatud või teisiti modifitseeritud mikroorganismide (bakterite, viiruste või riketsiate) või nende osade suspensioon vaktsineerimiseks eesmärgiga tekitada haiguse vastu immuunsus. Vaktsiini võib manustada kas profülaktiliselt haiguse ennetamiseks või terapeutiliselt, et võidelda juba esinevate haiguste, nagu näiteks kasvaja või latentsete nakkushaiguste, kuid

30 samuti seoses allergia või autoimmuunsete haigustega. Vaktsiini on võimalik emulgeerida sobivas adjuvandis, et potentseerida immuunvastust.

Vaktsiini manustatakse annuse formulatsiooniga sobival viisil ja sellises koguses, mis on terapeutiliselt efektiivne ja immunogeenne. Manustatav kogus sõltub ravitavast subjektist, sealhulgas nt. indiviidi immuunsüsteemi võimest tekitada immuunvastus ja soovitud kaitse astmest. Sobivad annuse vahemikud on

5 ligikaudu paarsada mikrogrammi aktiivset koostisosa vaktsineerimise kohta, eelistatud vahemik on alates ligikaudu 0,1 µg kuni 1000 µg, nagu näiteks vahemik alates ligikaudu 1 µg kuni 300 µg ja eriti vahemik alates ligikaudu 1 µg kuni 50 µg. Algseks manustamiseks ja lisaannuseks sobivaid režiime on samuti võimalik varieerida, kuid neid tüpiseeritakse algse manustamise järgi, millele järgnevad

10 järgmised vaktsineerimised või teised manustamised.

Manustamise viisi võib laialdaselt varieerida. Sobilikud on ükskõik millised tavapärased vaktsiini manustamised meetodid. Nende hulka arvatakse suukaudne või mukoosne manustamine tahkel füsioloogiliselt sobival alusel või füsioloogiliselt sobivas dispersioonis, parenteraalne, süsti teel manustamine jms. Vaktsiini annus

15 sõltub manustamise viisist ja varieerub sõltuvalt vaktsineeritava isiku vanusest ja vähemal määral vaktsineeritava inimese suuruselt.

Tavapäraselt manustatakse vaktsiine parenteraalselt, näiteks süsti teel kas subkutaanselt või intramuskulaarselt. Teiste manustamise viisideks sobilike täiendavate formulatsioonide alla kuuluvad suposiidid ja mõnedel juhtudel

20 suukaudsed või mukoossed formulatsioonid. Suposiitide puhul võivad traditsiooniliste sidujate ja kandjate hulka kuuluda näiteks polüalkaleenglükoolid või triglütseriidid; antud suposiite võib valmistada aktiivset koostisosa vahemikus 0,5% kuni 10%, eelistatult 1-2% sisaldavatest segudest. Suukaudsete formulatsioonide hulka kuuluvad sellised tavapäraselt kasutatavad abiained, nagu

25 näiteks mannitooli, laktoosi, tärklise, magneesiumstearaadi, naatriumsahhariini, tselluloosi, magneesiumkarbonaadi ja teiste sarnaste ühendite farmatseutilised tasemed. Antud kompositsioonid esinevad lahuste, suspensioonide, tablettide, pillide, kapslite, pikenenud vabanemisajaga formulatsioonide või pulbrite vormis ja sisaldavad soodsal juhul 10-95% aktiivset koostisosa, eelistatult 25-70%.

30 Valikvaktsiin võib näiteks olla:

Valkvaktsiin: polüpeptiidi (või selle vähemalt ühte immunogeenset osa), peptiidi segu või liitpolüpeptiidi sisaldav vaktsiini kompositsioon.

Elusad rekombinantsed vaktsiinid: Vastava antigeeni ekspresseerimine vaktsiinid mittepatogeenses mikroorganismis või viiruses. Antud mikroorganismide hästi  
5 tuntud näited on *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* ja *Pseudomonas* ning viiruste näidete alla kuuluvad *Vaccinia* viirus ja adenoviirus.

Kõikide nende vaktsiini konstruktsioonide puhul on sobiva adjuvandi lisamise tulemusena suurenenud vaktsiini tõhusus (Brandt jt., 200), (van Rooij jt., 2002), (Bennekov jt., 2006).

10 Liposoomid (või lipiidised vesiiklid) on lipiidse kaksikkihi sisse suletud vesikeskkonnaga kompartmentid. Lipiidised komponendid on tavaliselt fosfolipiidid või teised amfiifilid, nagu näiteks surfaktandid, tihti täiendatud kolesterooli ja teiste laetud lipiididega. Liposoomid on võimelised kinni püüdma vesi- ja rasvlahustuvaid ühendeid, seeläbi võimaldades liposoomil toimida kandjana. Liposoomi on  
15 kasutatud kohaletoimetamissüsteemidena farmakoloogias ja meditsiinis näiteks immuoadjuvantidena, nakkushaiguste ja põletike ravis, vähiteraapias ja geeniteraapias (Gregoriadis jt., 1995). Faktorid, millel võib olla mõju liposoomide adjuvantefektile, on liposoomi suurus, lipiidne koostis ja pinnalaeng. Lisaks võib tähtis olla ka antigeeni asukoht (nt. kas see adsorbeeritakse või seotakse  
20 kovalentselt liposoomi pinnaga või kapseldatakse liposoomi vesikeskkonnaga kompartmenti). Dendriittrakte võib kasutada antigeeni kohaletoimetamises keskkonnana. Antigeeni laadimine antigeeni esitlevatele rakkudele, nagu näiteks dendriittrakkudele, on efektiivne kasvavastase immuunsuse rolliga aktiivsete T-rakkude tekitamiseks.

25 Kvaternaarsetel lämmastikühenditel, nagu näiteks dimetüüldioktadetsüülammooniumbromiid, -kloriid või nende teised orgaanilised või anorgaanilised soolad (DDA-B, DDA-C või DD-X), dimetüüldioktadetsenüülammooniumkloriid, -bromiid või nende teised orgaanilised või anorgaanilised soolad (DODA-C, DODA-B või DODA-X) või 1,2-dioleoüül-3-trimetüülammooniumpropaan (DOTAP), 1,2-  
30 dipalmitoüül-3-trimetüülammooniumpropaan, 1,2-distearoüül-3-trimetüülammooniumpropaan ja dioleoüül-3-dimetüülammooniumpropaan (DODAP) ja N-



[1-(2,3-dioleoüülüksü)propüül]-N,N,N-trimetüülammoonium (DOTMA), on piserdamisel vesikeskkonda võime moodustada lipiidseid agregate, nagu näiteks lipiidseid kaksikkihte, kõiki tüüpe nii ühekihilisi kui mitmekihilisi liposoomi, mitselle jms. Antud struktuuride lipiidsed membraanid annavad teiste amfiifilsete ühendite, nagu näiteks glükolipiidide, nt. MMG või alfa,alfa'-trehaloos-6,6'-dibehenaadi (TDB) sisestamiseks ideaalse maatriksi, mis parandab vesiikli dispersioone (Davidsen jt., WO2006/002642).

MMG ja kohaletoiemetamissüsteemi kombinatsioon võib toimida sünergistlikul viisil, et parandada immuunvastust, nt. kui DDA manustatakse üksinda. Kuigi DDA soodustab IFN- $\gamma$  produktsiooni madalat taset, kuid kombinatsioonis MMG-ga on IFN- $\gamma$  produktsioon suurenenud märkimisväärselt.

Käesoleva leiutise alla kuuluvaid liposoomi on võimalik valmistada erinevate tuntud meetodite abil (Davidsen jt., WO2006/002642). MMG kaasamist liposoomidesse/kohaletoiemetamissüsteemi on võimalik saavutada mitmete tuntud meetodite abil, sealgulgas liposoomide ja MMG lihtsalt segamise teel. Konkreetselt võib MMG kaasamist liposoomidesse saavutada, nagu on kirjeldanud Davidsen jt. (WO2006/002642).

Lisaks haiguste vastu immuunsuse andmisele võib käesoleva leiutise alla kuuluvaid adjuvandi kombinatsioone kasutada kõnealuste ühendite tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks, nt. meditsiinis ja analüütilises keemias.

#### JOONISTE LOETELU

**Joonis 1. *M. bovis* BCG mittepolaarsete ja polaarsete lipiidide immunostimulatoorse aktiivsuse isoleerimine ja hindamine.** *M. bovis* BCG Copenhagen'ist eraldatud polaarsete ja mittepolaarsete lipiidide analüüsiti 2-D TLC abil. Polaarsete lipiidide fraktsioonis on 1-4 fosfatidüülinositoolmannosiidid, PI on fosfatidüülinositool, PE on fosfatidüületanoolamiin ja DPG on difosfatidüülgütserool (kardioliid). PG on L-alfa-fosfatidüül-DL-gütsetool, samas kui 5 ja 6 on tundmatud fosfolipiidid. Mittepolaarne fraktsioon TAG on triatsüülgütserool, PDIM on ftiotserooldimükotserosaadid A, B ja C, MMG on monomükolüülgütserool, PGL on fenoolsed glükolipiidid ja FFA on vabad

rasvhapped (Paneel A). IDC inkubeeriti 24 tundi ainult söötme, LPS (0,1 µg/ml), MPL (100 µg/ml), Cord Factor'i (CF) (100 µg/ml), mittepolaarsete lipiidide (0,1 – 100 µg/ml) või polaarsete lipiidide (0,1 – 100 µg/ml) olemasolul. Välja on toodud DC-I olevate pinnamarkerite tasemete fluorestsentsi intensiivsuse geomeetriline keskmine (MFI) pärast ravi. Andmed saadi ühest kolmest representatiivsest eksperimendist, kasutades kolme erinevat doonorit. Pärast 100 µg/ml mittepolaarsete või polaarsete lipiididega ravi saadud kultuuri supernatante analüüsiti ELISA poolt tsütokiinide IL-6, TNF-α ja IL-12 olemasolu tuvastamiseks. Esindatud on ühest kolmest representatiivsest eksperimendist triplikaadina läbi viidud kolme erinevat doonorit kasutades saadud andmed (± s.e.m) (paneel C). PPD-negatiivsetelt doonoritelt pärinevate T-rakkude poolne proliferatsioon (Paneel D) ja IFN-γ vabanemine (Paneel E) pärast inkubatsiooni DC-ga, mida oli töödeldud 24 tundi 100 µg/ml mittepolaarsete või polaarsete lipiididega MLR analüüsis. Esindatud on ühest kolmest representatiivsest eksperimendist triplikaadina läbi viidud kolme erinevat doonorit kasutades saadud andmed (± s.e.m).

**Joonis 2. MMG, TAG, PDIM ja PGL struktuurid.** Individuaalsete lipiidide PDIM, TAG, PGL ja MMG 2-D TLC analüüs (Paneel A) ja MMG, PGL, PDIM-ide ja TAG-ide representatiivsed struktuurid (Paneel B).

**Joonis 3. Inimese dendriitrakkude aktivatsioon MMG poolt.** IDC inkubeeriti 24 tundi ainult söötmega (punktiirjoon) või MMG, PDIM, PGL või TAG-iga (10 µg/ml). Leiti, et lipiidsed preparaadid ei sisalda endotoksiini kontaminatsiooni (< 0,001 ng LPS/µg lipiid). Näidatud on kuuhest representatiivsest doonorist ühe doonori DC-I paiknevate pinnamarkerite tasemete MFI pärast ravi (Paneel A). Pärast MMG, PDIM A, PGL või TAG-i (10 µg/ml) ravi saadud kultuuri supernatante analüüsiti ELISA poolt tsütokiinide IL-6, TNF-α ja IL-12 olemasolu tuvastamiseks (Paneel B). Esindatud on kolmest või neljast eksperimendist triplikaadina läbi viidud erinevaid doonorit kasutades saadud andmete keskmine (± s.e.m). Andmeid analüüsiti Tukey testi kasutades.

**Joonis 4. MMG alfa- ja ketomükolaadid on immunostimulatoorsed.** IDC inkubeeriti 24 tundi ainult söötmega ja MMG alfa- või ketomükolaatidega (10 µg/ml). Näidatud on DC-I olevate pinnamarkerite MFI pärast ravi.

**Joonis 5. *M. bovis* Copenhagen-ist isoleeritud MMG poolt indutseeritud IFN- $\gamma$  vabanemine.** C57BL/6 hiired immuniseeriti Ag85B-ESAT-6 ja DDA liposoomidesse sisestatud BCG Copenhagen'ist isoleeritud lipiididel põhinevate adjuvantide kombinatsiooniga. Päevade jooksul pärast vaksineerimist mõõdeti

5 lümfisõlmedest isoleeritud PBMC poolt vabastatavat IFN- $\gamma$ .

**Joonis 6. Kaitse virulentse TB infektsiooni vastu MMG adjuvantidega.** C57BL/6 hiiri immuniseeriti kolm kord Ag85B-ESAT-6-ga kombinatsioonis DDA-l põhinevate adjuvantide ja 10 või 50  $\mu$ g MMG-ga. Kuus nädalat pärast viimast vaksineerimist eksponeeriti hiired *M. tuberculosis*'t sisaldavale aerosoolile. Kuus

10 nädalat hiljem mõõdeti bakterite arv kopsudes ja põrnas. Standardset BCG vaktsiini saavad hiired kaasati positiivse kontrollina ja DDA/MMG (10  $\mu$ g) ilma antigeenita vaktsiini saavaid hiiri kasutati negatiivse kontrollina. Eksperimentaalsete vaktsiinide kaitse tõhusus on väljendatud kui bakteriaalse koormuse Log10 vähenemisena kopsudes võrreldes mitteimmuniseeritud hiirtega.

15 Tulemused on igas rühmas kuue hiire keskmised väärtused  $\pm$ SEM. Mitteimmuniseeritud kontrollist märkimisväärselt erinevad tulemused on märgitud kui \*  $P < 0,05$ .

**Joonis 7. IFN- $\gamma$  vabanemist suurendab MMG ja DDA kombineerimine.** Kahes eksperimendis immuniseeriti C57BL/6 hiiri Ag85B-ESAT-6-ga koos DDA või

20 DDA/MMG(Paneel A) või MMG või DDA/MMG (Paneel B). Kolm nädalat pärast viimast vaksineerimist mõõdeti verest (paneel A) või põrnadest (Paneel B) isoleeritud PBMC poolset IFN- $\gamma$  vabanemist.

**Joonis 8. IFN- $\gamma$  vabanemist suurendab TDB lisamine MMG/DDA kombinatsiooni.** C57BL/6 hiiri immuniseeriti Ag85B-ESAT-6-ga, mida manustati

25 DDA liposoomidesse sisestatud MMG-ga või TDB sisaldavate DDA liposoomidega. 5 kuud pärast vaksineerimist mõõdeti verest isoleeritud PBMC poolset IFN- $\gamma$  vabanemist.

**Joonis 9. Sünteetiliste MMG analoogide struktuuride näidised.**

**Joonis 10. Immuunvastused on võrreldavad looduslike ja sünteetiliste MMG**

30 **analoogidega.** C57BL/6 hiiri immuniseeriti Ag85B-ESAT-6-ga DDA-s, DDA/MMG-

s (10 µg), DDA/MMG C36-s (10 µg) või DDA/MMG C16-s (10 µg). Üks nädal pärast viimast immuniseerimist mõõdeti verest isoleeritud PBMC poolset IFN-γ vabanemist.

**Joonis 11. Suuremad immuunvastused lühema ahela pikkusega.** C57BL/6 hiiri immuniseeriti Ag85B-ESAT-6-ga DDA-s või DDA-ga koos ahela pikkusega 8 kuni 36 varieeruvate MMG analoogidega (1 µg/doos). Kolm nädalat pärast viimast immuniseerimist mõõdeti verest isoleeritud PBMC poolset IFN-γ vabanemist.

NÄITED

#### **Materjal ja meetodid:**

#### 10 M. BOVIS BCG-ST MITTEPOLAARSETE JA POLAARSETE LIPIIDIDE ERALDAMINE

*Mycobacterium bovis* BCG (Copenhagen) kasvatati modifitseeritud Sauton'i söötmes. Mükobakterid koguti 2-3 nädala pärast, suspendeeriti PBS-is ja surmati, inkubeerides neid 1 ½ tundi 60°C juures. Vastavalt standardprotokollile eraldati 15 mittepolaarsed ja polaarsed lipiidid (Dobson jt., 1985), (Rosenkrands jt., 2005).

Mittepolaarsete lipiidide eraldamiseks lisati 20 g mükobakteritele (märgkaal) metanool: 0,3% NaCl (440 ml) ja 440 ml petrooleumeetrit ning segu segati 2 tundi. Pärast tsentrifuugimist eemaldati ülemine kiht ja alumine kiht taaseraldati 440 ml petrooleumeetriga. Mõlemast eraldamisest pärinevad supernatandi faasid valati 20 kokku ja aurustati, et saada mittepolaarsed lipiidid.

Polaarsete lipiidide eraldamiseks kuumutati biomassi sisaldav metaanfüsioloogiline lahus keeva veega vannis 10 minutit 100°C juures, millele järgnes jahutamine 10 minutit 37°C juures. Lisati 520 ml kloroform:metanool:0-3% NaCl (9:10:3) ja segu segati üleöö. Üldsegu valati läbi kuumpressitud klaasleetri; koguti 25 filtrikook ja taaseraldati kaks korda 170 ml kloroform:metanool:0-3% NaCl (5:10:5) abil. Kõik kolm vesilahustuvat metaankloroformfaasi valati kokku ning lisati 580 ml kloroform:0,3% vesilahustuvat NaCl (1:1), segades seda 10 minutit. Faasidel lasti eralduda ja seejärel eemaldati ning visati ära ülemine veekiht. Alumine orgaaniline kiht aurustati kuivaks, et saada polaarsed lipiidid.

## INDIVIDUAALSETE MITTEPOLAARSETE LIPIIDIDE PUHASTAMINE

Isoleeriti PDIM-id ja TAG-id, kasutades TLC-de voolutust petrooleumeetris/atsetoonis (98:2); saadi ainult PDIM-i peamine komponent, mis põhines ftiotsetool A-l. PGL ja MMG isoleeriti koos TLC-de voolutuses  
5 tolueenis/atsetoonis (95:5). PGL ja MMG eraldati 1-D TLC abil kloroformis:metanoolis:0,880 ammoniaagis (97:3:0,5). PDIM-ide, TAG-ide, PGL ja MMG peal viidi läbi 500 MHz  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  tuumamagnetresonants (NMR) (Bruker drx500) ja MALDI-TOF mass-spektroskoopia (MS) (Bruker Biflex IV).  
Rehüdreeritud lipiidi ekstraktide (1 mg/ml) näidiseid (10  $\mu\text{l}$ ) analüüsiti SDS-PAGE  
10 (Laemmli jt., 1970) ja hõbedaga värvimise abil (Blum jt., 1987) jääkvalgu sisalduse suhtes. Leiti, et lipiidi preparaadid ei sisalda endotoksiini kontaminatsiooni (< 0,001 ng LPS/ $\mu\text{g}$  lipiid).

## MONOMÜKOLÜÜLGLÜTSEROOLI HÜDROLÜÜS

Monomükolüülglütserooli kuumutati üleöö 100°C juures koos 5% TBAH  
15 vesilahusega (2,5 ml) 16 x 100 mm tuubis (Minnikin jt., 1988). Pärast jahutamist lahjendati segu veega (2 ml), lisati iodometaan 10% lahus (3 ml) diklorometaanis ning tuubid asetati 1 tunniks rotaatorisse. Ülemine veekiht visati ära, madalam kiht pesti võrdsete koguste 1M HCl ja veega ning aurustati kuivaks, et saada jääk,  
mille puhul TLC (petrooleumeeter:atsetoon 95:5) näitab alfa- ja ketomükolaadi  
20 metüülestrite sisaldust. Preparatiivne TLC (sama nagu ülalpool) andis alfametüülmükolaadi ja ketomükoolmükolaadi.

Alfa-MMG ja keto-MMG eraldamiseks kasutati trimetüülsilüüli derivatiseerimist. MMG segu ja 600 ml TRI-SIL reagenti (Pierce) kuumutati 75°C juures 20 minutit. Seejärel kuivatati jahutatud lahus lämmastiku joa all ning laeti preparatiivsele TLC  
25 plaadile ning ilmutati petrooleumeetris:tolueenis (50:50) ning alfa-MMG ja keto-MMG ribad visualiseeriti 0,01% rodamiini abil ja uuriti pika lainepikkusega fluorestsentsi all. Vastavad ribad eraldati TLC plaadilt ning alfa-MMG ja keto-MMG ekstraheeriti silikageelilt kolm korda, kasutades dietüületrit (3 x 5 ml). Kokkuvalatud ekstraktid kuivatati ja trimetüülsilüülrühmad eemaldati, lisades  
30 heptaan:metanooli (1:1) ja mõned kristallid para-tolueensulfoonhapet ja segades 1

tund. Heptaankiht eraldati ja aurustati kuivaks, et saada puhastatud alfa-MMG ja keto-MMG.

### **C36 PRODUKTSIOONI VÄLJENDAVALD MMG SÜNTEES**

3-hüdroksü-2-tetradetsüül-oktadekaanhape (sünteesimine C<sub>32</sub> korünomükoolhape, 5 sünteesitud vastavalt Datta jt., 1991) (100 mg, 0,20 mmol, 1 ekv.) ja 4-pürrolidinopüridiin (100 mg, 3 ekv.) asetati 50 ml ümara põhjaga kolbi ning lisati 50 µl 2,2-dimetüül-4-hüdroksümetüül-1,3-dioksolaani lahus (sn-isopropülideenglütserool) diklorometaanis (500 µl) koos 4A molekulaarsete sõeltega. Segu tehti täielikult kuivaks toatemperatuuril kõrge vaakumi all, lisati 10 N',N-ditsükloheksüülkarbodiimidiasooli (DCC) (15ml, 0,1M DCC DCM-is, 5 ekv.) ja reaktsioon jäeti toatemperatuurile üleöö segunema. Filtreerimise teel eemaldati molekulaarsed sõelad, reaktsioonisegu redutseeriti *in vacuo* kuivaks ja jääk puhastati kiirkolonnkromatograafia abil (Fluka 60741 Silica Gel 60), voolutades hekseeniga kuni hekseen:etüülatsetaadiga (8:2) 5% juurdekasvudega, et saada 15 puhas isopropülideeni protekteeritud ühend (3-hüdroksü-2-tetradetsüül-oktadekaanhape-2,2-dimetüül-[1,3]-dioksolaan-4-ülmetüülester) 56% saagisena (68 mg). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δH 0,90 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (s, 54H, CH<sub>2</sub>), 1,40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,50 (m, 1H, CH), 4,05-4,40 (m, 5H, CH<sub>2</sub>, CH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δc 15,0 (CH<sub>3</sub>), 22,1, 28,8, 28,9, 29,0, 31,4 (CH<sub>2</sub>), 29,1 20 (CH<sub>3</sub>), 52,1 (CH (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>), 63,2 (CH<sub>2</sub>OCO), 69,3 (CH<sub>2</sub>O), 73,4 (CH (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>), 174,3 (C=O); *m/z* (EI) 633.55 [M+Na<sup>+</sup>] (100%); HRMS arv. C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O<sub>5</sub>Na[M+Na<sup>+</sup>] 633,5536 leidis 633,5527. 3-hüdroksü-2-tetradetsüül-oktadekaanhape-2,2-dimetüül-[1,3]- dioksolaan-4-ülmetüülester (68 mg, 1 ekv.) lahustati 6 ml trifluoroatseethappe:tetravesinikfuraani:vee (8:17:3, ruumala järgi) 25 lahuses ja segati toatemperatuuril üleöö. Lahus neutraliseeriti küllastunud naatriumbikarbonaadi vesilahusega ja segu ekstraheeriti kaks korda kloroformiga. Orgaaniline ekstrakt pesti vee ja soolalahusega, kuivatati ja redutseeriti *in vacuo*, et saada toorprodukt valge tahke ainena, mis puhastati kiirkolonnkromatograafia abil 10 g silikageelil Varian Bond Elut 12256026 karkassil, voolutades hekseeni 30 kuni hekseeni:etüülatsetaadiga (7:3) 5% juurdekasvudega, et saada pealkirjas mainitud ühend valge tahke ainena 49% saagisena (32 mg). Sulamispunkt 72-74°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δH 0,90 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (s, 54H, CH<sub>2</sub>), 2,50 (m,

1H, CH), 3,45-3,85 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 4,25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) δ<sub>c</sub> 15,0 (CH<sub>3</sub>), 26,3, 30,9, 31,3, 33,5 (CH<sub>2</sub>), 47,5 (CH (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>), 68,4 (CH<sub>2</sub>), 69,5 (CH(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>), 72,5 (CH<sub>2</sub>O), 76,4 (CH), 175,4 (C-1); *m/z* (EI) 593,50 [M+Na<sup>+</sup>]

5 (100%); HRMS arv. C<sub>35</sub>H<sub>70</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 593,5121 leiti 593,5143.

### DENDRIITRAKKUDE ANALÜÜSID

Inimese PBMC-dest tuletatud DC-d saadi vastavalt Romani jt., 1994 põhjal modifitseeritud meetodi abil. Perifeerne veri saadi *buffy coat* kihtidest. Lühidalt: monotsüüdid isoleeriti Ficoll-Hypaque tsentrifugimise teel (Lymphoprep 1077  
10 density medium, Nycomed, Oslo, Norra), mille järgnes CD14-positiivsete rakkude eraldamine, kasutades anti-CD14 märgisega magnetilisi graanuleid (MACS; Miltenyi Biotech, Bergesh Gladbach, Saksamaa). Monotsüüte kasvatati täielikus RPMI 1640-s, millele oli täiendavalt lisati 10% FCS, 50 µM 2-merkaptotetanooli, 100 Ü/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomütsiini, 2 mM L-glutamiini (kõik Gibco)  
15 (CM), ja 100 ng/ml inimese rekombinantse GM-CSF (Prepotech, Rocky Hill, NJ, USA) ja 50 ng/ml inimese rekombinantse IL-4 (Becton Dickinson (BD)) juuresolekul 7 päeva 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

7. päeval kasvatati iDC (1 x 10<sup>5</sup> rakku/ml) täiendavalt 24 tundi koos lipopolüsahhariidiga (LPS) (*Escherichia coli* O127:B8) (Sigma-Aldrich, Brondby,  
20 Taani) või *M. bovis* BCG-st tuletatud lipiididega. Lipiidi ekstraktid valmistati, taaslahustades kuiva *M. bovis*'e lipiidse materjali kloroformi:metanooliga (2:1), millele järgnes lahusti aurustamine ja sondiga ultrahelitöötlus CM-i. Lipiidid lisati ebaküpsle DC-le 0,1 kuni 100 µg/ml juures.

### LÄBIVOOLU TSÜTOMEETRILINE ANALÜÜS

25 DC-d märgistati pinnamarkerite suhtes, inkubeerides neid esmalt vastava mAb-iga (BD Pharmingen) (30 min., 4°C), millele järgnes 1/20 lahjendatud FITC-konjugeeritud kitse hiirevastane Ig (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) (30 min., 4°C). Mittespetsiifiline Ab seostumine blokeeriti 10% vasika loote seerumi lahusega (15 min., 4°C) enne vastava primaarse inimese mAb-i

lisamist. Märgistatud rakke uuriti koheselt läbivoolutsütomeetria teel, kasutades FACScan läbivoolu tsütomeetrit (BD), ja analüüsiti CellQuest tarkvara abil.

### TSÜTOKIINIDE MÕÕTMISED

5 DC kultuuri supernatandid koguti kokku ja hoiustati  $-20^{\circ}\text{C}$  juures. Vastavalt tootja juhiste mõõdeti ELISA (BD) abil sekreteeritud IL-12p70, IL-6 ja TNF- $\alpha$ .

### LEUKOTSÜÜTIDE SEGUREAKTSIOONI (MLR) ANALÜÜS

10 Leukotsüütide segureaktsiooni (MLR) analüüsi jaoks genereeriti iDC monotsüütidest, nagu on ülalpool välja toodud. Saadud rakke kasvatati 24 tundi samas söötmes (iDC) või lipiide sisaldavas söötmes (10 või 100  $\mu\text{g/ml}$ ). DC-de tiitrimisi alates  $0,125 \times 10^5$  kuni  $2 \times 10^5$  inkubeeriti  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  juures PPD-negatiivselt doonorilt pärinevate allogeensete T-rakkudega lameda põhjaga 96 süvendiga mikrotiiterplaatidel. T-rakud isoleeriti, kasutades vastavalt tootja juhiste Pan-T raku isoleerimiskomplekti (Miltenyi). DC allogeenseid T-raku kokultuure inkubeeriti 6 päeva. Supernatant eraldati ja hoiustati  $-20^{\circ}\text{C}$  juures, kuni  
15 vastavalt tootja juhiste mõõdeti ELISA (BD) abil sekreteeritud IFN- $\gamma$ . Mõlemasse analüüsi lisati seejärel sööde, mis sisaldas 1  $\mu\text{Ci/süvend}$   $[^3\text{H}]$ tümidiini lõpliku kultuuri 18h jaoks. Rakud koguti ja T-raku proliferatsiooni mõõdeti vedelikustintillatsiooniloenduse kaudu (Microbeta Systems). Kõik analüüsid viidi läbi triplikaadina, kasutades vähemalt kolme erinevat doonorit.

### 20 ANTIGEENID

Ag85B ja ESAT-6 liitvalk (edaspidi märgitud kui Ag85B-ESAT-6) toodeti rekombinantsete valkudena, nagu on eelnevalt kirjeldatud (Olsen jt., 2001).

### LOOMAD

25 8 kuni 12 nädalat vanad emased BALB/c või C57BL/6 hiired saadi Born-holtgaard (Ry, Taani) või Harlan Scandinavia (Taani) poolt. Nakatatud hiiri hoiti puurides BL-3 laminaarse vooluga turvalises suletud alas.



### IMMUNISEERIMISED

Hiiri immuniseeriti subkutaanselt (s.c.) sabajuure piirkonda kuni kolm korda, kusjuures iga immuniseerimise vahele jäi kaheädalane intervall. Vaktsiinid (0,2 ml/hiir) sisaldasid 250 µg DDA-s emulgeeritud 2 µg liitvalku Ah85B-ESAT-6 ja 10 µg rehüdreeritud lipiidi ekstrakti, kui ei ole teisiti viidatud. Mõnedel juhtudel sisestati 11mol% TDB DDA liposoomidesse (Davidsen jt., PCT/DK2005/000467). *M. tuberculosis*'e infektsiooni hõlmavates ekspreimentides kasutati positiivse kontrollina hiirte rühma, mis sai ühe doosi BCG Danish 1331 süstituna sabajuure piirkonda. Üldised või individuaalsed lipiidi ekstraktid valmistati kuiva *M. bovis*'e materjali rehüdreerimisel Milli Q veega 1 või 5 mg/ml juures, millele järgnes sondiga ultraheliga töötlemine. Standardised lipiidvaktsiinid valmistati, segades antigeeni füsioloogilise lahusega, millele järgnevalt lisati rehüdreeritud lipiidi ekstrakt ja DDA ja keerisena segamine. Vaktsiin jäeti üleöö seisma, et võimaldada antigeeni adsorptsiooni.

### 15 LÜMFOTSÜÜDI KULTUURID

7-150 päeva pärast viimast immuniseerimist võeti hiirtelt vereproovid või kubeme lümfisõlmed ja need prepareeriti, nagu on eelnevalt kirjeldatud (Rosenkrands jt., 2005). Rakukultuurid viidi läbi triplikaadina ümara põhjaga mikrotitersüvendites, mis sisaldasid  $2 \times 10^5$  rakku ruumalaga 200 µl RPMI, millele oli lisatud 2-merkaptotetanolooli, glutamiini, penitsilliin-streptomütsiini, hepes't ja 10% vasika loote seerumit. Restimulatsiooniks kasutati antigeeni kontsentratsioon 5 µg/ml. Ainult söödet või 5 µg/ml ConA sisaldavad süvendid kaasati kõikidesse eksperimentidesse vastavalt negatiivsete ja positiivsete kontrollidena. Kultuuri supernatandid koguti paralleelsetest kultuuridest pärast 72 tunni pikkust inkubatsiooni antigeeni olemaolul ning IFN-γ kogus määrati ensüümse immunosorbenttesti abil (Brandt jt., 2000).

### EKSPERIMENTAALSED INFEKTSIOONID

Vaktsiini tõhususe hindamiseks eksponeeriti hiiri 2,5 kuud pärast esimest immuniseerimist aerosooli teel Glas-Col inhalatsioonekspositsiooni süsteemis, mis oli kalibreeritud umbes 25 CFU virulentse *M. tuberculosis Erdman*'i hoiustamiseks

kopsudes. Kuus nädalat hiljem määrati bakteriaalne koormus põrnas ja kopsudes, asetades seerialahjendused Middlebrook 7H11 agarile, millele oli BCG kasvu selektiivseks pärssimiseks lisatud milliliitri kohta täiendavalt 2 µl 2-tiofeenkarboksüülhappe hüdrasiidi. Kolooniad loetleti 2-3 nädalat pärast

5 inkubatsiooni 37°C juures.

### STATISTILINE ANALÜÜS

Nakatatud hiirte ja kontrollhiirte kolooniate arvu erinevust testiti mitmete analüüside abil. Kui tuvastati märkimisväärseid toimeid, hinnati keskmiste erinevust Dunnett'i testi abil. Inimese DC analüüside puhul testiti vastusena

10 erinevatele lipiididele toimunud tsütokiinide vabanemise erinevusi mitmete analüüside abil ning kui tuvastati märkimisväärseid toimeid, hinnati keskmiste erinevust Tukey testi abil.

### **NÄIDE 1**

#### M. BOVIS BCG-ST PÄRINEVATE MITTEPOLAARSETE LIPIIDIDE

15 ISOLEERIMINE JA IMMUNOSTIMULATOORNE AKTIIVSUS

*M. bovis* BCG kogulipiidid eraldati polaarseteks ja mittepolaarseteks fraktsioonideks. Polaarses fraktsioonis olid tuvastavad lipiidid fosfatidüülinositoolmannosiidid (1-3), fosfatidüülinositool (PI), fosfatidüületanoolamiin (PE), difosfatidüülgütserool (DPG) ja L-alfa-fosfatidüül-DL-

20 glütserool (PG). Tuvastati ka mitmeid tundmatuid fosfolipiide (7 ja 8) (Joonis 1A). Mittepolaarses fraktsioonis olid põhilised tuvastavad lipiidid ftiotserooldimükotserosaadid (PDIM-id), triatsüülgütseroolid (TAG-id), fenoolne glükolipiid 8PGL) ja monomükolüülgütserool (MMG) (Joonis 1). FFA on vabad rasvhapped.

25 Uuriti mittepolaarsete ja polaarsete lipiidide võrdlevat immunostimulatoorset aktiivsust, kasutades selleks inimese perifeerse vere monotsüütidest tuletatud ebaküpsed DC-sid (iDC) (Joonis 1). Mittepolaarsete lipiididega töötlemise tulemuseks oli võrreldes töötlemata kontrollidega aktivatsioonimarkerite CD86, CD40 ja HLA-DR tasemete doosist sõltuv suurenemine (Joonis 2B). 100 µg/ml

30 mittepolaarsete lipiidide annuse lisamine andis utlemuseks DC aktivatsiooni, mis

oli võrreldav potentse immunostimulatoorse molekuli LPS (0,1 µg/ml) omaga ning suurem kui mükobakteriaalse *cord factor*'i (TDM) omaga ning antud molekulide MPL ülesregulatsiooniga kaasnes proinflammatoorsete mediaatorite tuumori nekroosi faktori  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukiin (IL)-6 ja IL-12 sekretsioon (Joonis 2C).

5 Antud proinflammatoorsete tsütokiinide tasemed polaarsete lipiididega töödeldud iDC-de supernatantides olid antud analüüsi kasutades allpool tuvastuspiiri. Lõpuks me kasutasime DC aktivatsiooni veel ühe näitajana leukotsüütide segureaktsiooni (MLR), kasutades PPD-negatiivselt doonorilt pärinevaid allogeenseid T-rakke (Joonised 2D & E). Lisaks me leidsime mittepolaarsete lipiididega töödeldud DC-

10 de kõrget aktivatsiooniolekut toetavate faktidena veel proliferatsiooni ja IFN- $\gamma$  vabanemise kõrged tasemed, samas kui polaarsete fraktsiooni poolt ei indutseeritud MLR.

## NÄIDE 2

### INDIVIDUAALSETE LIPIIDIDE ISOLEERIMINE M. BOVIS BCG

15 MITTEPOLAARSEST LIPIIDI EKSTRAKTIST JA MMG ISELOOMUSTUS

Preparatiivse TLC abil isoleeriti immunostimulatoorsest mittepolaarsest fraktsioonist lipiidid, et saada ftiotseroolimükotserosaat A (PDIM A), TAG-ide, PGL ja MMG puhtad näidised; tuvastati ka ftiotserool B ja ftiodiioon A väikseid koguseid, kuid neid ei kogutud kasutatavate preparatiivsete meetodite abil (Joonis

20 2A). Lipiidide struktuur ja olemused kinnitati  $^1\text{H}$  tuumamagnetresonantsi (NMR) ja mass-spektroskoopia (MS) abil (Joonis 2B ja andmed ei ole välja toodud). MMG komponent väljendas  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  NMR spektrit, mis on iseloomulik 1-monoatsüülgütseroolile (Gunstone jt., 1991). MALDI-TOF MS liitununa üldise MMG fraktsiooni NMR andmetega (Tabel 1), paljastas *cis*- ja *trans*-vormis alfa-

25 mükolaadi ja keto-mükolaadi olemasolu. Peamiste komponentide ligikaudne suhe oli vastavalt 1,00: 0,29 : 0,24.

Tabel 1: Puhastatud MMG MALDI-TOF mass-spektromeetria. M + Na<sup>+</sup> ionide signaalid on m/z. Seeriaste peamised komponendid on välja toodud rasvases kirjas ja peamine komponent on alla joonitud.

MMG			SÜSINIKU NUMBER
c-keto	t-keto	α	
		1206	79
		<b>1234</b>	81
		1262	83
1306			84
<b>1335</b>			86
	1349		87
<b>1363</b>			88
	<b>1377</b>		89
1391			90
	1405		91

### NÄIDE 3

#### INIMESE DENDRIITRAKKUDE AKTIVATSIOON MMG POOLT

Hinnati puhastatud MMG, PDIM A, PGL ja TAG-i võimet aktiveerida inimese iDC.

5 Antud analüüsidest leiti, et MMG on järjekindlalt kõige potentsem DC aktivatsiooni indutseerija, mis viis CD86, CD40 ja HLA-DR väljendunud ülesregulatsioonini (Joonis 3A). MMG aktiveeris isegi rohkem DC-sid kui PDIM A ehk lipiid, mida on kaua seostatud mükobakterite patogeensusega (Cox jt., 1999), mis tõusis esile kui aktiivsusest teine lipiid, samas kui PGL ja TAG-id indutseerisid vähem

10 aktivatsiooni. Kuue individuaalse doonori puhul oli täheldatud aktivatsiooni järjekord selline: MMG > PDIM A > PGL > TAG-id ning töötlemata iDC-ga seostatud tasemetest ülalpool olevate CD86 tasemete kordselt suurenemise keskmine olid vastavalt  $1,91 \pm 0,29$ ,  $1,82 \pm 0,43$ ,  $1,52 \pm 0,26$  ja  $1,32 \pm 0,14$ . Tsütokiinide indutseerimine järgis sama üldist trendi (Joonis 3B), milles MMG

15 tõusis esile kui kõige potentsem immunostimulatoorne lipiid. IL-6 vabastati MMG suhtes eksponeeritud DC-de poolt märkimisväärselt suuremate tasemete juures ( $P < 0,05$ ) kui PGL või TAG ekspositsiooni puhul. Teiste lipiidide poolt tsütokiinide indutseerimise puhul ei tuvastatud märkimisväärsed erinevusi. MMG võib seetõttu

*M. bovis* BCG mittepolaarses lipiidi fraktsioonis klassifitseerida kõige potentsemaks immunostimulaatorseks lipiidiks.

#### **NÄIDE 4**

##### ALFA- JA KETO-MMG IMMUNOSTIMULATOORNE AKTIIVSUS

5 Antud näites me tahtsime põhjalikumalt arutada MMG stimulaatorseid omadusi ja tuvastada selle potentsi immunostimulaatorse võime eest vastutava aktiivse komponendi. Pärast MMG trimetüülsilüülestri valmistamist, preparatiivset TLC-d ja sellele järgnevat trimetüülsilüüleetri protekteerivate rühmade hüdrolyüüsi alfa-MMG ja keto-MMG saamise eesmärgil, eraldati Alfa-MMG ja keto-MMG. Alfa- ja ketomükolaatide struktuurid on dokumenteeritud Joonisel 2B. Kui hinnati nende võimet aktiveerida inimese iDC, stimuleerisid alfa- ja keto-MMG aktivatsioonimarkerite tasemete 2-3kordse kasvu (Joonis 4). Seetõttu väljendavad MMG kaks alamkomponente ka inimese DC stimuleerimise võimet.

#### **NÄIDE 5**

##### 15 Th1 IMMUUNVASTUSE INDUTSEERIMINE M. BOVIS BCG-ST ISOLEERITUD MMG POOLT

Et uurida MMG adjuvantset aktiivsust, testiti isoleeritud lipiidide võimet indutseerida hiirtel IFN- $\gamma$  produktsiooni. C57BL/6 hiirtele manustati 10  $\mu$ g täis- või individuaalseid lipiide. *In vivo* toimib DDA kui lipiidide kohaletõimeamise keskkond. Seetõttu manustati subkutaansel teel 2  $\mu$ g liitvalku Ah85B-ESAT-6 ja 250  $\mu$ g DDA-s emulgeeritud 10  $\mu$ g rehüdreeritud lipiidi ekstrakti. Lümfisõlmest isoleeritud PBMC restimulatsioonil DDA liposoomidesse sisestatud 10  $\mu$ g MMG annuse tulemuseks oli IFN- $\gamma$  tase 10 ng/ml; antud tase on võrreldav samaväärses doosis DDA kogulipiidide puhul täheldatud tulemusega (Joonis 5). PGIM-A indutseeris ka IFN- $\gamma$  produktsiooni, kuigi madalama taseme juures, samas kui DDA liposoomidesse sisestatud Tag või PGL soodustasid väga vähest IFN- $\gamma$  vabanemist (Joonis 5 ja andmed ei ole välja toodud). Peab märkima, et antud individuaalsed lipiidid näivad toimivat kui adjuvandid, kuna ei lipiidi koguekstraktiga ega individuaalsete lipiididega restimulatsioonil ei täheldatud uut vastust (andmed ei ole näidatud). Seetõttu tuvastati MMG kui ka kõige aktiivsem mittepolaarne lipiid *in vivo* ning see

võib üksinda olla vastutav BCG-st tuletatud kogulipiidide enamiku adjuvantse aktiivsuse eest.

## **NÄIDE 6**

### MMG-L PÕHINEVATE ADJUVANDITE KAITSE EFEKTIIVSUS

- 5 Et hinnata MMG-I põhinevate adjuvandite võimet anda TB infektsiooni vastu kaitset, immuniseeriti C57BL/6 hiiri Ag85B-ESAT-6-ga, mis toimetati kohale MMG-ga (kaks erinevat doosi) ja DDA-ga. BCG vaktsiini ja ainult adjuvanti saavad hiirte rühmad kaasati vastavalt positiivsete ja negatiivsete kontrollidena. Kuus nädalat pärast viimast vaktsineerimist eksponeeriti hiired aerosooli teel elusa *M. tuberculosis*'e suhtes. Vaktsiinide võimet vähendada bakteriaalset koormust mõõdeti kuus nädalat hiljem kopsudes ja põrnas. Antud andmed näitasid adjuvandina kasutatava MMG/DDA märkimisväärseid kaitse tasemeid ja BCG omaga võrreldavat kaitse tasemeid (Joonis 6). Nagu oodatud, oli antud efekt spetsiifiline, kuna ilma antigeenita ainult adjuvandiga vaktsineeritud hiired ei suutnud pärssida bakteriaalset kasvu.

## **NÄIDE 7**

### MMG JA DDA KOMBINEERIMISEL SAAVUTATAV PAREM EFEKT

- Et hinnata immunomodulaatorite (MMG) ja kohaletoimetamissüsteemi (DDA) kombineerimise efekti, vaktsineeriti C57BL/6 hiiri ainult DDA-ga või DDA/MMG kombinatsiooniga (exp. 1, Joonis 7A) või exp. 2 (Joonis 7B) ainult MMG-ga või DDA/MMG kombinatsiooniga. Antud eksperimentide põhjal on selge, et immuunvastus on märkimisväärselt suurenenud DDA ja MMG kombineerimise korral.

## **NÄIDE 8**

- 25 IMMUUNVASTUSE PARANDAMINE, SISESTADES TDB/KOLMANDA KOMPONENDI MMG JA DDA LIPOSOOMIDESSE

Et uurida MMG adjuvantse aktiivsuse efekti, kui seda kombineeritakse teiste immunostimulaatorsete komponentidega, hinnati C57BL/6 hiirte immuunvastust

pärast subkutaanset immuniseerimist DDA liposoomidesse sisestatud Ag85B-ESAT-6 ja 10 µg MMG-ga või DDA liposoomidesse sisestatud immunomodulaatoritega TDB (Davidsen jt., PCT/DK2005/000467) 5 kuud pärast esimest vaktsineerimist. Samas kui DDA liposoomidesse sisestatud MMG kombinatsioon andis verest isoleeritud PBMC restimulatsioonil tulemuseks IFN-γ taseme ~25ng/ml, oli IFN-γ tase oluliselt suurenenud, kui kasutati DDA liposoomidesse sisestatud TDB (Joonis 8). Seetõttu täheldati MMG, DDA ja TDB vahelist sünergistlikku efekti, mis viitas sellele, et kolmanda komponendi lisamine MMG ja DDA kombinatsioonile võib veelgi parandada adjuvantset aktiivsust.

## 10 NÄIDE 9

### MMG ANALOOGIDE ADJUVANTNE AKTIIVSUS ON VÕRRELDAV LOODUSLIKU MMG OMAGA

Et hinnata sünteetiliste MMG analoogide immunoloogilist efekti, immuniseeriti C57BL/6 hiiri DDA-s oleva Ag85B-ESAT-6-ga koos loodusliku MMG-ga, 16 süsinikuga loodusliku MMG analoogiga (nagu on kujutatud Joonisel 9) ja 36 süsinikuga sünteetilise MMG analoogiga (nagu on kujutatud Joonisel 9) (kõik 10 µg/DDA/MMG). Immuunvastus mõõdeti verest üks nädal pärast viimast vaktsineerimist ning see väljendas kolme MMG-l põhineva adjuvantiga võrreldavaid vastuse tasemeid, samas kui DDA üksi väljendas madalamat efekti.

## 20 NÄIDE 10

### TUGEVAMAD IMMUUNVASTUSED LÜHEMA AHELA PIKKUSEGA

Et hinnata sünteetiliste MMG analoogide immunoloogilist efekti lühemate ahela pikkustega, immuniseeriti C57BL/6 hiiri järgnevalt: ainult DDA-s oleva Ag85B-ESAT-6-ga, DDA ja loodusliku MMG-ga, DDA ja erinevate sünteetiliste analoogidega, mis jäid vahemikku C8 kuni C36 (kõik 1 µg/doos). Immuunvastus mõõdeti verest kolm nädalat pärast viimast vaktsineerimist ning see näitas, et sünteetilised MMG analoogid aktiveerivad isegi annuste juures 1 µg. Lisaks näitavad tulemused, et lühemad (alates 16C või vähem) sünteetilised MMG analoogid on efektiivsemad võrreldes loodusliku MMG-ga. \*\*\* P < 0,001. (Joonis 11).

**Viited**

- Bennekov, T., J. Dietrich, I. Rosenkrands, A. Stryhn, T.M. Doherty ja P. Andersen. 2006. *Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 36(12): 3346-55.
- 5
- Gregoriadis, G. 1995. *Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems*. *Trends Biotechnol.* 13(12): 527-37.
- Blum, H., H. Beier ja H. J. Gross. 1987. *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- 10 Brandt. L., M. Elhay, I. Rosenkrands, E.B. Lindblad ja P. Andersen. 2000. *ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68: 791-795.
- Brennan, P. J. ja M. B. Goren. 1979. *Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the mycobacterium avium.Mycobacterium intracellulare. Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. Mycobacterium intracellulare serotype 9*. *J. Biol. Chem.* 254(10): 4205-4211.
- 15
- Cox, J. S., B. Chen, M. McNeil ja W.R. Jacobs, Jr. 1999. *Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice*. *Nature* 402: 79-83.
- 20 Dascher, C. C., K. Hiromatsu, jt. 2003. *Immunization with a mycobacterial lipid vaccine improves pulmonary pathology in the guinea pig model of tuberculosis*. *Int. Immunol.* 15(8): 915-925.
- Davidson, J., Rosenkrands, I. ja P. Andersen. (PCT/DK2005/000467)
- Dobson, G., D. E. Minnikin, S. M. Minnikin, J. H. Parlett, M. Goodfellow ja M. Ridell, a. M. M. *Systematic analysis of complex mycobacterial lipids* (ed. Minnikin, M. G. a. D. E.) 237-265 (Academic Press, London, 1985).
- 25
- Gluck, R. 1995. *Liposomal presentation of antigens for human vaccines*. *Pharm Biotechnol.* 6: 325-345.



Gunstone, F. D. 1991. *Chemistry and Physics of Lipids* 58: 219-224.

Harboe, M., A.S. Malin, H.S. Dockrell, H.G. Wiker, G. Ulvsund, A. Holm, M.C. Jørgensen, Andersen P. *B-cell epitope and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis. Inft. Immun.* 66 (2):717-23.

5 Hiu, I. J. 1975. *Mycobacterial adjuvant and its carrier. Experientia.* 31(8): 983-5.

Indrigo, J., R. L. Hunter, Jr, jt. 2002. *Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. Microbiology* 148(7): 1991-1998.

10 Koike, Y., Y. C. Yoo, jt. 1998. *Enhancing activity of mycobacterial cell-derived adjuvants on immunogenicity of recombinant human hepatitis B virus vaccine. Vaccine* 16(20): 1982-1989.

Laemmli, U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 227: 680-685.

15 Lima, V. M. F., V. L. D. Bonato, jt. 2001. *Role of Trehalose Dimycolate in Recruitment of Cells and Modulation of Production of Cytokines and NO in Tuberculosis. Infect. Immun.* 69(9): 5305-5312.

Lindblad, E., M. Elhay, jt. 1997. *Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines." Infect. Immun.* 65(2): 623-629.

20 McBride, B. W., A. Mogg, jt. 1998. *Protective efficacy of a recombinant protective antigen against Bacillus anthracis challenge and assessment of immunological markers. Vaccine* 16(8): 810-817.

Minnikin, D. E. 1982. *Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. The Biology of the Mycobacteria.* C. R. a. J. L. Stanford. London, Academic Press.

25 Minnikin, D. E. in *Bacterial Cell Surface Techniques* (ed. Hancock, I. C., Poxton, I. R.) 125-135 (Wiley, Chichester, 1988).

- Minnikin, D. E. 1988. *Isolation and purification of mycobacterial wall lipids. Bacterial Cell Surface Techniques*. I. C. Hancock, Poxton, I. R. Chichester, Wiley: 125-135.
- Minnikin, D. E., L. Kremer, jt. 2002. "The Methyl- Branched Fortifications of  
5 *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & Biology* 9(5): 545-553.
- Moingeon, P., J. Haensler, jt. 2001. *Towards the rational design of Th1 adjuvants. Vaccine* 19(31): 4363-4372.
- Mosmann, T. R. ja S. Sad 1996. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today* 17(3): 138-146.
- 10 Nathan, C., H. Murray, jt. 1983. *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med.* 158(3): 670-689.
- Olsen, A. W., L. A. H. van Pinxteren, L. M. Okkels, P. B. Rasmussen ja P. Andersen. 2001. *Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on  
15 a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT- 6. Infect. Immun.* 69:2773-2778.
- Rao V, F. N., Porcelli SA, Glickman MS 2005. *Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. J Exp Med* 201: 535-543.
- Reed, M. B., P. Domenech, jt. 2004. *A glycolipid of hypervirulent tuberculosis  
20 strains that inhibits the innate immune response. Nature* 431(7004): 84-87.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinker, P.O. Fritsch, R.M. Steinman ja G. Schuler. 1994. *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J.Exp.Med* 180: 83-93.
- Rosenkrands, I., E.M. Agger, A.W. Olsen, K.S. Korsholm, C.S. Andersen, K.T.  
25 Jensen ja P. Andersen. 2005. *Cationic Liposomes Containing Mycobacterial Lipids: a New Powerful Th1 Adjuvant System. Infect. Immun.* 73: 5817-5826.
- Saito, R., Tanaka, A., Sugiyama, K., Azuma, I. ja Yamamura, Y. 1976. *Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid." Infect Immun.* 13(3): 776-781.

- Silva, C.L. 1985. *Inflammation induced by mycolic acid-containing glycolipids of Mycobacterium bovis (BCG)*. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* 18: 327-335.
- Sirakova, T. D., V. S. Dubey, jt. 2003. *The Largest Open Reading Frame (pks12) in the Mycobacterium tuberculosis Genome Is Involved in Pathogenesis and Dimycocerosyl Phthiocerol Synthesis*. *Infect. Immun.* 71(7): 3794-3801.
- Sprott, G. D., C. J. Dicaire, jt. 2004. *Activation of Dendritic Cells by Liposomes Prepared from Phosphatidylinositol Mannosides from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and Adjuvant Activity In Vivo*. *Infect. Immun.* 72(9): 5235-5246.
- 10 Stanfield, J.P., D. Gall, Bracken P.M. 1973. *Singledose antenatal tetanus immunisation*. *Lancet* 1 (7797):215-9.
- Suzuki F, B. R., Pollard RB. 1986. *Importance of Lyt 1 + T-cells in the antitumor activity of an immunomodulator, SSM, extracted from human-type Tubercle bacilli*. 1986 77(2): 441-7.
- 15 Uehori, J., M. Matsumoto, S. Tsuji, T. Akazawa, O. Takeuchi, S. Akira, T. Kawata, I. Azuma, K. Toyoshima ja T. Seya. 2003. *Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan*. *Infect. Immun.* 71:4238-4249.
- 20 van Rooij, E. M. A., H. L. Glansbeek, jt. 2002. *Protective Antiviral Immune Responses to Pseudorabies Virus Induced by DNA Vaccination Using Dimethyldioctadecylammonium Bromide as an Adjuvant.*" *J. Virol.* 76(20): 10540-10545.
- 25 Yamazaki S, K. K., Someya S, Azuma I, Yamamura Y. 1969. *Studies on the allergenicity of various tuberculoprotein derivatives and the adjuvanticity of wax D fractions of Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 100(5): 691-8.

## Patendinõudlus

1. Sünteetilise monomükolüülgütserooli (MMG), mis põhineb 8-36 süsiniku aatomiga alküülahelatel ja valikuliselt omab lipiidset saba, mille puhul igal lipiidset sabal on 0-3 kaksiksidet, kasutamine adjuvandi või immunomodulaatori valmistamiseks.  
5
2. Kasutamine vastavalt punktile 1, **mis erineb selle poolest, et** alküülahelal on 8-16 süsinikku.
3. Sünteetilise MMG või 8 kuni 36 süsiniku aatomiga alküülahelatel põhinevate modifitseeritud versioonide kasutamine vastavalt punktile 1 või 2, nagu on kujutatud joonisel 9.  
10
4. Adjuvant või immunomodulaator, mis **sisaldab** 8-36 süsiniku aatomiga alküülahelatel põhinevat monomükolüülgütserooli (MMG) ja valikuliselt lipiidset saba, mille puhul igal lipiidset sabal on 0-3 kaksiksidet.
5. Adjuvant või immunomodulaator vastavalt punktile 4, mis **sisaldab** lisaks surfaktanti.  
15
6. Adjuvant või immunomodulaator vastavalt punktile 5, **mis erineb selle poolest, et** surfaktant on dimetüüldioktadetsüülammooniumbromiid (DDA-B), dimetüüldioktadetsüülammooniumkloriid (DDA-C), dimetüüldioktadetsüülammooniumsulfaat-, -fosfaat- või -atsetaatsool, dimetüüldioktadetsenüülammooniumbromiid (DODA-B), dimetüüldioktadetsenüülammooniumkloriid (DODA-C), dimetüüldioktadetsenüülammooniumsulfaat, -fosfaat või -atsetaat, 1,2-dioleoüül-3-trimetüülammooniumpropan (DOTAP), 1,2-dimüristoüül-3-trimetüülammooniumpropan, 1,2-dipalmitoüül-3-trimetüülammooniumpropan, 1,2-distearoüül-3-trimetüülammooniumpropan (DODAP) ja N-[1-(2,3-dioleüülloksü)propüül]-N,N,N-trimetüülammoonium (DOTMA).  
20  
25
7. Adjuvant või immunomodulaator vastavalt punktile 5 kuni 7, mis **sisaldab** täiendavat immunomodulaatorit, mille puhul immunomodulaator on mitte-Tollisarnane retseptori (TLR) ligandid või TLR ligandid ja/või nende ükskõik milline analoog.

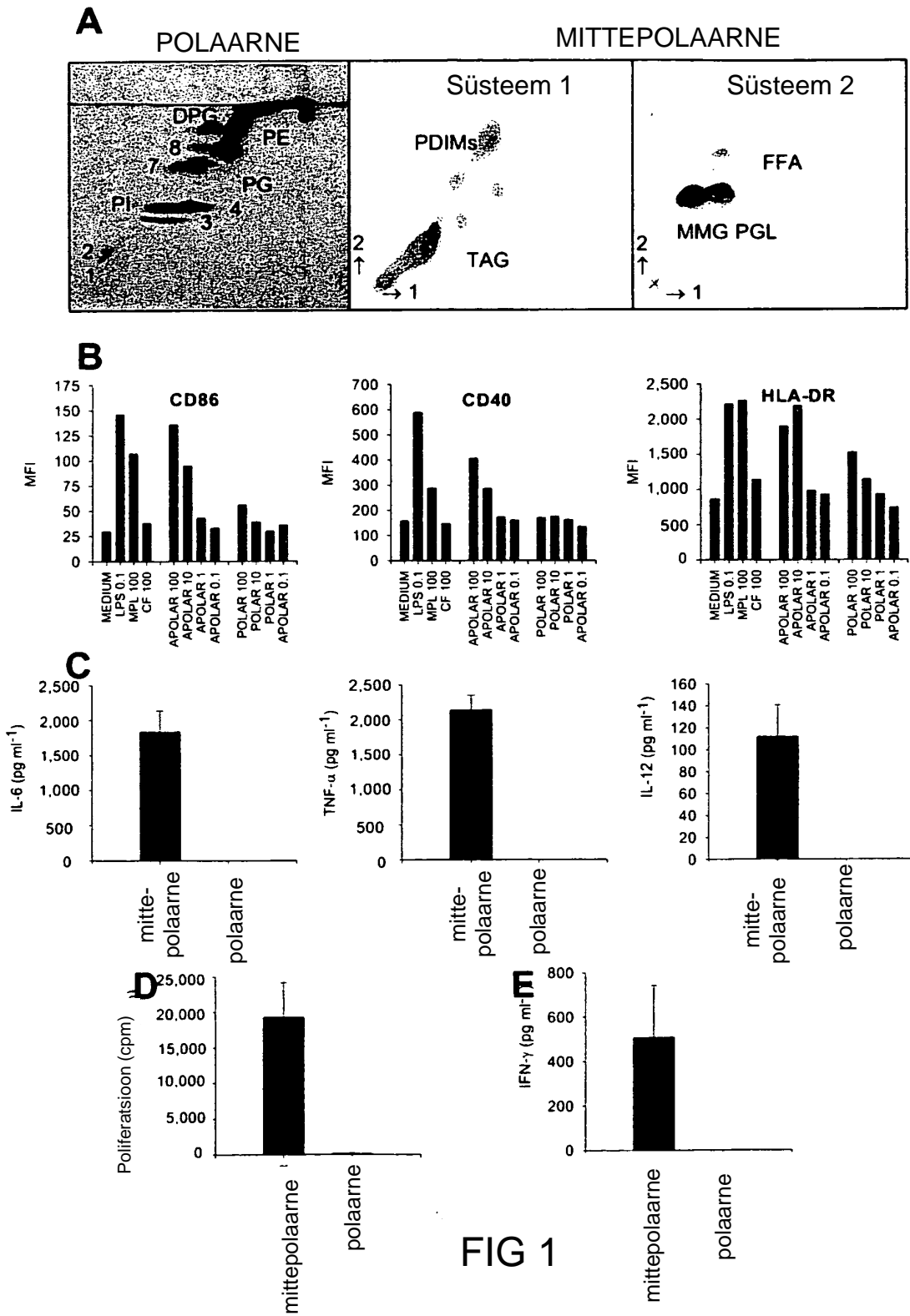
8. Adjuvant või immunomodulaator vastavalt punktile 7, **mis erineb selle poolest, et** mitte-Tolli-sarnase retseptori (TLR) ligand on alfa, alfa'-trehaloos 6,6'-dibehenaat (TDB) ja muramüüldipeptiid (MDP).
9. Adjuvant või immunomodulaator vastavalt punktile 7, **mis erineb selle poolest, et** TLR ligand on Polü I~:C.
10. 8-36 süsiniku aatomiga alküülahelatel põhinev sünteetiline MMG, millel on valikuliselt lipiidne saba, mille puhul igal lipiidisel sabal on 0-3 kaksiksidet.
11. Sünteetiline MMG analoog vastavalt punktile 10, millel on 8-16 süsinikku või kuni 36 süsinikku, nagu on kujutatud joonisel 9.
- 10 12. Vaktsiin, mis **sisaldab** punktile 4 kuni 7 vastavat adjuvanti või immunomodulaatorit, mida on sobilik manustada ükskõik millisel järgneval teel: parenteraalselt, oraalselt, mukoosselt, sublingvaalselt, transdermaalselt, toopiliselt, inhalatsiooni teel, intranasaalselt, aerosoolina, intraokulaarselt, intratrahheaalselt, intrarektaalselt, vaginaalselt, geenipüssiga, nahaplaatriga või
- 15 silmatilga või suuvee vormis.
13. Vaktsiin vastavalt punktile 12, **mis erineb selle poolest, et** antigeenne komponent sisaldab rakusisesest patogeenist pärinevat antigeenset epitoopi.
14. Vaktsiin vastavalt punktile 13, **mis erineb selle poolest, et** antigeenne komponent sisaldab virulentselt mükobakterilt pärinevat antigeenset epitoopi.
- 20 15. Vaktsiin vastavalt punktile 14, **mis erineb selle poolest, et** mükobakter valitakse järgmiste patogeenide hulgast: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* või *M. africanum*.
16. Vaktsiin vastavalt punktile 13, **mis erineb selle poolest, et** antigeenne komponent sisaldab *Plasmodium falciparum*'ilt, *Chlamydia trachomatis*'elt, HIV'ilt,
- 25 gripiviiruselt või B- või C-hepatiidi viirutselt pärinevat antigeenset epitoopi.
17. Vaktsiin vastavalt punktile 16, **mis erineb selle poolest, et** *Plasmodium falciparum*'ilt pärinev antigeenne epitop valitakse järgmiste epitopide hulgast: Msp1, Msp2, Msp3, Amal, GLURP, LSA1, LSA3 või CSP.

18. Vaktsiin vastavalt punktile 18, **mis erineb selle poolest, et *Chlamydia trachomatis***'elt pärinev antigeenne epitoop valitakse järgmiste epitoopide hulgast: CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 või C681.

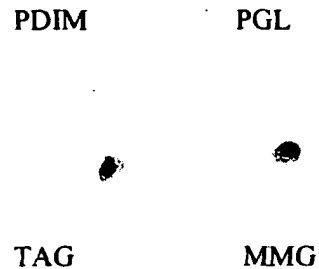
5 19. Vaktsiin vastavalt punktile 16 kuni 18 kasutamiseks kasvaja, autoimmuunse haiguse, närvihaiguste, Alzheimeri tõve, hingamisteede põletiku, põletikuliste haiguste, nakkushaiguste, nahahaiguste, allergia, astma või patogeeni poolt põhjustatud haiguse raviks.

10 20. Kohaletoimetamissüsteem, mis sisaldab punktile 4-7 vastavat adjuvanti või immunomodulaatorit, kasutamiseks kasvaja, autoimmuunse haiguse, närvihaiguste, Alzheimeri tõve, hingamisteede põletiku, põletikuliste haiguste, nakkushaiguste, nahahaiguste, allergia, astma või patogeeni poolt põhjustatud haiguse raviks.

15 21. Kohaletoimetamissüsteem vastavalt punktile 20, **mis erineb selle poolest, et sünteetilist MMG** manustatakse kombinatsioonis ühe või enama vaktsiini, antigeeni, antikeha, tsütotoksilise ühendi, allergeeni, antibiootikumi, antisenss-oligonukleotiidi, TLR ja mitte-TLR agonisti, TLR ja mitte-TLR antagonisti, peptiidi, valgu, geeniteraapia vektori, DNA-vaktsiini või kostimulatoorse molekuliga.



A



B

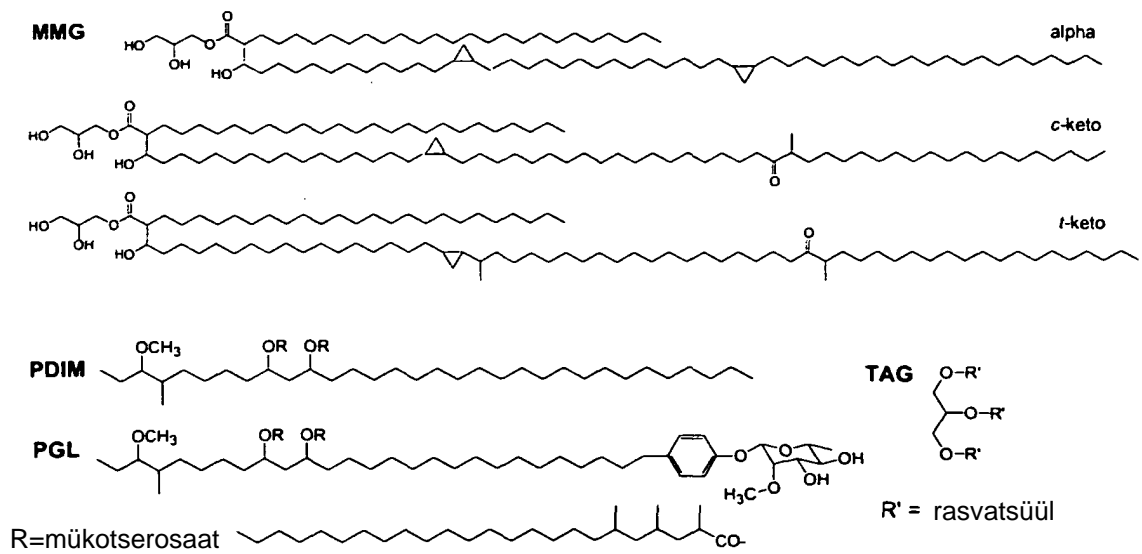


FIG 2



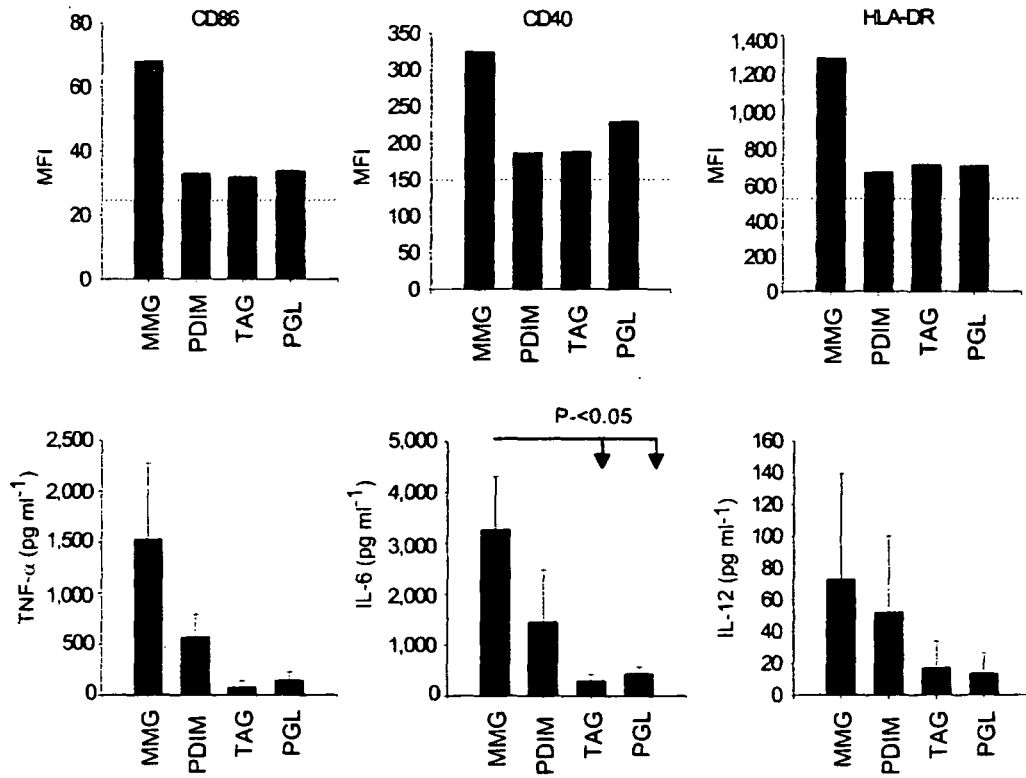


FIG 3

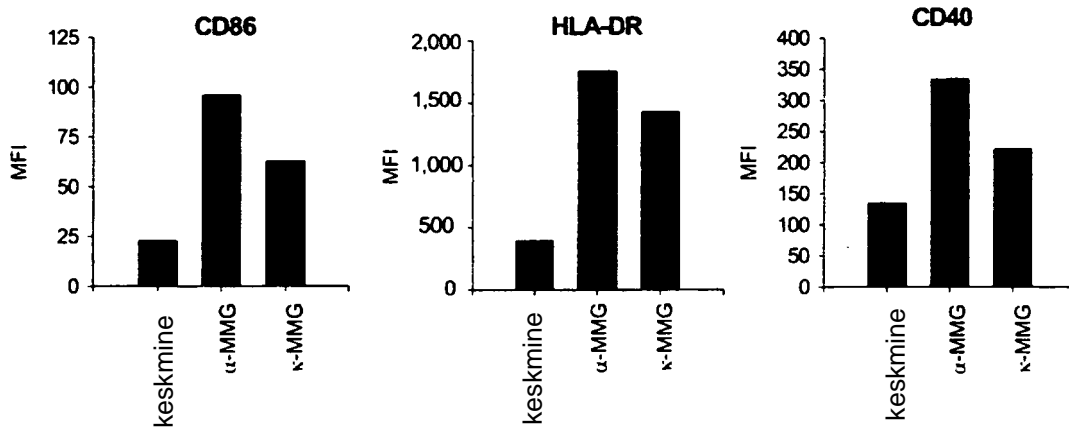


FIG 4

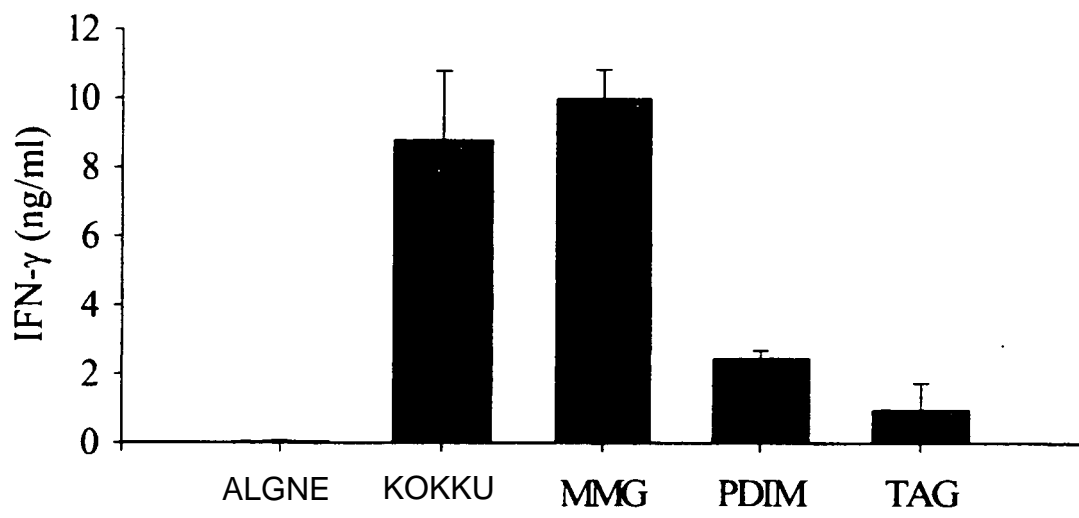


FIG 5

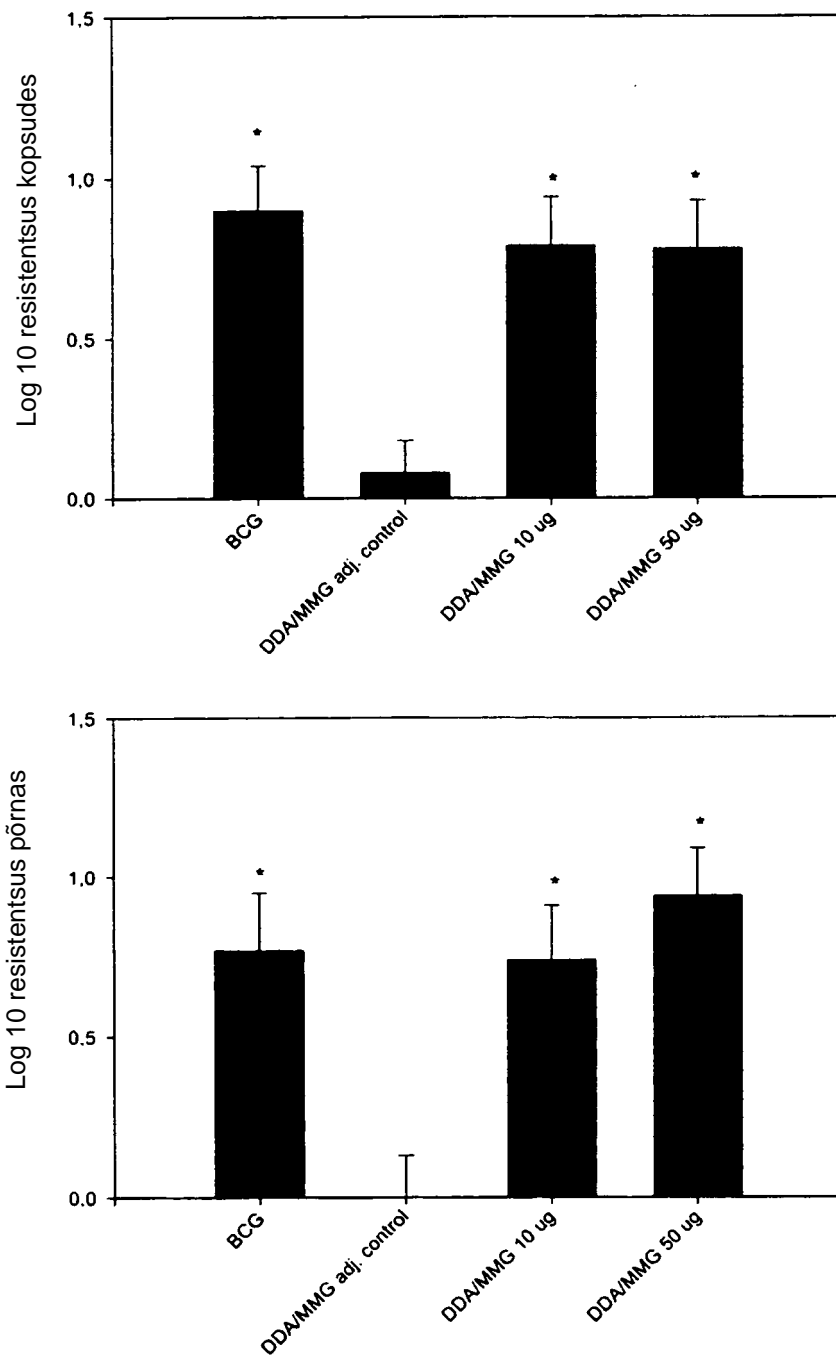


FIG 6

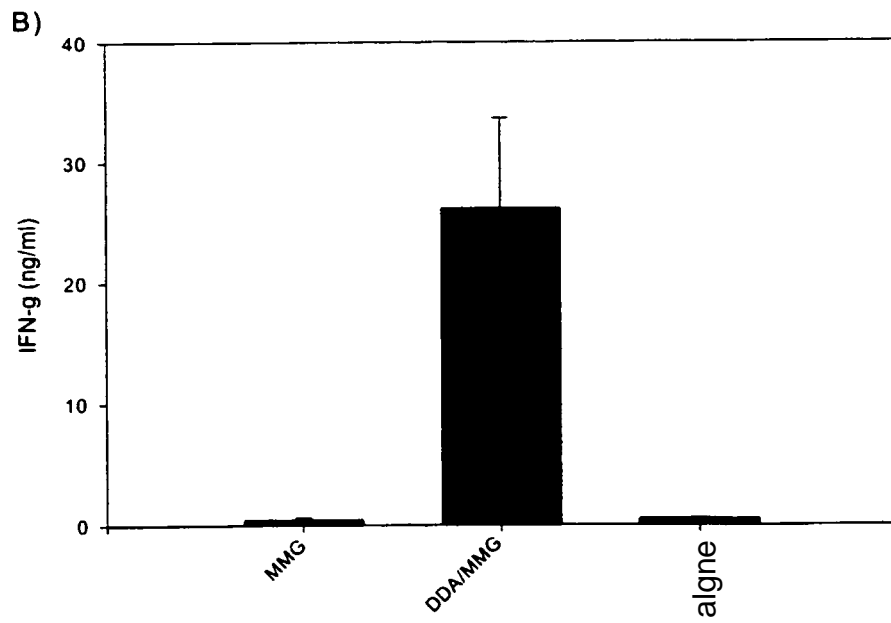
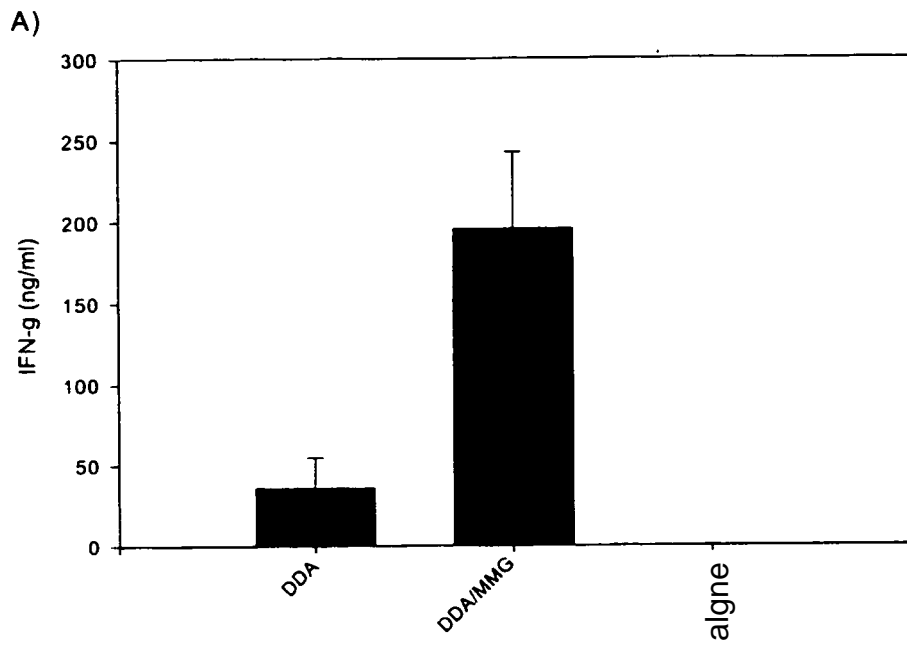


FIG 7

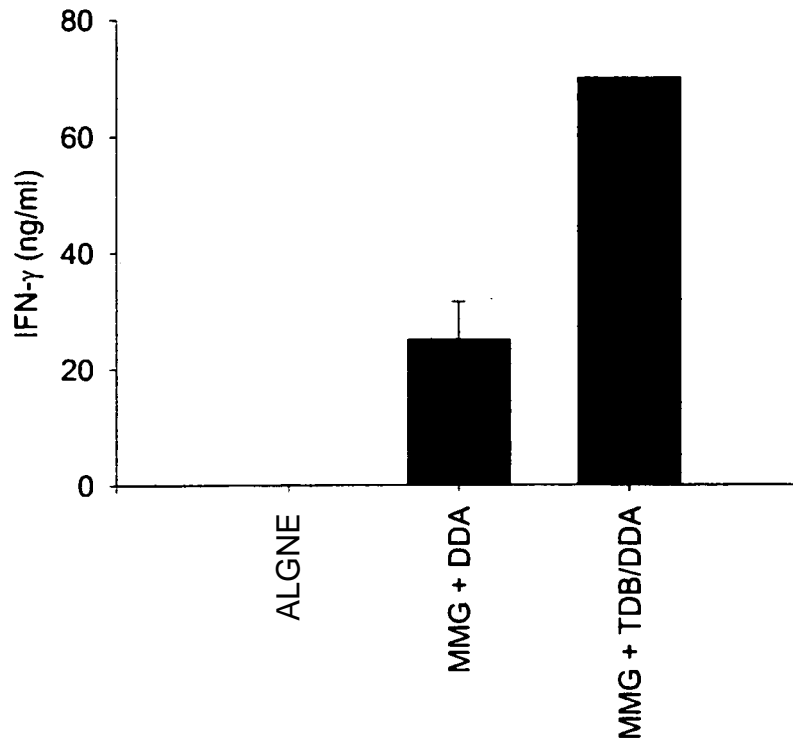


FIG 8

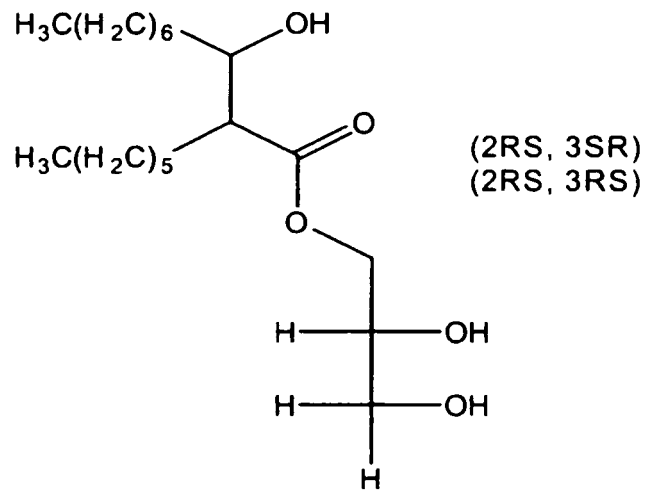
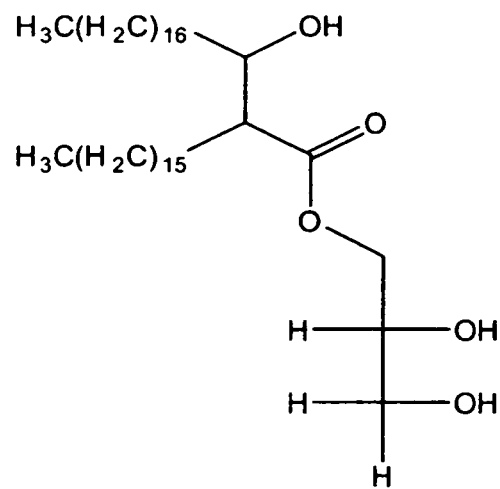
**C16****C36**

FIG 9

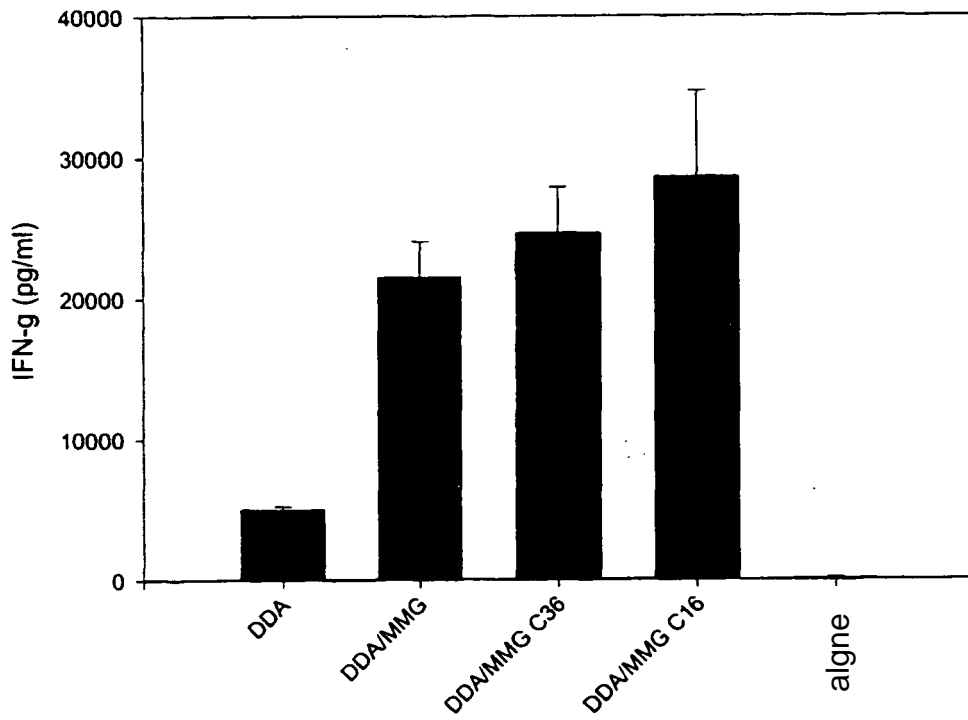


FIG 10



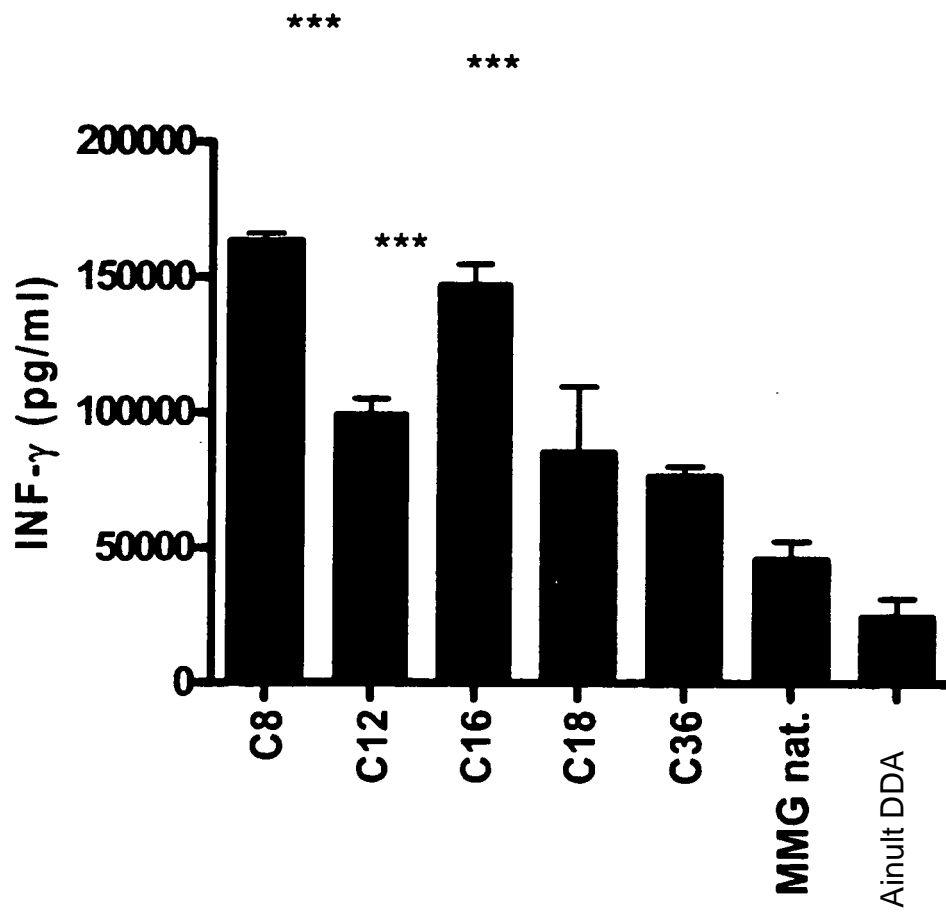


FIG 11