



(10) **DE 20 2006 021 242 U1** 2014.03.06

(12)

## Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **20 2006 021 242.6**

(22) Anmeldetag: **06.11.2006**

(47) Eintragungstag: **29.01.2014**

(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **06.03.2014**

(51) Int Cl.: **A61K 39/145 (2006.01)**

**A61K 39/39 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**60/734,026 04.11.2005 US**

**60/812,476 08.06.2006 US**

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:

**Uexküll & Stolberg, 22607, Hamburg, DE**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:

**Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l., Siena, IT**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Emulsionen mit freiem wässrigen Phasen Tensid als Adjuvans für Spalt-Grippeimpfstoffe**

(57) Hauptanspruch: Immunogene Zusammensetzung, die ein Spalt-Influenza-Virus und eine Öl-in-Wasser-Emulsion umfasst, welche ein Squalen enthält und Tröpfchen mit einem Submikron-Durchmesser aufweist, wobei die Emulsion in ihrer wässrigen Phase ein freies Tensid umfasst, und wobei die Zusammensetzung ein monovalenter Impfstoff ist.

**Beschreibung**

## TECHNISCHES GEBIET

**[0001]** Diese Erfindung betrifft das Gebiet der Impfstoffe zum Schutz vor einer Infektion mit dem Grippevirus und insbesondere jenes der Spaltimpfstoffe.

## STAND DER TECHNIK

**[0002]** Grippeimpfstoffe werden in Kapitel 17 und 18 des Referenzdokuments 1 beschrieben. Sie basieren auf lebenden Viren oder inaktivierten Viren, wobei inaktivierte Impfstoffe auf ganzen Viren, "gespaltenen" Viren oder gereinigten Oberflächenantigenen (darunter Hämagglutinin und Neuraminidase) beruhen können. Hämagglutinin (HA) ist das Hauptimmunogen in inaktivierten Grippeimpfstoffen, wobei die Impfstoffdosen bezüglich ihres HA-Gehalts standardisiert sind, wobei die Impfstoffe typischerweise etwa 15 µg HA pro Stamm enthalten.

**[0003]** Die "Spaltimpfstoffe" werden erzeugt, indem Virionen mit Detergenzien behandelt werden, um Subvirion-Zubereitungen herzustellen, wobei Verfahren wie z. B. das "Tween-Ether"-Spaltverfahren angewendet werden. Spaltimpfstoffe umfassen im Allgemeinen mehrere Antigene aus dem Grippe-Virion. Die Produkte BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ und FLUSHIELD™ sind Spaltimpfstoffe.

**[0004]** Während der Saison 2000/01 wurde in Kanada in Patienten, die Spaltimpfstoffe erhalten hatten, ein neu identifiziertes okulorespiratorisches Syndrom (ORS) beobachtet. Das ORS wurde mit einer unvollständigen Spaltung der Virionen während der Herstellung in Verbindung gebracht, wodurch Zusammensetzungen mit einem hohen Anteil von Mikroaggregaten aus ungespaltenen Virionen entstanden [2].

**[0005]** Es gibt keine kausale Erklärung des Zusammenhangs zwischen Spaltimpfstoffen und ORS, die klinischen und epidemiologischen Merkmale von ORS deuten jedoch auf eine Überempfindlichkeit hin, und daher wurde vermutet, dass der Impfstoff möglicherweise das natürliche TH1/Th2-Gleichgewicht stört, wobei partikelförmige ungespaltene Virionen eine Verschiebung hin zu einem Th2-Phänotyp verursachen könnten. Im Referenzdokument 3 wird zum Beispiel beschrieben, dass das Vorhandensein von Aggregaten in Spalt-Grippeimpfstoffen die Immunantwort in Richtung auf ein stärkeres Th2-Zytokin-Muster abändert. Im Referenzdokument 4 konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen ORS und dem TH1/Th2-Gleichgewicht gefunden werden.

**[0006]** In Situationen, in denen Grippeimpfstoffe mit großer Eile hergestellt werden müssen (z. B. während eines pandemischen Ausbruchs), könnte der Druck auf die Hersteller ungewollt zur Freigabe von Impfstoffen führen, die mit den gleichen Problemen behaftet sind wie die teilweise ungespaltenen, aggregierten kanadischen Chargen aus dem Jahr 2000/01. Tatsächlich heißt es im Referenzdokument 2, dass "es eventuell nicht möglich ist, ungespaltene Virionen und Aggregate zur Gänze zu eliminieren" und dass "ein gewisses geringes Risiko der Auslösung okularer und respiratorischer Symptome möglicherweise unvermeidlich ist".

**[0007]** Mit der Erfindung ist beabsichtigt, die Gefahr zu minimieren, dass ein Spalt-Grippeimpfstoff unter denselben Problemen leidet wie in Kanada in der Saison von 2000/01 gesehen wurden.

## Offenbarung der Erfindung

**[0008]** Die Erfindung wird dieser Zielstellung gerecht, indem ein Spalt-Influenzavirus-Impfstoff mit einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die in ihrer wässrigen Phase eine freie oberflächenaktive Substanz enthält, adjuvantiert wird. Die freie oberflächenaktive Substanz ist in der Lage, eine weitere „spaltende Wirkung“ auf das Antigen auszuüben, wodurch die noch vorhandenen, nicht gespaltenen Viruspartikel und/oder Viruspartikelaggregate gespalten werden. Obgleich zu erwarten ist, dass die freie oberflächenaktive Substanz mit der Zeit eine denaturierende Wirkung auf die Membranglykoproteine wie das wichtige HA-Antigen ausübt, dürfte die für einen typischen Influenza-Impfstoff erforderliche kurze Haltbarkeitsdauer jedoch bewirken, dass dieser Umstand in der Praxis keine Probleme verursacht.

**[0009]** Somit betrifft die Erfindung eine immunogene Zubereitung, die ein Spalt-Influenzavirus-Antigen und eine Öl-in-Wasser-Emulsion enthält, die wiederum in ihrer wässrigen Phase eine freie oberflächenaktive Substanz enthält.

**[0010]** Auch bezieht sich die Erfindung auf eine Methode zur Herstellung einer immunogenen Zubereitung, die die Schritte zur Kombination eines (i) Spalt-Influenzavirus-Antigens mit (ii) einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die in ihrer wässrigen Phase eine freie oberflächenaktive Substanz enthält, umfasst.

**[0011]** Die Erfindung betrifft ferner ein Kit, das Folgendes umfasst: (i) eine erste Kitkomponente, die ein Spalt-Influenzavirus-Antigen enthält, und (ii) eine zweite Kitkomponente, die eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit einer freien oberflächenaktiven Substanz in ihrer wässrigen Phase enthält.

**[0012]** Obgleich gegenwärtig keine adjuvantierten Spalt-Influenza-Impfstoffe auf dem Markt angeboten werden, gibt es mehrere Vorschläge für die Kombination von Adjuvantien mit Influenza-Impfstoffen, um auf diese Weise aus einer bestimmten Antigenmenge eine größere Menge an Impfstoffdosen herstellen zu können. In den Literaturhinweisen 5 bis 8 wird zum Beispiel die Verwendung von Aluminiumsalzen in adjuvantierten Ganzpartikel-Influenza-Impfstoffen beschrieben. Die Erfindung vermeidet hingegen die Verwendung von Aluminiumsalzen als alleiniges Adjuvans bei Spalt-Impfstoffen, da sie bei alleiniger Verwendung eine Immunreaktion des Typs Th2 fördern, was der Ausbruch des oculo-respiratorischen Syndroms (ORS) in Kanada gezeigt hat (siehe oben).

### Das Spalt-Grippevirus Antigen

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfassen ein Antigen, das durch die Spaltung von Grippe-Virionen hergestellt wird. Das Spalt-Virion umfasst typischerweise mehrere Antigene aus dem Grippe-Virion, darunter Hämagglutinin, Neuraminidase, Matrix und Nucleoprotein. Die Erfindung schließt Folgendes nicht ein: Lebendvirenimpfstoffe (wie z. B. das Produkt FLUMIST™), inaktivierte Impfstoffe aus vollständigen Virionen (wie z. B. das Produkt INFLEXAL™), Impfstoffe aus gereinigten Oberflächenantigenen (die nur die Oberflächen-Glycoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase umfassen, wie z. B. die Produkte FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ und INFLUVAC™) oder virosomale Impfstoffe (die die Form nukleinsäurefreier virenähnlicher liposomaler Partikel aufweisen [9], wie z. B. die Produkte INFLEXAL V™ und INVAVAC™).

**[0014]** Die Virionen können durch verschiedene Verfahren aus virenhaltigen Flüssigkeiten geerntet werden. Das Reinigungsverfahren kann zum Beispiel eine Zonenzentrifugation in einer Lösung mit einem linearen Saccharosegradienten umfassen, wobei ein Detergens verwendet wird, um die Virionen aufzubrechen.

**[0015]** Spalt-Virionen können hergestellt werden, indem gereinigte Virionen mit Detergenzien behandelt werden (z. B. Ethylether, Polysorbat 80, Deoxycholat, Tri-N-butylphosphat, Triton X-100, Triton N101, Cetyltrimethylammoniumbromid, Tergitol NP9 usw.), um Subvirionpräparate herzustellen, z. B. auch mittels des "Tween-Ether"-Spaltverfahrens. Verfahren zum Spalten von Grippeviren sind im Fachgebiet gut bekannt, siehe z. B. Ref. 10–15 usw. Die Spaltung des Virus wird typischerweise durchgeführt, indem ganze Viren, seien es infektiöse oder nichtinfektiöse, mit einer zum Aufbrechen ausreichenden Konzentration eines Spaltmittels aufgebrochen oder fragmentiert werden. Das Aufbrechen führt zu einer vollständigen oder teilweisen Solubilisierung der Virusproteine, wodurch die Integrität des Virus verändert wird. Bevorzugte Spaltmittel sind nichtionische und ionische (z. B. kationische) Tenside, z. B. Alkylglycoside, Alkylthioglycoside, Acylzucker, Sulphobetaine, Betaine, Polyoxyethylenalkylether, N,N-Dialkylglucamide, Hecameg, Alkylphenoxy-polyethoxyethanole, quaternäre Ammoniumverbindungen, Sarcosyl, CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide), Tri-N-butyl-phosphat, Cetavlon, Myristyltrimethylammoniumsalze, Lipofectin, Lipofectamin und DOT-MA, Octyl- oder Nonyl-phenoxy-polyoxyethanole (z. B. Triton-Tenside wie z. B. Triton X-100 oder Triton N101), Polyoxyethylensorbitanes-ter (die Tween-Tenside), Polyoxyethylenether, Polyoxyethylenester usw. Ein geeignetes Spaltverfahren nutzt die aufeinanderfolgenden Wirkungen von Natriumdeoxycholat und Formaldehyd, wobei die Spaltung während der anfänglichen Reinigung der Virionen erfolgen kann (z. B. in einer Lösung mit Saccharosedichtegradient). Spalt-Virionen können auf geeignete Weise in natriumphosphatgepufferter isotoner Natriumchloridlösung resuspendiert werden.

**[0016]** Das Grippevirus kann abgeschwächt sein. Das Grippevirus kann temperaturempfindlich sein. Das Grippevirus kann an die Kälte angepasst sein.

**[0017]** Die in den Impfstoffen verwendeten Grippevirusstämme ändern sich von Saison zu Saison. In dem gegenwärtigen interpandemischen Zeitraum sind trivalente Impfstoffe typisch, die zwei Influenza A-Stämme (H1N1 und H3N2) und einen Influenza B-Stamm enthalten. Die Erfindung kann mit interpandemischen Stämmen dieses Typs, aber auch mit Viren von pandemischen Stämmen verwendet werden (d. h. Stämmen, gegen die der Impfstoffempfänger und die allgemeine menschliche Bevölkerung immunologisch naiv sind), wie z. B. Stämmen vom Subtyp H2, H5, H7 oder H9 (insbesondere des Influenza A-Virus), wobei Grippeimpfstoffe für

pandemische Stämme monovalent sein können oder zum Beispiel auf einem normalen trivalenten Impfstoff basieren können, der durch einen pandemischen Stamm ergänzt wurde. Abhängig von der Saison und der Art des in dem Impfstoff enthaltenen Antigens kann die Erfindung jedoch gegen einen oder mehrere HA-Subtypen des Influenza A-Virus, nämlich H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 oder H16 schützen. Die Erfindung kann gegen einen oder mehrere NA-Subtypen des Influenza A-Virus, nämlich N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 oder N9 schützen.

**[0018]** Die Erfindung ist geeignet zur Immunisierung gegen interpandemische Stämme, die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind jedoch besonders nützlich zur Immunisierung gegen pandemische Stämme. Die Eigenschaften eines Influenzastamms, der das Potential besitzt, einen pandemischen Ausbruch zu verursachen, sind folgende: (a) Er enthält ein HA, das im Vergleich zu dem HA in den gegenwärtig zirkulierenden humanen Stämmen neu ist, d. h. das in der menschlichen Bevölkerung mehr als ein Jahrzehnt lang nicht nachgewiesen wurde (z. B. H2), oder das in der menschlichen Bevölkerung bisher noch nie beobachtet wurde (z. B. H5, H6 oder H9, die im Allgemeinen nur in Vogelpopulationen nachgewiesen wurden), so dass die menschliche Bevölkerung gegenüber dem HA des Stamms immunologisch naiv ist; (b) es kann in der menschlichen Bevölkerung horizontal übertragen werden; und (c) es ist für Menschen pathogen. Ein Virus mit dem Hämagglutininotyp H5 wird bei der Immunisierung gegen pandemische Grippe, wie z. B. einen H5N1-Stamm, bevorzugt. Andere mögliche Stämme sind H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 und H7N7 sowie alle anderen auftretenden, potentiell pandemischen Stämme. Innerhalb des H5-Subtyps kann ein Virus zur HA-Klade 1, HA-Klade 1', HA-Klade 2 oder HA-Klade 3 [16] gehören, wobei die Klade 1 und 3 besonders relevant sind.

**[0019]** Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Grippevirusstämme können gegenüber einer antiviralen Behandlung resistent sein (z. B. resistent gegen Oseltamivir [17] und/oder Zanamivir), wobei auch resistente pandemische Stämme inbegriffen sind [18].

**[0020]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können (ein) Antigen(e) von einem oder mehreren (z. B. 1, 2, 3, 4 oder mehr) Grippevirusstämmen enthalten, einschließlich des Influenza A-Virus und/oder Influenza B-Virus. Wenn ein Impfstoff mehr als einen Influenzastamm enthält, werden die verschiedenen Stämme typischerweise separat gezüchtet und gemischt, nachdem die Viren geerntet und gespalten wurden. Ein Verfahren gemäß der Offenbarung kann somit den Schritt des Mischen gespaltenen Antigene von mehr als einem Influenzastamm umfassen. Bevorzugt wird ein trivalenter Impfstoff, der zwei Influenza A-Virusstämme und einen Influenza B-Virusstamm enthält.

**[0021]** In einigen Ausführungsformen der Erfindung können die Zusammensetzungen Antigene von einem einzigen Influenza A-Stamm enthalten. In einigen Ausführungsformen können die Zusammensetzungen Antigene von zwei Influenza-A-Stämmen enthalten, sofern diese zwei Stämme nicht H1N1 und H3N2 sind. In einigen Ausführungsformen können die Zusammensetzungen Antigene von mehr als zwei Influenza-A-Stämmen enthalten.

**[0022]** Das Grippevirus kann ein reassortanter Stamm sein und durch reverse Gentechnik hergestellt worden sein. Mittels reverser Gentechnik [z. B. 19–23] können Grippeviren mit den gewünschten Genomsegmenten in vitro mit Hilfe von Plasmiden hergestellt werden. Typischerweise umfasst dies die Expression (a) von DNA-Molekülen, die die gewünschten viralen RNA-Moleküle z. B. von polI-Promotern codieren, und (b) DNA-Moleküle, die virale Proteine z. B. von polII-Promotern codieren, so dass die Expression beider Typen von DNA in einer Zelle zum Zusammenbau eines vollständigen, intakten infektiösen Virions führt. Die DNA liefert vorzugsweise die Gesamtheit der viralen RNA und Proteine, es ist jedoch auch möglich, ein Helfervirus zu verwenden, um einen Teil der RNA und Proteine zu liefern. Plasmidbasierte Verfahren, die separate Plasmide zur Herstellung jeder viralen RNA verwenden, werden bevorzugt [24–26], wobei diese Verfahren auch die Verwendung von Plasmiden umfassen, um alle oder einige (z. B. nur die Proteine PB1, PB2, PA und NP) der viralen Proteine zu exprimieren, wobei in einigen Verfahren 12 Plasmide verwendet werden.

**[0023]** Um die Anzahl der benötigten Plasmide zu senken, kombiniert ein neues Verfahren [27] eine Vielzahl von RNA-Polymerase I-Transkriptionskassetten (für die Synthese der viralen RNA) auf dem gleichen Plasmid (z. B. die Sequenzen, die 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder alle 8 vRNA-Segmente von Influenza A codieren), und eine Vielzahl von proteincodierenden Regionen mit RNA-Polymerase II-Promotern auf einem anderen Plasmid (z. B. die Sequenzen, die 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder alle 8 mRNA-Transkripte von Influenza A codieren). Bevorzugte Aspekte des Verfahrens des Referenzdokuments 24 umfassen: (a) PB1-, PB2- und PA-mRNA-codierende Regionen auf einem einzigen Plasmid und (b) alle 8 vRNA-codierenden Segmente auf einem einzigen Plasmid. Die Verwendung von NA- und HA-Segmenten auf einem Plasmid und von sechs anderen Segmenten auf einem anderen Plasmid kann die Aufgabe ebenfalls erleichtern.

**[0024]** Als Alternative zur Verwendung von Poll-Promotern zur Codierung viraler RNA-Segmente ist es möglich, Bakteriophagen-Polymerase-Promoter zu verwenden [28]. Auf geeignete Weise können zum Beispiel Promoter für die SP6-, T3- oder T7-Polymerasen verwendet werden. Aufgrund der Speziespezifität von Poll-Promotern können Bakteriophagen-Polymerase-Promoter für viele Zelltypen (z. B. MDCK) geeigneter sein, obwohl eine Zelle auch mit einem Plasmid transfiziert werden muss, das das exogene Polymeraseenzym codiert.

**[0025]** Bei anderen Techniken ist es möglich, duale Pol- und PolII-Promoter zu verwenden, um virale RNA und exprimierbare mRNA von einem einzigen Template gleichzeitig zu codieren [29, 30].

**[0026]** Auf diese Weise kann ein Influenza A-Virus ein oder mehrere RNA-Segmente eines A/PR/8/34-Virus enthalten (typischerweise 6 Segmente von A/PR/8/34, wobei die HA- und NA-Segmente von einem Impfstoffstamm stammen, es handelt sich somit um eine 6:2-Reassortante), besonders wenn die Viren in Eiern vermehrt werden. Es kann auch ein oder mehrere RNA-Segmente von einem A/WSN/33-Virus oder von jeglichem anderen Virusstamm enthalten, der geeignet ist, reassortante Viren zur Impfstoffherstellung zu erzeugen. Typischerweise schützt die erfindungsgemäße Zusammensetzung gegen einen Stamm, der von Mensch zu Mensch übertragen werden kann, und daher enthält das Genom des Stamms gewöhnlich mindestens ein RNA-Segment, aus einem Säugetier stammt (z. B. einem menschlichen) Grippevirus. Es kann ein NS-Segment enthalten, das aus einem Vogelgrippevirus stammt.

**[0027]** Die als Antigenquelle verwendeten Viren werden aus Eiern oder Zellkulturen gewonnen. Bei der heute üblicherweise angewandten Methode der Gewinnung von Influenzaviren werden spezielle pathogenfreie (SPF) befruchtete Hühnereier verwendet, wobei das Virus vom Inhalt des Eis (Allantois-Flüssigkeit) getrennt und gereinigt wird. In jüngster Zeit werden Viren jedoch aus tierischen Zellkulturen gewonnen, und diese Methode wird aufgrund des geringeren Zeitaufwands und zur Vermeidung von Patientenallergien bevorzugt. Werden Eier zur Vermehrung der Viren verwendet, können der Allantois-Flüssigkeit zusammen mit dem Virus eine oder mehrere Aminosäuren zugegeben werden [15].

**[0028]** Wenn Zellkultur genutzt wird ist Substrat für das Virenwachstum typischerweise eine aus einem Säugetier stammende Zelllinie. Geeignete ursprüngliche Säugetierzellen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Zellen von Hamstern, Rindern, Primaten (einschließlich Menschen und Affen) und Hunden. Es können verschiedene Zelltypen verwendet werden, wie z. B. Nierenzellen, Fibroblasten, Netzhautzellen, Lungenzellen usw. Beispiele für geeignete Hamsterzellen sind die Zelllinien mit der Bezeichnung BHK21 oder HKCC. Geeignete Affenzellen sind z. B. Zellen der afrikanischen grünen Meerkatze, z. B. Nierenzellen der Zelllinie Vero. Geeignete Hundezellen sind z. B. Nierenzellen, wie z. B. die Zelllinie MDCK. Geeignete Zelllinien umfassen somit, ohne darauf beschränkt zu sein: MDCK, CHO, 293T, BHK, Vero, MRC-5, PER.C6, WI-38 usw. Bevorzugte Säugetier-Zelllinien zur Züchtung von Grippeviren umfassen: MDCK-Zellen [31–34], die aus einer Hundeniere (Madin Darby Canine Kidney) abgeleitet sind, Vero-Zellen [35–37], die von der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) abgeleitet sind, oder PER.C6-Zellen [38], die von menschlichen embryonalen Retinoblasten abgeleitet sind. Diese Zelllinien sind allgemein erhältlich, z. B. bei der Sammlung American Type Cell Culture (ATCC) [39], von den Coriell Cell Repositories [40] oder von der European Collection of Cell Cultures (ECACC). Die ATCC bietet zum Beispiel verschiedene Vero-Zellen unter den Katalognummern CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 und CRL-1587 und MDCK-Zellen unter der Katalognummer CCL-34 an. PER.C6 ist bei der ECACC unter der Hinterlegungsnummer 96022940 erhältlich. Als eine weniger bevorzugte Alternative zu Säugetier-Zelllinien können die Viren auf Vogelzelllinien gezüchtet werden [z. B. Ref. 41–43], darunter auf Zelllinien, die von Enten (z. B. Netzhaut der Ente) oder Hühnern stammen, wie z. B. Hühnerembryo-Fibroblasten (Chicken Embryo Fibroblasts, CEF), usw. Beispiele sind auch embryonale Vogelstammzellen [41, 44], darunter die von Hühnerembryo-Stammzellen abgeleitete EBx-Zelllinie, d. h. EB45, EB14 und EB14-074 [45].

**[0029]** Die am stärksten bevorzugten Zelllinien zur Züchtung von Grippeviren sind MDCK-Zelllinien. Die originale MDCK-Zelllinie ist bei der ATCC als CCL-34 erhältlich, es können jedoch auch Derivate dieser Zelllinie verwendet werden. Das Referenzdokument 31 offenbart zum Beispiel eine MDCK-Zelllinie, die an die Züchtung in einer Suspensionskultur adaptiert wurde ("MDCK 33016", hinterlegt als DSM ACC 2219). Auf ähnliche Weise offenbart das Referenzdokument 46 eine von MDCK abgeleitete Zelllinie, die in Suspension in serumfreier Kultur wächst ("B-702", hinterlegt als FERM BP-7449). Das Referenzdokument 47 offenbart nichttumorigene MDCK-Zellen, darunter "MDCK-S" (ATCC PTA-6500), "MDCK-SF101" (ATCC PTA-6501), "MDCK-SF102" (ATCC PTA-6502) und "MDCK-SF103" (PTA-6503). Das Referenzdokument 48 offenbart MDCK-Zelllinien mit hoher Infektanfälligkeit, darunter "MDCK.5F1"-Zellen (ATCC CRL-12042). Es können alle diese MDCK-Zelllinien verwendet werden.

**[0030]** Für das Wachstum auf einer Zelllinie, wie MDCK Zellen, können Viren auf Zellen in Suspension [31, 49, 50] oder in anhaftender Kultur gezüchtet werden. Eine geeignete MDCK-Zelllinie für die Suspensionskultur ist MDCK 33016 (hinterlegt als DSM ACC 2219). Als Alternative kann eine Mikroträgerkultur verwendet werden.

**[0031]** Zelllinien, die die Replikation von Grippeviren unterstützen, werden vorzugsweise in serumfreien Kulturmedien und/oder proteinfreien Medien gezüchtet. Ein Medium wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung als serumfreies Medium bezeichnet, wenn keine Zusätze aus Seren menschlichen oder tierischen Ursprungs vorhanden sind. Als proteinfrei werden Kulturen bezeichnet, in denen die Multiplikation der Zellen unter Ausschluss von Proteinen, Wachstumsfaktoren, anderen Proteinzusätzen und Nichtserumproteinen erfolgt, sie können jedoch optional Proteine wie z. B. Trypsin oder andere Proteasen enthalten, die für das Viruswachstum notwendig sein können. Die in solchen Kulturen wachsenden Zellen enthalten von Natur aus selbst Proteine.

**[0032]** Zelllinien, die die Replikation des Grippevirus unterstützen, werden vorzugsweise unter 37°C gezüchtet [51], z. B. bei 30–36°C, oder bei ungefähr 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C), zum Beispiel während der Virusreplikation.

**[0033]** Wo der Virus auf einer Zelllinie gewachsen wird ist die für die Züchtung verwendete Zellkultur und auch das zum Start der Kultur verwendete virale Inokulum vorzugsweise frei von folgenden Viren (d. h. es wurde darauf getestet und hat ein negatives Ergebnis hinsichtlich einer Kontamination durch sie ergeben): Herpes simplex-Virus, Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenzavirus 3, SARS-Coronavirus, Adenovirus, Rhinovirus, Reoviren, Polyomaviren, Birnaviren, Circoviren und/oder Parvoviren [52]. Die Abwesenheit von Herpes simplex-Viren wird besonders bevorzugt.

**[0034]** Wo der Virus auf einer Säugerzelllinie gewachsen wurde ist der Impfstoff vorzugsweise frei von Eierproteinen (z. B. Ovalbumin und Ovomuroid) und von Hühner DNA wodurch Allergenität reduziert wird. Das Vermeiden von Allergenen ist ein weiterer Weg zur Minimierung von Th2-Antworten.

**[0035]** Wo der Virus auf einer Zelllinie gewachsen wird enthält der Impfstoff vorzugsweise weniger als 10 ng (vorzugsweise weniger als 1 ng und insbesondere weniger als 100 pg) an restlicher Wirtszell-DNA pro Dosis, obwohl Spuren Mengen an Wirtszell-DNA vorhanden sein können. Was die Wirtszell-DNA betrifft, die auf wünschenswerte Weise von den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ausgeschlossen wird, so ist dies DNA, die länger als 100 bp ist.

**[0036]** Die Messung der restlichen Wirtszell-DNA ist heute eine routinemäßige regulatorische Anforderung an Biologicals und gehört zu den normalen Fähigkeiten des Fachmanns. Der Assay zur Messung der DNA ist typischerweise ein validierter Assay [53, 54]. Die Leistungsmerkmale eines validierten Assays können in mathematischen und quantifizierbaren Termini beschrieben werden, wobei mögliche Fehlerquellen anzugeben sind. Der Assay wurde im Allgemeinen im Hinblick auf Merkmale wie z. B. Richtigkeit, Genauigkeit und Spezifität getestet. Nachdem ein Assay kalibriert (z. B. gegen bekannte Standardmengen von Wirtszell-DNA) und getestet wurde, können die quantitativen DNA-Messungen routinemäßig durchgeführt werden. Es können drei grundlegende Techniken für die DNA-Quantifizierung verwendet werden: Hybridisierungsverfahren wie z. B. Southern Blots oder Slot Blots [55], Immunassayverfahren wie z. B. das Threshold™-System [56] und quantitative PCR [57]. Alle diese Verfahren sind dem Fachmann vertraut, obwohl die genauen Merkmale jedes Verfahrens, z. B. die Auswahl der Sonden für die Hybridisierung, die Auswahl der Primer und/oder Sonden für die Amplifikation usw., von der fraglichen Wirtszelle abhängen. Das System Threshold™ von Molecular Devices ist ein quantitativer Assay für Picogramm-Mengen an Gesamt-DNA und wird verwendet, um die Mengen an kontaminierender DNA in Biopharmazeutika zu messen [56]. Ein typischer Assay umfasst die nichtsequenzspezifische Bildung eines Reaktionskomplexes zwischen einem biotinylierten ssDNA-Bindungsprotein, einem ureasekonjugierten Anti-ssDNA-Antikörper und DNA. Alle Assaykomponenten sind in dem beim Hersteller erhältlichen kompletten Total DNA Assay Kit enthalten. Verschiedene kommerzielle Hersteller bieten quantitative PCR-Assays zum Nachweis restlicher Wirtszell-DNA an, z. B. AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies usw. Ein Vergleich zwischen einem chemilumineszenten Hybridisierungsassay und dem Gesamt-DNA-Threshold™-System zur Messung der Kontamination eines viralen Impfstoffs für den Menschen mit Wirtszell-DNA ist im Referenzdokument 58 zu finden.

**[0037]** Die kontaminierende DNA kann während der Impfstoffherstellung mit Hilfe von Standardreinigungsverfahren wie z. B. Chromatographie usw. entfernt werden. Die Entfernung von restlicher Wirtszell-DNA kann durch Nukleasebehandlung verstärkt werden, wobei z. B. eine DNase verwendet wird. Ein praktisches Verfahren zur Senkung der Kontamination mit Wirtszell-DNA wird in den Referenzdokumenten 59 und 60 offenbart

und umfasst eine zweistufige Behandlung, wobei folgendes angewendet wird: zuerst eine DNase (z. B. Benzonase), die eventuell während des Virenwachstums verwendet wurde, und anschließend ein kationisches Detergens (z. B. CTAB), das während des Aufbrechens der Virionen verwendet wurde. Es kann auch eine Behandlung mit einem Alkylierungsmittel wie z. B.  $\beta$ -Propiolacton erfolgen, um die Wirtszell-DNA zu entfernen, wobei dies vorteilhafterweise auch zur Inaktivierung der Virionen verwendet werden kann [61].

**[0038]** Impfstoffe, die  $< 10$  ng (z. B.  $< 1$  ng,  $< 100$  pg) Wirtszell-DNA pro  $15 \mu\text{g}$  Hämagglutinin enthalten, werden bevorzugt, ebenso wie Impfstoffe, die  $< 10$  ng (z. B.  $< 1$  ng,  $< 100$  pg) Wirtszell-DNA pro  $0,25$  ml Volumen enthalten. Impfstoffe, die  $< 10$  ng (z. B.  $< 1$  ng,  $< 100$  pg) Wirtszell-DNA pro  $50 \mu\text{g}$  Hämagglutinin enthalten, werden stärker bevorzugt, ebenso wie Impfstoffe, die  $< 10$  ng (z. B.  $< 1$  ng,  $< 100$  pg) Wirtszell-DNA pro  $0,5$  ml Volumen enthalten.

**[0039]** Das Verfahren zur Vermehrung des Virus in den gezüchteten Zellen umfasst die Schritte der Inokulation der kultivierten Zellen mit dem zu züchtenden Stamm, des Kultivierens der infizierten Zellen während eines gewünschten Zeitraums zur Virusvermehrung, der z. B. durch den Virustiter oder die Antigenexpression bestimmt wird (z. B. zwischen 24 und 168 Stunden nach der Inokulation), und des Sammelns der vermehrten Viren. Die kultivierten Zellen werden mit einem Virus (gemessen durch PFU oder TCID<sub>50</sub>) mit einem Zellverhältnis von 1:500 bis 1:1, vorzugsweise 1:100 bis 1:5, insbesondere 1:50 bis 1:10 inokuliert. Das Virus wird einer Suspension der Zellen zugesetzt oder auf einen einschichtigen Zellrasen aufgebracht, wobei das Virus während mindestens 60 Minuten, in der Regel jedoch weniger als 300 Minuten, vorzugsweise zwischen 90 und 240 Minuten bei  $25^{\circ}\text{C}$  bis  $40^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise  $28^{\circ}\text{C}$  bis  $37^{\circ}\text{C}$  adsorbiert wird. Die infizierte Zellkultur (z. B. einschichtiger Zellrasen) kann durch Gefrieren und Auftauen oder durch enzymatische Wirkung entfernt werden, um den Virusgehalt der geernteten Kulturüberstände zu erhöhen. Die geernteten Flüssigkeiten werden anschließend entweder inaktiviert oder im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Die kultivierten Zellen können mit einer Multiplicity of Infektion ("m. o. i.") von etwa 0,0001 bis 10, vorzugsweise 0,002 bis 5, insbesondere 0,001 bis 2 infiziert werden. Noch besser werden die Zellen mit einer m. o. i. von etwa 0,01 infiziert. Die infizierten Zellen können 30 bis 60 Stunden nach der Infektion geerntet werden. Vorzugsweise werden die Zellen 34 bis 48 Stunden nach der Infektion geerntet. Insbesondere werden die Zellen 38 bis 40 Stunden nach der Infektion geerntet. Im Allgemeinen werden während der Zellkultur Proteasen (typischerweise Trypsin) zugesetzt, um die Freisetzung der Viren zu ermöglichen, wobei die Proteasen in jedem geeigneten Stadium während der Kultur hinzugefügt werden können.

**[0040]** Hämagglutinin (HA) ist das Hauptimmunogen in inaktivierten Grippeimpfstoffen, einschließlich Spaltimpfstoffen, wobei die Impfstoffdosen bezüglich ihres HA-Gehalts standardisiert sind, der typischerweise durch einfache radiale Immundiffusion (Single Radial Immundiffusion, SRID) gemessen wird. Existierende Spaltimpfstoffe enthalten typischerweise etwa  $15 \mu\text{g}$  HA pro Stamm, obwohl z. B. für Kinder oder in pandemischen Situationen auch niedrigere Dosen verwendet werden. Bruchteile von Dosen wie z. B.  $1/2$  (d. h.  $7,5 \mu\text{g}$  HA pro Stamm),  $1/4$  und  $1/8$  sind ebenfalls verwendet worden [63, 64], wie auch höhere Dosen (z. B. 3-fache oder 9-fache Dosen [62, 63]). Somit können die Impfstoffe zwischen  $0,1$  und  $150 \mu\text{g}$  HA pro Influenzastamm enthalten, vorzugsweise zwischen  $0,1$  und  $50 \mu\text{g}$ , z. B.  $0,1$ – $20 \mu\text{g}$ ,  $0,1$ – $15 \mu\text{g}$ ,  $0,1$ – $10 \mu\text{g}$ ,  $0,1$ – $7,5 \mu\text{g}$ ,  $0,5$ – $5 \mu\text{g}$  usw. Konkrete Dosen enthalten z. B. etwa 45, etwa 30, etwa 15, etwa 10, etwa 7,5, etwa 5, etwa 3,8, etwa 1, 9, etwa 1,5 usw. pro Stamm. Die Verwendung eines Adjuvans in dem Impfstoff kann eine geringere inhärente Immunogenität dieser niedrigeren Dosen kompensieren.

**[0041]** Das im Rahmen der Erfindung verwendete HA kann ein natürliches HA sein, wie es in einem Virus vorkommt, oder es kann modifiziert worden sein. Es ist zum Beispiel bekannt, HA zu modifizieren, um Determinanten zu entfernen (z. B. hyperbasiische Regionen um die Spaltstelle zwischen HA1 und HA2), die für die hohe Pathogenität des Virus in Vogelspezies verantwortlich sind da diese Determinanten sonst verhindern können dass der Virus in Eiern wachsen kann.

**[0042]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können ein Detergens enthalten, z. B. ein Polyoxyethylensorbitanester-Tensid (bekannt als "Tweens"), ein Octoxynol (wie z. B. Octoxynol-9 (Triton X-100) oder t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), ein Cetyltrimethylammoniumbromid ("CTAB") oder Natriumdeoxycholat, insbesondere für einen Spaltimpfstoff oder Oberflächenantigen-Impfstoff. Es ist möglich, dass das Detergens nur in Spuren vorhanden ist. Auf diese Weise kann der Impfstoff weniger als je  $1 \text{ mg/ml}$  Octoxynol-10 und Polysorbat 80 enthalten. Andere in Spuren vorhandene restliche Komponenten könnten Antibiotika sein (z. B. Neomycin, Kanamycin, Polymyxin B).

## Die Öl-in-Wasser Emulsion

**[0043]** Öl-in-Wasser Emulsion haben sich als besonders nützlich für die Adjuvierung von Grippeimpfstoffen erwiesen. Verschiedene solche Emulsionen sind bekannt und sie beinhalten typischerweise mindestens ein Öl und mindestens ein Tensid, wobei das Öl (die Öle) und das Tensid (die Tenside) biologisch abbaubar (metabolisierbar) und biokompatibel sind. Die Öltröpfchen in einer geeigneten Emulsion weisen gewöhnlich einen Durchmesser von weniger als 5 µm auf und können sogar einen Durchmesser im Submikronbereich aufweisen, wobei diese kleinen Größen mittels eines Mikrofluidisiers hergestellt werden, um stabile Emulsionen zu erzielen. Tröpfchen mit einer Größe von weniger als 220 nm werden bevorzugt, da sie einer Filtersterilisation unterzogen werden können.

**[0044]** Die Erfindung kann mit Ölen tierischen (wie z. B. Fisch) oder pflanzlichen Ursprungs genutzt werden. Zu den Quellen für die Pflanzenöle gehören Nüsse, Samen und Körner. Erdnussöl, Sojabohnenöl, Kokosnussöl und Olivenöl, um nur die am leichtesten erhältlichen zu nennen, sind Beispiele für Nussöle. Es kann z. B. auch Jojobaöl verwendet werden, das aus der Jojobabohne gewonnen wird. Zu den Samenölen gehören Distelöl, Baumwollsaamenöl, Sonnenblumenöl, Sesamöl und dergleichen. In der Körnergruppe ist Maiskeimöl das am leichtesten erhältliche, doch es kann auch das Öl von anderen Getreidekörnern wie z. B. Weizen, Hafer, Roggen, Reis, Zwerghirse, Triticale und dergleichen verwendet werden. 6–10 Kohlenstoffatome aufweisende Fettsäureester von Glycerol und 1,2-Propandiol kommen zwar nicht auf natürliche Weise in Samenölen vor, können aber durch Hydrolyse, Trennung und Veresterung geeigneter Materialien ausgehend von den Nuss- und Samenölen hergestellt werden. Fette und Öle aus Säugermilch sind metabolisierbar und können daher bei der Ausführung dieser Erfindung verwendet werden. Die Verfahren zur Trennung, Reinigung, Verseifung u. a., die erforderlich sind, um reine Öle aus tierischen Quellen zu gewinnen, sind im Fachgebiet gut bekannt. Die meisten Fische enthalten metabolisierbare Öle, die leicht gewonnen werden können. Dorschlebertran, Hailebertran und Walöle wie z. B. Walrat sind einige Beispiele für Fischöle, die hier verwendet werden können. Eine Reihe von Ölen mit verzweigten Ketten werden biochemisch in Isopreneinheiten mit 5 Kohlenstoffatomen synthetisiert und als gewöhnlich Terpene bezeichnet. Hailebertran enthält ein verzweigtes, ungesättigtes Terpenoid, das als Squalen – 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen – bekannt ist und hier verwendet wird. Fischöle, einschließlich Squalen, können leicht aus kommerziellen Quellen bezogen werden oder durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden. Andere bevorzugte Öle die Tocopherole (siehe unten). Es können Ölmischungen verwendet werden.

**[0045]** Die Tenside können anhand ihrer "HLB" (hydrophile/lipophile Balance) eingeteilt werden. Bevorzugte Tenside gemäß der Erfindung weisen eine HLB von mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15 und insbesondere mindestens 16 auf. Die Erfindung kann mit Tensiden angewendet werden, die Folgendes einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind: Polyoxyethylensorbitanester-Tenside (gewöhnlich als Tweens bezeichnet), insbesondere Polysorbat 20 und Polysorbat 80; Copolymere von Ethylenoxid (EO), Propylenoxid (PO) und/oder Butylenoxid (BO), die unter dem Handelsnamen DOWFAX™ vertrieben werden, wie z. B. lineare EO/PO-Blockcopolymere; Octoxynole, die hinsichtlich der Anzahl der sich wiederholenden Ethoxy(oxy-1,2-ethandiyloxy)-Gruppen variieren können, wobei Octoxynol-9 (Triton X-100 oder t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) von besonderem Interesse ist; (Octylphenoxy)polyethoxyethanol (IGEPAL CA-630/NP-40); Phospholipide wie z. B. Phosphatidylcholin (Lecithin); Nonylphenoethoxylate wie z. B. die Serie Tergitol™ NP; Polyoxyethylenfetter, die von Lauryl-, Cetyl-, Stearyl- und Oleylalkoholen abgeleitet sind (bekannt als Brij-Tenside), wie z. B. Triethylenglycolmonolaurylether (Brij 30); und Sorbitanester (allgemein bekannt als SPAN), wie z. B. Sorbitantrioleat (Span 85) und Sorbitanmonolaurat. Nichtionische Tenside werden bevorzugt. Bevorzugte Tenside zur Aufnahme in die Emulsion sind Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat), Span 85 (Sorbitantrioleat), Lecithin und Triton X-100.

**[0046]** Es können Mischungen von Tensiden verwendet werden, zum Beispiel Tween 80/Span 85-Mischungen. Eine Kombination eines Polyoxyethylensorbitanesters wie z. B. Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween 80) mit einem Octoxynol wie z. B. t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) ist ebenfalls geeignet. Andere geeignete Kombinationen sind Laureth 9 plus ein Polyoxyethylensorbitanester und/oder ein Octoxynol.

**[0047]** Bevorzugte Mengen an Tensiden (Gew.-%) sind: Polyoxyethylensorbitanester (wie z. B. Tween 80) 0,01 bis 1%, insbesondere etwa 0,1%; Octyl- oder Nonylphenoxyethoxyethanole (wie z. B. Triton X-100 oder andere Tenside aus der Triton-Reihe) 0,001 bis 0,1%, insbesondere 0,005 bis 0,02%; Polyoxyethylenether (wie z. B. Laureth 9) 0,1 bis 20%, vorzugsweise 0,1 bis 10% und insbesondere 0,1 bis 1% oder etwa 0,5%.

**[0048]** Unabhängig von der Wahl des (der) jeweiligen Öls (Öle) und der jeweiligen oberflächenaktiven Substanz(en) wird (werden) die oberflächenaktive(n) Substanz(en) in größerer Menge als für die Emulgierung er-

forderlich zugegeben, sodass die oberflächenaktive Substanz in der wässrigen Phase verbleibt. Der Nachweis der freien oberflächenaktiven Substanz in der fertigen Emulsion kann durch verschiedene Methoden erfolgen. So lassen sich zum Beispiel mit Hilfe der Saccharosegradienten-Zentrifugation Emulsionströpfchen aus der wässrigen Phase abscheiden, sodass die wässrige Phase im Anschluss analysiert werden kann. Mittels der Zentrifugation können die beiden Phasen getrennt werden, wobei die Öltröpfchen koaleszieren und zur Oberfläche aufsteigen. Dann kann der Gehalt an oberflächenaktiver Substanz der wässrigen Phase bestimmt werden, z. B. durch Verwendung des HPLC- oder eines anderen geeigneten analytischen Verfahrens.

**[0049]** Spezielle Öl-in-Wasser-Emulsionen, die für den Zweck der Erfindung als Adjuvantien verwendet werden können, sind zum Beispiel die folgenden Emulsionen:

- Eine submikrone Emulsion aus Squalen, Tween 80 und Span 85. Volumenmäßig kann die Emulsion etwa 5% Squalen, 0,5% Polysorbat 80 und 0,5% Span 85 enthalten. Dies entspricht in Gewichtsanteilen 4,3% Squalen, 0,5% Polysorbat 80 und 0,48% Span 85. Das Adjuvans ist unter der Bezeichnung „MF59“ [64–66] bekannt und wird in Kapitel 10 des Literaturhinweises 67 und Kapitel 12 des Literaturhinweises 68 näher beschrieben. Die Emulsion MF59 enthält Zitrationen, z. B. 10 mM Natriumzitratpuffer, was sich vorteilhaft auswirkt.
- Eine Emulsion aus Squalen, einem Tocopherol und Tween 80. Die Emulsion kann phosphatgepufferte Salzlösung enthalten. Ferner kann auch Span 85 (z. B. 1%) und/oder Lecithin enthalten sein. Diese Emulsionen können 2 bis 10% Squalen, 2 bis 10% Tocopherol und 0,3 bis 3% Tween 80 enthalten, und das Gewichtsverhältnis von Squalen zu Tocopherol beträgt vorzugsweise  $\leq 1$ , da dieses eine stabilere Emulsion gewährleistet. Das Volumenverhältnis von Squalen zu Tween 80 kann etwa 5:2 betragen. Eine solche Emulsion kann hergestellt werden, indem Tween 80 in PBS zu einer 2%igen Lösung gelöst wird, dann 90 ml dieser Lösung mit einem Gemisch (aus 5 g DL- $\alpha$ -Tocopherol und 5 ml Squalen) gemischt werden und das Gemisch im Anschluss daran mikrofluidisiert wird. Die dabei entstehende Emulsion kann Öltröpfchen enthalten, deren Größe im Submikronbereich liegt, z. B. mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 bis 250 nm, vorzugsweise etwa 180 nm.
- Eine Emulsion aus Squalen, einem Tocopherol und einem Triton-Detergens (z. B. Triton X-100). Auch kann die Emulsion ein 3d-MPL enthalten (siehe weiter unten). Die Emulsion kann einen Phosphatpuffer umfassen.
- Eine Emulsion, die ein Polysorbat (z. B. Polysorbat 80), ein Triton-Detergens (z. B. Triton X-100) und ein Tocopherol (z. B. ein  $\alpha$ -Tocopherol-Succinat) enthält. Das Masseverhältnis dieser drei Komponenten in der Emulsion kann etwa 75:11:10 betragen (z. B. 750  $\mu\text{g/ml}$  Polysorbat 80, 110  $\mu\text{g/ml}$  Triton X-100 und 100  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol-Succinat), und diese Konzentrationen sollten alle Anteile dieser Komponenten aus Antigenen enthalten. Die Emulsion kann auch Squalen enthalten. Die Emulsion kann auch ein 3d-MPL enthalten (siehe weiter unten). Die wässrige Phase kann einen Phosphatpuffer enthalten.
- Eine Emulsion aus Squalen, Polysorbat 80 und Poloxamer 401 („Pluronic™ L121“). Die Emulsion kann in phosphatgepuffertes Salzlösung mit einem pH-Wert von 7,4 hergestellt werden. Diese Emulsion ist eine nützliche Trägersubstanz von Muramyldipeptid und wird mit Threonyl-MDP im Adjuvans „SAF-1“ verwendet [69] (0,05–1% Thr-MDP, 5% Squalen, 2,5% Pluronic L121 und 0,2% Polysorbat 80). Sie kann auch ohne Thr-MDP wie im Falle des Adjuvans „AF“ verwendet werden [70] (5% Squalen, 1,25% Pluronic L121 und 0,2% Polysorbat 80). Dabei wird die Mikrofluidisierung bevorzugt.
- Eine Emulsion, die 0,5–50% Öl, 0,1–10% Phospholipid und 0,05–5% nichtionische oberflächenaktive Substanz enthält. Wie in Literaturhinweis [71] beschrieben, zählen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidsäure, Sphingomyelin und Kardiolipin zu den bevorzugten Phospholipidkomponenten. Vorteilhaft ist eine Tröpfchengröße im Submikronbereich.
- Eine submikrone Öl-in-Wasser-Emulsion aus einem nichtmetabolisierbaren Öl (zum Beispiel eines leichten Mineralöls) und mindestens einer oberflächenaktiven Substanz (zum Beispiel Lecithin, Tween 80 oder Span 80). Sie kann ferner Additive enthalten wie QuilA-Saponin, Cholesterol, ein Saponin-lipophiles Konjugat (wie GPI-0100, beschrieben im Literaturhinweis [72], hergestellt durch Zugabe von aliphatischem Amin zu Desacylsaponin über die Karboxylgruppe von Glukuronsäure), Dimethyldioctadecylammoniumbromide und/oder N,N-Dioctadecyl-N,N-bis(2-hydroxyethyl)propandiamin.
- Eine Emulsion, in der ein Saponin (z. B. QuilA oder QS21) und ein Sterol (z. B. ein Cholesterol) als Micellen mit helikaler Struktur assoziiert sind [73].

**[0050]** Die Emulsionen und das Spaltantigen können während der Herstellung, vor der Verpackung gemischt werden; sie können aber auch bei der Lieferung unmittelbar miteinander vermischt werden. Das Adjuvans und das Antigen können sich also separat und gebrauchsfertig in einer verpackten und verkauften Impfstoffeinheit befinden, sodass sie zum Zeitpunkt der Verwendung nur noch gemischt werden müssen. Das Antigen liegt im Allgemeinen in wässriger Form vor, und der Impfstoff wird abschließend hergestellt, indem die beiden Flüssig-

keiten miteinander vermischt werden. Das Volumenverhältnis der beiden zu mischenden Flüssigkeiten kann variieren (z. B. zwischen 5:1 und 1:5), liegt aber zumeist bei etwa 1:1. Geeignete Kits werden nachfolgend genauer beschrieben.

**[0051]** Nach dem Mischen von Antigen und Adjuvans verbleibt das Hämagglutinin-Antigen im Allgemeinen in der wässrigen Lösung, kann sich jedoch in der Öl-/Wasser-Grenzfläche verteilen. Im Allgemeinen gelangt nur wenig oder kein Hämagglutinin in die Ölphase der Emulsion.

**[0052]** Für tocopherolhaltige Verbindungen können  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ - oder  $\xi$ -Tocopherole verwendet werden, obgleich  $\alpha$ -Tocopherole bevorzugt werden. Tocopherol kann in verschiedener Form zum Einsatz kommen, z. B. verschiedene Salze und/oder Isomere. Als Salze werden organische Salze wie Succinat, Acetat, Nicotinat etc. verwendet. Es kann sowohl D- $\alpha$ -Tocopherol als auch DL- $\alpha$ -Tocopherol verwendet werden. In Impfstoffen für ältere Personen (z. B. 60 Jahre und älter) ist die Verwendung von Tocopherolen zu empfehlen, da Vitamin E Berichten zufolge eine positive Wirkung auf die Immunreaktion in dieser Patientengruppe hat [74]. Ferner haben diese Stoffe antioxidative Eigenschaften, die zur Stabilisierung der Emulsionen beitragen können [75]. Ein bevorzugtes  $\alpha$ -Tocopherol ist DL- $\alpha$ -Tocopherol, und das bevorzugte Salz dieses Tocopherols ist das Succinat. Es hat sich gezeigt, dass das Succinatsalz in vivo mit TNF-verwandten Liganden kooperiert. Ferner ist ein  $\alpha$ -Tocopherol-Succinat bekanntermaßen kompatibel mit Influenza-Impfstoffen und ein nützlicher Konservierungsstoff und somit eine Alternative zu Quecksilberverbindungen [14]. Auch kann die Stimulierung der Immunzellen durch Vitamin E die IL-2-Produktion direkt fördern (d. h. eine Reaktion des Th1-Typs) [76], wodurch ein erkennbarer Th2-Phänotyp vermieden werden kann.

#### Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0053]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind pharmazeutisch akzeptabel. Sie können neben dem Spaltantigen und der Emulsion zusätzliche Komponenten enthalten, so enthalten sie z. B. typischerweise einen oder mehrere pharmazeutische Träger und/oder Exzipienten. Eine eingehende Besprechung solcher Komponenten ist in Ref. 77 zu finden.

**[0054]** Die Zusammensetzungen liegen im Allgemeinen in wässriger Form vor. Das Spaltantigen und die Emulsion liegen typischerweise im Gemisch vor.

**[0055]** Die Zusammensetzung kann Konservierungsstoffe wie z. B. Thiomersal oder 2-Phenoxyethanol enthalten. Es wird jedoch bevorzugt, dass der Impfstoff weitgehend frei von Quecksilbermaterial ist (d. h. weniger als 5  $\mu\text{g/ml}$  enthält), wobei er z. B. frei von Thiomersal ist [14, 78]. Impfstoffe, die kein Quecksilber enthalten, werden stärker bevorzugt, wobei sie auf einfache Weise unter Verwendung eines tocopherolhaltigen Adjuvans nach den Angaben in Ref. 14 hergestellt werden können. Konservierungsmittelfreie Impfstoffe werden besonders bevorzugt.

**[0056]** Zur Kontrolle des Spannungszustands wird bevorzugt, ein physiologisches Salz zuzugeben, wie z. B. ein Natriumsalz. Natriumchlorid (NaCl) wird bevorzugt und kann in einer Konzentration zwischen 1 und 20 mg/ml vorhanden sein. Andere Salze, die vorhanden sein können, sind Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumphosphatdehydrat, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid usw.

**[0057]** Die Zusammensetzungen weisen im Allgemeinen eine Osmolalität zwischen 200 mOsm/kg und 400 mOsm/kg, vorzugsweise zwischen 240 und 360 mOsm/kg und insbesondere zwischen 290 und 310 mOsm/kg auf. Es ist berichtet worden, dass die Osmolalität keinen Einfluss auf den durch die Impfung verursachten Schmerz hat [79], es wird aber dennoch bevorzugt, die Osmolalität in diesem Bereich zu halten.

**[0058]** Die Zusammensetzungen können einen oder mehrere Puffer enthalten. Zu den typischen Puffer gehören: ein Phosphatpuffer; ein Tris-Puffer; ein Boratpuffer; ein Succinatpuffer; ein Histidinpuffer; oder ein Citratpuffer. Die Puffer sind typischerweise in einer Menge von 5 bis 20 mM enthalten. Es kann auf geeignete Weise eine in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gebildete Emulsion verwendet werden.

**[0059]** Der pH einer Zusammensetzung liegt im Allgemeinen zwischen 5,0 und 8,1, typischer zwischen 6,0 und 8,0, z. B. 6,5 und 7,5, oder zwischen 7,0 und 7,8. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann daher einen Schritt des Einstellen des pH-Werts des Bulk-Impfstoffs vor dem Verpacken umfassen.

**[0060]** Die Zusammensetzung ist vorzugsweise steril. Die Zusammensetzung ist vorzugsweise nichtpyrogen, wobei sie z. B. < 1 EU (Endotoxin Unit, ein Standardmaß) pro Dosis und vorzugsweise < 0,1 EU pro Dosis enthält. Die Zusammensetzung ist vorzugsweise glutenfrei.

**[0061]** Die Zusammensetzung kann Material für eine einzige Immunisierung enthalten, oder sie kann Material für mehrere Immunisierungen enthalten (d. h. ein "Mehrfachdosis"-Kit). In Mehrfachdosis-Anordnungen wird die Zugabe eines Konservierungsmittels bevorzugt. Im Fall von Mehrfachdosis-Zusammensetzungen können als Alternative (oder zusätzlich) zur Zugabe eines Konservierungsmittels die Zusammensetzungen in einem Behälter enthalten sein, der einen aseptischen Adapter zur Entnahme des Materials aufweist.

**[0062]** Grippeimpfstoffe werden typischerweise in einem Dosierungsvolumen von etwa 0,5 ml verabreicht, obwohl auch eine halbe Dosis (d. h. etwa 0,25 ml) verabreicht werden kann, z. B. an Kinder.

**[0063]** Die Zusammensetzungen und Kits werden vorzugsweise zwischen 2°C und 8°C gelagert. Sie sollten nicht tiefgekühlt werden. Sie sollten idealerweise vor direktem Licht geschützt werden.

#### Kits gemäß der Erfindung

**[0064]** Die Zusammensetzungen können unmittelbar vor der Verabreichung zubereitet werden. Somit schafft die Erfindung Kits, die die verschiedenen Komponenten bereit zur Mischung umfassen. Das Kit ermöglicht es, das Adjuvans und das Antigen bis zum Zeitpunkt der Anwendung getrennt zu halten, was vorteilhaft sein kann, wenn ein Adjuvans in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion verwendet wird.

**[0065]** Die Komponenten sind in einem Kit physikalisch voneinander getrennt, wobei diese Trennung auf verschiedene Weisen bewerkstelligt werden kann. Zum Beispiel können die zwei Komponenten in zwei separaten Behältern wie z. B. Ampullen enthalten sein. Der Inhalt der zwei Ampullen kann anschließend gemischt werden, indem z. B. der Inhalt einer Ampulle entleert und zur anderen Ampulle zugegeben wird, oder indem die Inhalte der zwei Ampullen separat entleert und in einem dritten Behälter gemischt werden.

**[0066]** In einer bevorzugten Anordnung befindet sich eine der Kitkomponenten in einer Spritze und die andere in einem Behälter wie z. B. einer Ampulle. Die Spritze (z. B. mit einer Nadel) kann verwendet werden, um ihren Inhalt in den zweiten Behälter zur Mischung einzuführen, und anschließend kann die Mischung wieder in die Spritze aufgezogen werden. Die gemischten Inhalte der Spritze können anschließend einem Patienten verabreicht werden, typischerweise mit einer neuen sterilen Nadel. Durch das Verpacken einer Komponente in einer Spritze wird vermieden, dass bei der Verabreichung an den Patienten eine separate Spritze benötigt wird.

**[0067]** In einer anderen bevorzugten Anordnung befinden sich die Kitkomponenten gemeinsam, aber getrennt in der gleichen Spritze, z. B. in einer Spritze mit zwei Kammern, wie sie z. B. in den Referenzdokumenten 80–87 usw. offenbart wird. Wenn die Spritze betätigt wird (z. B. während der Verabreichung an einen Patienten), werden die Inhalte der zwei Kammern gemischt. Durch diese Anordnung wird vermieden, dass ein separater Mischschritt zum Zeitpunkt der Verwendung erforderlich ist.

**[0068]** Die Kitkomponenten liegen im Allgemeinen in wässriger Form vor. In einigen Anordnungen liegt eine Komponente (typischerweise die Antigenkomponente und nicht die Adjuvanskomponente) in trockener Form (z. B. in einer gefriergetrockneten Form) vor, während die andere Komponente in wässriger Form vorliegt. Die zwei Komponenten können gemischt werden, um die trockene Komponente zu reaktivieren und eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, die einem Patienten verabreicht wird. Die gefriergetrocknete Komponente befindet sich typischerweise in einer Ampulle und nicht in einer Spritze. Die trockenen Komponenten können Stabilisatoren wie z. B. Lactose, Saccharose oder Mannitol sowie Mischungen davon enthalten, z. B. Lactose/Saccharose-Mischungen, Saccharose/Mannitol-Mischungen usw. Eine mögliche Anordnung verwendet eine wässrige Adjuvanskomponente in einer vorgefüllten Spritze und eine gefriergetrocknete Antigenkomponente in einer Ampulle.

#### Verpackung der Zusammensetzungen oder Kitkomponenten

**[0069]** Geeignete Behälter für die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen (oder Kitkomponenten) umfassen Ampullen, Spritzen (z. B. Einwegspritzen), Nasensprays usw. Diese Behälter sollten steril sein.

**[0070]** Wenn sich eine Zusammensetzung/Komponente in einer Ampulle befindet, kann die Ampulle aus Glas oder Kunststoff hergestellt sein. Sie kann sterilisiert werden, bevor die Zusammensetzung/Komponente ein-

gefüllt wird. Um Probleme mit Patienten zu vermeiden, die gegenüber Latex empfindlich sind, können die Ampullen mit einem latexfreien Stopfen verschlossen werden, wobei die Abwesenheit von Latex in allen Verpackungsmaterialien bevorzugt wird. Die Ampulle kann eine Einzeldosis des Impfstoffs enthalten, oder sie kann mehr als eine Dosis enthalten ("Mehrfachdosis"-Ampulle), z. B. 10 Dosen. Bevorzugte Ampullen sind aus farblosem Glas hergestellt.

**[0071]** Eine Ampulle kann eine Kappe (z. B. einen Luer-Lock) aufweisen, die derart ausgestaltet ist, dass eine vorgefüllte Spritze in die Kappe eingeführt werden kann, dass der Inhalt der Spritze in die Ampulle ausgestoßen werden kann (z. B. um das darin befindliche gefriergetrocknete Material zu rekonstituieren), und dass der Inhalt der Ampulle in die Spritze zurückbefördert werden kann. Nach dem Herausziehen der Spritze aus der Ampulle kann eine Nadel daran befestigt werden, und die Zusammensetzung kann einem Patienten verabreicht werden. Die Kappe ist vorzugsweise innerhalb einer Versiegelung oder Abdeckung angeordnet, so dass die Versiegelung oder Abdeckung entfernt werden muss, um Zugang zur Kappe zu erhalten. Eine Ampulle kann eine Kappe aufweisen, die eine aseptische Entnahme ihres Inhalts ermöglicht, insbesondere im Fall von Mehrfachdosen-Ampullen.

**[0072]** Wenn eine Zusammensetzung in einer Spritze verpackt ist, wird die Spritze normalerweise keine daran angebrachte Nadel aufweisen, obwohl eine separate Nadel mit der Spritze bereitgestellt werden, die bei der Verwendung daran befestigt wird. Sicherheitsnadeln werden bevorzugt. Nadeln mit 1 Inch und 23 Gauge, 1 Inch und 25 Gauge sowie 5/8 Inch und 25 Gauge sind typisch. Die Spritzen können mit abziehbaren Etiketten versehen sein, auf denen die Chargennummer, die Grippesaison und das Verfalldatum des Inhalts aufgedruckt sind, um das Führen der Aufzeichnungen zu erleichtern. Der Kolben in der Spritze weist vorzugsweise einen Stopper auf, um zu verhindern, dass der Kolben während des Ansaugens unbeabsichtigterweise herausgezogen wird. Die Spritzen können eine Kappe und/oder einen Kolben aus Latexgummi aufweisen. Einwegspritzen enthalten eine Einzeldosis des Impfstoffs. Die Spritze weist im Allgemeinen eine Kappe an der Spitze auf, um die Spitze vor dem Anbringen einer Nadel zu verschließen, wobei die Spitzekappe vorzugsweise aus einem Butylgummi hergestellt ist. Wenn die Spritze und die Nadel separat verpackt sind, ist die Nadel vorzugsweise mit einer Butylgummidichtung versehen. Bevorzugte Spritzen sind jene, die unter dem Handelsnamen "Tip-Lok"<sup>TM</sup> vertrieben werden.

**[0073]** Die Behälter können eine Markierung aufweisen, um das Volumen einer halben Dosis anzuzeigen, um z. B. die Verabreichung an Kinder zu erleichtern. Zum Beispiel kann eine Spritze, die eine 0,5 ml-Dosis enthält, eine Markierung aufweisen, die ein Volumen von 0,25 ml anzeigt.

**[0074]** Wenn ein Behälter (z. B. Spritze oder Ampulle) aus Glas verwendet wird, so wird bevorzugt, einen Behälter aus Borsilikatglas und nicht aus Kalknatronglas zu verwenden.

**[0075]** Ein Kit oder eine Zusammensetzung können (z. B. in der gleichen Schachtel) zusammen mit einer Packungsbeilage verpackt werden, auf der genaue Angaben zum Impfstoff enthalten sind, z. B. Anleitungen für die Verabreichung, Einzelheiten zu den Antigenen in dem Impfstoff usw. Die Anleitungen können auch Warnhinweise umfassen, zum Beispiel den Hinweis, eine Adrenalinlösung für den Fall bereitzuhalten, dass anaphylaktische Reaktionen nach der Impfung auftreten sollten usw.

#### Bevorzugte Ausführungsform der Erfindung

**[0076]** Eine bevorzugte Zubereitung enthält (i) eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit Squalen und Polysorbat 80 und (ii) ein Spalt-Influenzavirus-Antigen.

**[0077]** Ein bevorzugtes Kit umfasst (i) eine erste Kitkomponente mit einem Spalt-Influenzavirus-Antigen und (ii) eine zweite Kitkomponente mit einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die Squalen und Polysorbat 80 enthält.

**[0078]** Ein bevorzugter Prozess umfasst die Schritte zur Kombination: (i) eines Spalt-Influenzavirus-Antigens und (ii) einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die Squalen und Polysorbat 80 enthält.

**[0079]** Vor Durchführung des Prozesses sind die Konzentrationen des Antigens und der Emulsion höher als für das Endprodukt gewünscht, da die Kombination der separaten Komponenten mit einer Verdünnung einhergeht. Wenn beispielsweise im Wesentlichen gleiche Volumen der beiden Komponenten gemischt werden, betragen die Konzentrationen vor dem Mischvorgang das Doppelte der gewünschten Endkonzentrationen.

**[0080]** Das Spalt-Influenzavirus-Antigen und die Emulsion werden somit getrennt voneinander zubereitet und im Anschluss daran zusammengeführt. Obgleich die Herstellung der beiden Komponenten zu unterschiedlichen Zeiten durch unterschiedliche Personen an verschiedenen Orten erfolgen kann, sieht die Erfindung einen Prozess vor, der die folgenden Schritte umfasst: (i) Herstellung des Spalt-Influenzavirus-Antigens; (ii) Herstellung einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die Squalen und Polysorbat 80 enthält; und (iii) Verbindung des Spalt-Influenzavirus-Antigens mit der Öl-in-Wasser-Emulsion. Die Emulsion kann hergestellt werden, indem das (die) Öl (e) und die oberflächenaktive(n) Substanz(en) in einem wässrigen Medium zusammengeführt werden und das Gemisch dann mikrofluidisiert wird, wodurch die Emulsion, z. B. Tröpfchen im Submikronbereich, entsteht.

**[0081]** Erfolgt das Vermischen von Antigen und Emulsion unter industriellen Bedingungen, kann der Prozess einen weiteren Schritt, die Extraktion einer Einzeldosis des Gemischs, umfassen.

**[0082]** Das Spalt-Influenzavirus-Antigen kann monovalent oder multivalent (beispielsweise trivalent, z. B. zwei Influenza-A-Viren und ein Influenza-B-Virus) sein.

**[0083]** Neben Squalen und Polysorbat 80 kann die Emulsion eine oder mehrere der folgenden Substanzen enthalten: (a) Span 85; (b) ein Tocopherol; (c) ein Polyoxyethanol wie Triton X-100 (Octylphenoxypolyoxyethanol); (d) einen Zitratpuffer und/oder (e) einen Phosphatpuffer.

#### Behandlungsverfahren und Verabreichung des Impfstoffs

**[0084]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind geeignet zur Verabreichung an menschliche Patienten durch ein Verfahren, das eine Immunantwort in einem Patienten hervorruft und das den Schritt der Verabreichung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung an den Patienten umfasst.

**[0085]** Der Erfindung sieht ferner ein Kit oder eine Zubereitung der Erfindung zur Verwendung als Medikament vor.

**[0086]** Die Erfindung betrifft zudem die Verwendung (i) eines Spalt-Influenzavirus-Antigens und (ii) einer Öl-in-Wasser-Emulsion, die eine freie oberflächenaktive Substanz in ihrer wässrigen Phase enthält, bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung der Immunreaktion des Patienten.

**[0087]** Die durch diese Verfahren hervorgerufene Immunantwort umfasst im Allgemeinen eine Antikörperantwort, vorzugsweise eine schützende Antikörperantwort. Verfahren zur Beurteilung der Antikörperantworten, der neutralisierenden Fähigkeit und des Schutzes nach einer Grippeimpfung sind im Fachgebiet gut bekannt. Studien am Menschen haben gezeigt, dass die Antikörpertiter gegen das Hämagglutinin des humanen Grippevirus mit dem Schutz korrelieren (ein Hämagglutinationshemmungstiter in einer Serumprobe von etwa 30–40 ergibt einen etwa 50%-igen Schutz vor einer Infektion durch ein homologes Virus) [88]. Die Antikörperantworten werden typischerweise durch Hämagglutinationshemmung, Mikroneutralisierung, Single Radial Immunodiffusion (SRID) und/oder Single Radial Hemolysis (SRH) gemessen. Diese Assaytechniken sind im Fachgebiet gut bekannt.

**[0088]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können auf unterschiedlichen Wegen verabreicht werden. Das am meisten bevorzugte Immunisierungsverfahren ist die intramuskuläre Injektion (z. B. in den Arm oder das Bein), andere mögliche Verabreichungswege sind jedoch die subkutane Injektion, die intranasale [89–90], orale [92], intradermale [93, 94], transkutane, transdermale [95] Verabreichung usw.

**[0089]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können zur Behandlung von Kinder und Erwachsenen verwendet werden. Grippeimpfstoffe werden zurzeit für die Immunisierung im pädiatrischen Bereich und in der Erwachsenenmedizin für Personen ab dem Alter von 6 Monaten empfohlen. Somit kann der Patient weniger als 1 Jahr alt, 1–5 Jahre alt, 5–15 Jahre alt, 15–55 Jahre alt oder mindestens 55 Jahre alt sein. Bevorzugte Patienten zum Erhalt der Impfstoffe sind ältere Personen (z. B.  $\geq 50$  Jahre,  $\geq 60$  Jahre, vorzugsweise  $\geq 65$  Jahre), junge Menschen (z. B.  $\leq 5$  Jahre), hospitalisierte Patienten, Angehörige des Gesundheitswesens, Wehrdienstleistende, Militärangehörige, schwangere Frauen, chronisch kranke, immungeschwächte Patienten, Patienten, die innerhalb von 7 Tagen vor dem Erhalt des Impfstoffs eine antivirale Verbindung eingenommen haben (z. B. eine Verbindung wie Oseltamivir oder Zanamivir; siehe unten), Personen mit Eiallergien und ins Ausland reisende Personen. Die Impfstoffe sind jedoch nicht nur für diese Gruppen geeignet, sondern können allgemein in der Bevölkerung angewendet werden. Bei pandemischen Stämmen wird eine Verabreichung an alle Altersgruppen bevorzugt.

**[0090]** Bevorzugte Zusammensetzungen gemäß der Erfindung erfüllen 1, 2 oder 3 der CPMP-Wirksamkeitskriterien. Bei Erwachsenen (18 – 60 Jahre) sind diese Kriterien folgende: (1)  $\geq 70\%$  Seroprotektion; (2)  $\geq 40\%$  Serokonversion und/oder (3) ein GMT-Anstieg um das  $> 2,5$ -Fache. Bei älteren Menschen ( $> 60$  Jahre) sind diese Kriterien folgende: (1)  $\geq 60\%$  Seroprotektion; (2)  $\geq 30\%$  Serokonversion und/oder (3) ein GMT-Anstieg um das  $> 2$ -Fache. Diese Kriterien beruhen auf offenen Studien mit mindestens 50 Patienten.

**[0091]** Die Behandlung kann nach einem Einzeldosischema oder einem Mehrfachdosischema erfolgen. Im Rahmen eines Schemas zur primären Immunisierung und/oder eines Schemas zur Auffrischungsimpunisierung können mehrere Dosen verabreicht werden. Im Rahmen eines Mehrfachdosischemas können die verschiedenen Dosen auf dem gleichen Weg oder auf unterschiedlichen Wegen verabreicht werden; möglich sind z. B. eine parenterale Erstimpfung und eine mukosale Auffrischung, eine mukosale Erstimpfung und eine parenterale Auffrischung usw. Die Verabreichung von mehr als einer Dosis (typischerweise zwei Dosen) ist besonders geeignet für immunologisch naive Patienten, z. B. für Personen, die in der Vergangenheit noch nie einen Grippeimpfstoff erhalten haben, oder zur Impfung gegen einen neuen HA-Subtyp (bei einem pandemischen Ausbruch). Mehrere Dosen werden typischerweise im Abstand von mindestens 1 Woche verabreicht (z. B. etwa 2 Wochen, etwa 3 Wochen, etwa 4 Wochen, etwa 6 Wochen, etwa 8 Wochen, etwa 10 Wochen, etwa 12 Wochen, etwa 16 Wochen usw.).

**[0092]** Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können den Patienten im Wesentlichen gleichzeitig (z. B. während des gleichen Besuchs bei einem Arzt, bei einem Angehörigen des Gesundheitswesens oder in einem Impfzentrum) mit anderen Impfstoffen verabreicht werden, z. B. im Wesentlichen gleichzeitig mit einem Masernimpfstoff, einem Mumpsimpfstoff, einem Rötelnimpfstoff, einem MMR-Impfstoff, einem Windpockenimpfstoff, einem MMRV-Impfstoff, einem Diphtherieimpfstoff, einem Tetanusimpfstoff, einem Pertussisimpfstoff, einem DTP-Impfstoff, einem konjugierten Impfstoff gegen *H. influenzae* Typ b, einem inaktivierten Poliovirus-Impfstoff, einem Impfstoff gegen das Hepatitis B-Virus, einem Meningokokkenkonjugatimpfstoff (wie z. B. einem tetravalenten A-C-W135-Y-Impfstoff), einem Impfstoff gegen das Respiratory Syncytial Virus, einem Pneumokokkenkonjugatimpfstoff usw. Die Verabreichung im Wesentlichen gleichzeitig mit einem Pneumokokkenimpfstoff und/oder einem Meningokokkenimpfstoff ist bei älteren Patienten besonders zweckmäßig.

**[0093]** Auf ähnliche Weise können die erfindungsgemäßen Impfstoffe den Patienten im Wesentlichen gleichzeitig (z. B. während des gleichen Besuchs bei einem Arzt oder einem Angehörigen des Gesundheitswesens) mit einer antiviralen Verbindung verabreicht werden, insbesondere mit einer antiviralen Verbindung, die gegen das Grippevirus aktiv ist (z. B. Oseltamivir und/oder Zanamivir). Diese antiviralen Verbindungen umfassen Neuraminidasehemmer wie z. B. (3R,4R,5S)-4-Acetylamino-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexen-1-Carbonsäure oder 5-(Acetylamino)-4-[(aminoiminomethyl)-amino]-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-enonsäure, einschließlich Ester (z. B. Ethylestern) und Salzen davon (z. B. Phosphatsalzen). Eine bevorzugte antivirale Verbindung ist (3R,4R,5S)-4-acetylamino-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäure, Ethylester, Phosphat (1:1), auch bekannt als Oseltamivir-Phosphat (TAMIFLU™).

#### Allgemeines

**[0094]** Der Begriff "umfasst" bedeutet sowohl "schließt ein" als auch "besteht aus", z. B. eine Zusammensetzung, die X "umfasst", kann ausschließlich aus X bestehen oder etwas Zusätzliches enthalten, z. B. X + Y.

**[0095]** Der Ausdruck "im Wesentlichen" schließt das Wort "vollständig" nicht aus, z. B. eine Zusammensetzung, die "im Wesentlichen frei" von Y ist, kann vollständig frei von Y sein. Wenn notwendig, kann der Ausdruck "im Wesentlichen" aus der Definition der Erfindung gestrichen werden.

**[0096]** Der Begriff "etwa" im Zusammenhang mit einem Zahlenwert x bedeutet zum Beispiel  $x \pm 10\%$ .

**[0097]** Sofern nicht anders angegeben, erfordert ein Verfahren, das einen Schritt des Mischen von zwei oder mehr Komponenten umfasst, keine spezifische Reihenfolge beim Mischen. Die Komponenten können somit in jeder Reihenfolge gemischt werden. Im Fall von drei Komponenten können zwei Komponenten miteinander gemischt werden, und anschließend kann die Kombination mit der dritten Komponente kombiniert werden usw.

**[0098]** Wenn tierische (insbesondere vom Rind stammende) Materialien bei der Kultur der Zellen verwendet werden, sollten sie aus Quellen bezogen werden, die frei von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) und insbesondere frei von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) ist. Insgesamt wird bevorzugt, die Zellen in vollständiger Abwesenheit von Materialien zu kultivieren, die von Tieren abgeleitet sind.

**[0099]** Wenn eine Verbindung dem Körper als Teil einer Zusammensetzung verabreicht wird, kann diese Verbindung alternativ durch eine geeignete Prodrug ersetzt werden.

**[0100]** Wenn für Reassortierungsverfahren oder Verfahren der reversen Gentechnik ein Zellsubstrat verwendet wird, handelt es sich vorzugsweise um ein Substrat, das für die Verwendung bei der Produktion von Impfstoffen für den Menschen zugelassen ist und z. B. im europäischen Arzneibuch (Ph Eur), allgemeines Kapitel 5.2.3, erwähnt ist.

#### AUSFÜHRUNG DER ERFINDUNG

##### Analyse der freien oberflächenaktiven Substanz in einer Squalen-in-Wasser-Emulsion

**[0101]** Ein mikrofluidisiertes Squalen-in-Wasser-Emulsion-Adjuvans, das Tween 80 als oberflächenaktive Substanz enthält, wurde – wie in Kapitel 10 des Literaturhinweises 67 beschrieben – hergestellt. Zur Bestimmung des Gehalts an Tween 80 in der wässrigen Phase der Emulsion wurde diese analysiert. Die Ölphase des Adjuvans wurde abgeschieden, die Ester in der wässrigen Phase wurden verseift und fluoreszenz-derivatisiert. Nach der chromatographischen Trennung wurde der Gesamtgehalt von Tween 80 in der wässrigen Phase mittels Fluoreszenz-Nachweis bestimmt.

**[0102]** Die Bestimmung des Tween-80-Gehalts der abgeschiedenen wässrigen Phase erfolgte auch mit Hilfe der RP-HPLC-Methode.

**[0103]** Beide Verfahren führten zu ähnlichen Ergebnissen; der Gesamtgehalt von Tween 80 in der wässrigen Phase der Emulsion wurde mit 12+1% bestimmt.

##### Adjuvantierung von Spalt Impfstoffen mit MF59

**[0104]** Es wurden zwei kommerziell erhältliche, nicht adjuvantierte trivalente Spalt-Influenzavirus-Impfstoffe („SPLIT (A)“ und „SPLIT (B)“) erworben und zur Immunisierung von Mäusen verwendet.

**[0105]** Die Impfstoffe wurden auf eine Dosis von jeweils 0,2 µg HA verdünnt. Für die Verdünnung wurde entweder nur Puffer oder Puffer und die Squalen-in-Wasser-Emulsion verwendet. Gruppen von acht weiblichen, acht Wochen alten Balb/c-Mäusen wurden intramuskulär mit dem nicht adjuvantierten und adjuvantierten Impfstoff immunisiert; die Dosis betrug an den Tagen 0 und 28 50 µl. An den Tagen 14 und 42 wurden Sera gewonnen und auf Anti-HA-Titer (IgG), HI-Titer und T-Zellen untersucht.

Die IgG-Antikörpertiter im Serum (ELISA) wurden für die einzelnen Viren wie folgt bestimmt:

	Tag 14		Tag 42	
	Plain	O/W emulsion	Plain	O/W emulsion
Anti-H1N1				
SPLIT (A)	152	450	749	7690
SPLIT (B)	85	629	1175	7738
Anti-H3N2				
SPLIT (A)	123	318	412	4583
SPLIT (B)	95	552	1111	6005
Anti-B				
SPLIT (A)	238	710	707	8716
SPLIT (B)	200	1063	1585	13682

HI-Antikörpertiter im Serum nach 42 Tagen:

	Plain	O/W emulsion
Anti-H1N1		
SPLIT (A)	140	800
SPLIT (B)	285	1300
Anti-H3N2		
SPLIT (A)	290	510
SPLIT (B)	380	460
Anti-B		
SPLIT (A)	280	1560
SPLIT (B)	550	2280

**[0106]** Somit können Öl-in-Wasser-Emulsionen die mit Spalt-Influenza-Impfstoffen erzielte Immunreaktion verstärken. Durch die Zugabe einer freien oberflächenaktiven Substanz zur wässrigen Phase kann die Emulsion eine weitere „Spaltwirkung“ auf das Virus ausüben, wodurch die noch vorhandenen, nicht gespaltenen Viruspartikel und/oder Viruspartikelaggregate gespalten werden.

**[0107]** Es wird darauf hingewiesen, dass die Erfindung lediglich anhand eines Beispiels beschrieben wurde und Änderungen im Rahmen des Umfangs und Geistes der Erfindung möglich sind.

## LITERATUR

- [1] Vaccines. (Hrsg. Plotkin & Orenstein). 4. Auflage, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Scheifele et al. (2003) Clin Infect Dis 36:850–7.
- [3] Babiuk et al. (2004) J Med Virol 72:138–42.
- [4] Skowronski et al. (2003) J Infect Dis 187:495–9.
- [5] US Patent 6,372,223.
- [6] WO 00/15251.
- [7] WO 01/22992.
- [8] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1–2):163–71.
- [9] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74–91.
- [10] WO02/28422.
- [11] WO02/067983.
- [12] WO02/074336.
- [13] WO01/21151.
- [14] WO02/097072.
- [15] WO2005/113756.
- [16] World Health Organisation (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10):1515–21.
- [17] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627–30.
- [18] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1108.
- [19] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165–3170.
- [20] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192–200.
- [21] Liu et al. (2003) Virology 314:580–590.
- [22] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851–1857.
- [23] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099–1103.
- [24] WO00/60050.
- [25] WO01/04333.
- [26] US 6649372.
- [27] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825–9.
- [28] WO2006/067211.
- [29] WO01/83794.
- [30] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310–7.
- [31] WO97/37000.
- [32] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93–100.
- [33] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240–7.

- [34] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444–50.
- [35] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960–8.
- [36] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101–110.
- [37] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149–58.
- [38] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716–21.
- [39] <http://www.atcc.org/>
- [40] <http://locus.umdj.edu/>
- [41] WO03/076601.
- [42] WO2005/042728.
- [43] WO03/043415.
- [44] WO01/85938.
- [45] WO2006/108846.
- [46] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [47] WO2006/071563.
- [48] WO2005/113758.
- [49] WO03/023021
- [50] WO03/023025
- [51] WO97/37001.
- [52] WO2006/027698.
- [53] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195–197.
- [54] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mai 2001.
- [55] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162–7.
- [56] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7–12.
- [57] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173–80.
- [58] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123–32.
- [59] EP-B-0870508.
- [60] US patent 5948410.
- [61] International patent application entitled "CELL-DERIVED VIRAL VACCINES WITH LOW LEVELS OF RESIDUAL CELL DNA", eingereicht am 1. November 2006, beansprucht Priorität der US-60/732786.
- [62] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467–70.
- [63] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507–10.
- [64] WO90/14837.
- [65] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197–203.
- [66] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673–2680.
- [67] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Hrsg. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [68] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 der Serie *Methods in Molecular Medicine*). ISBN: 1-59259-083-7. Hrsg. O'Hagan.
- [69] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519–25.
- [70] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486–9.
- [71] WO95/11700.
- [72] US patent 6,080,725.
- [73] WO2005/097181.
- [74] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9–10 Juni 2005.*
- [75] US-6630161.
- [76] Han et al. (2004) *Ann N Y Acad Sci* 1031:96–101.
- [77] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20. Auflage, ISBN: 683306472.
- [78] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91–96.
- [79] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645–51.
- [80] WO2005/089837.
- [81] US Patent 6,692,468.
- [82] WO00/07647.
- [83] WO99/17820.
- [84] US Patent 5,971,953.
- [85] US Patent 4,060,082.
- [86] EP-A-0520618.
- [87] WO98/01174.

- [88] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35:69–75.
- [89] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566–77.
- [90] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295–304.
- [91] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728–30.
- [92] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425–9.
- [93] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247–50.
- [94] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234–8.
- [95] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830–6.

### **Schutzansprüche**

1. Immunogene Zusammensetzung, die ein Spalt-Influenza-Virus und eine Öl-in-Wasser-Emulsion umfasst, welche ein Squalen enthält und Tröpfchen mit einem Submikron-Durchmesser aufweist, wobei die Emulsion in ihrer wässrigen Phase ein freies Tensid umfasst, und wobei die Zusammensetzung ein monovalenter Impfstoff ist.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Influenza-Virus einen H5-Influenza-Virus-Subtypen aufweist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das Virus ein H5N1-Stamm ist.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das Virus in einer Zellkultur angezüchtet wird und frei von Ovalbumin, Ovomucoïd und Hühner-DNA ist.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Virus in einer Zellkultur einer Zelllinie angezüchtet wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus MDCK, Vero und PER.C6.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Zusammensetzung weniger als 10 ng zelluläre DNA aus dem Zellkultur-Wirt enthält.
7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Zusammensetzung weniger als 10 ng DNA enthält, die 100 Nukleotide oder länger ist.
8. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung zwischen 0,1 und 20 µg Hämagglutinin pro Virus-Stamm enthält.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei die Zusammensetzung etwa 3,8 µg Hämagglutinin pro Virus-Stamm enthält.
10. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Spalt-Influenza-Virus unter Verwendung der aufeinanderfolgenden Wirkungen von Natrium-Deoxycholat und Formaldehyd erhalten wurde.
11. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung ein monovalenter Impfstoff gegen einen pandemischen Influenza-Virus-Stamm ist.
12. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Öl und das Tensid bioabbaubar und biokompatibel sind.
13. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Tensid in Polyoxyethylen-sorbitanester ist.
14. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Tensid Polysorbat 80 ist.
15. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Emulsion in Tocopherol, wie beispielsweise DL- $\alpha$ -Tocopherol, enthält.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei die Emulsion ferner Squalen und Tween 80 enthält, und wobei das Gewichtsverhältnis von Squalen/Tocopherol  $\leq 1$  ist.

17. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Spalt-Influenza-Virus ausgehend von einem Influenza-Virus hergestellt wird, das ein oder mehrere RNA-Segmente eines A/PR/8/34-Influenza-Virus umfasst.
18. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Spalt-Influenza-Virus ausgehend von einem Influenza-Virus hergestellt wird, das durch reverse genetische Verfahren erhalten wurde.
19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 3 bis 18, wobei die Zellkultur eine Mikrocarrier-Kultur, eine adhärenzte Kultur oder eine Suspensionskultur ist.
20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 3 bis 18, wobei die Zellkultur serumfrei ist.
21. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Emulsion ein 3-O-deacyliertes Monophosphoryl-Lipid A (3dMPL) umfasst.
22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, wobei mindestens 10 Gew.-% des 3dMPL die Hexaacyl-Kettenform aufweist.
23. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung im Wesentlichen frei von Quecksilbermaterial ist.
24. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die einen oder mehrere Puffer umfasst.
25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei der (die) Puffer einen Phosphat-Puffer, einen Tris-Puffer, einen Borat-Puffer, einen Succinat-Puffer, einen Histidin-Puffer oder einen Citrat-Puffer umfasst (umfassen).
26. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die einen pH-Wert zwischen 5,0 und 8,1 aufweist.
27. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die < 1 Endotoxin-Einheit pro Dosis aufweist.
28. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung in einem Dosis-Volumen von etwa 0,5 ml zu verabreichen ist.
29. Kit, umfassend (i) eine erste Kitkomponente, die ein Spalt-Influenza-Virus-Antigen umfasst, welches ein monovalentes Antigen ist; und (ii) eine zweite Kitkomponente, die ein Öl-in-Wasser-Emulsions-Adjuvans umfasst, welches ein Squalen enthält, Tröpfchen mit einem Submikron-Durchmesser aufweist, und in seiner wässrigen Phase ein freies Tensid enthält.
30. Kit nach Anspruch 29, wobei das Tensid ein Polyoxyethylensorbitanester ist.
31. Kit nach einem der Ansprüche 29 bis 30, wobei das Influenza-Virus-Antigen ein monovalentes Antigen gegen einen pandemischen Influenzastamm ist.
32. Kit nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die erste und die zweite Komponente in getrennten Behältern vorliegen.
33. Kit nach Anspruch 32, wobei die Behälter Fläschchen sind.
34. Kit nach Anspruch 33, wobei das Fläschchen 10 Dosen enthält.
35. Kit nach einem der Ansprüche 29 bis 34, wobei die Behälter aus Glas bestehen.
36. Kit nach Anspruch 35, wobei die Behälter aus Borsilikat-Glas bestehen.

Es folgen keine Zeichnungen