



(10) **DE 699 35 606 T9** 2021.03.11

(12) **Berichtigung der Übersetzung
der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 126 876 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 35 606.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/07764**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 97 0607.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/023105**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **27.04.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.03.2007**

(15) Korrekturinformation:

**Berichtigung der Übersetzung der europäischen
Patentschrift**

(48) Veröffentlichungstag der Berichtigung: **11.03.2021**

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

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9822703 **16.10.1998** **GB**

9822709 **16.10.1998** **GB**

9822712 **16.10.1998** **GB**

(73) Patentinhaber:

**GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart,
Brussels, BE**

(74) Vertreter:

**HOFFMANN - EITLE Patent- und Rechtsanwälte
PartmbB, 81925 München, DE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

GARCON, Nathalie, B-1330 Rixensart, BE

(54) Bezeichnung: **ADJUVANZSYSTEME UND IMPFSTOFFE**

Die oben angegebenen bibliografischen Daten entsprechen dem aktuellen Stand zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Berichtigung.

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG (in der Fassung v. 20.12.1991) vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Impfstoffe, Adjuvanssysteme und Verfahren zur Herstellung solcher Impfstoffe und Adjuvanssysteme. Insbesondere umfassen die Impfstoffe und Adjuvanssysteme der vorliegenden Erfindung Aluminiumsalze und 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A.

[0002] Aluminiumsalze sind allgemein fachbekannt als Bereitstellung eines sicheren Exzipienten mit Adjuvansaktivität. Es wird angenommen, daß der Wirkungsmechanismus dieser Adjuvantien die Bildung eines Antigendepots, so daß das Antigen am Injektionsort für bis zu 3 Wochen nach der Verabreichung verbleiben kann, und auch die Bildung von Antigen/Metallsalz-Komplexen einschließt, die leichter durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen werden. Zusätzlich zu Aluminium wurden andere Metallsalze zur Adsorption von Antigenen verwendet, einschließlich Salzen von Zink, Calcium, Cer, Chrom, Eisen und Beryllium. Die Hydroxid- und Phosphatsalze von Aluminium sind die üblichsten.

[0003] Impfstoffformulierungen, die Aluminiumsalze, Antigen und zusätzliches Immunstimulans enthalten, sind fachbekannt. Solche Formulierungen induzierten stärkere Immunreaktionen im Vergleich mit denjenigen, die durch Aluminiumsalze und Antigen allein stimuliert werden. Die Formulierung dieser Impfstoffzubereitungen beinhaltete zuvor ein spezifisches Herstellungsverfahren, da angenommen wurde, daß das Antigen für das Auftreten optimaler Immunreaktionen am gleichen Aluminiumsalzteilchen wie das Immunstimulans adsorbiert werden muß. Wenn auf diese Weise Antigen durch eine Antigen-präsentierende Zelle aufgenommen wird, übt da koadsorbierte Immunstimulans seine stimulierende Aktivität direkt auf die gleiche Antigen-präsentierende Zelle aus.

[0004] Impfstoffformulierungen auf Aluminiumbasis, in denen das Antigen und das Immunstimulans 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL) am gleichen Partikel adsorbiert sind, werden in EP 0 576 478 B1, EP 0 689 454 B1 und EP 0 633 784 B1 beschrieben. In diesen Fällen wird das Antigen zuerst am Aluminiumsalz adsorbiert, gefolgt von der Adsorption des Immunstimulans 3D-MPL an den gleichen Aluminiumsalzpartikeln. Solche Verfahren beinhalten zuerst die Suspension von 3D-MPL durch Ultraschallbehandlung in einem Wasserbad, bis die Partikel eine Größe zwischen 80 und 500 nm erreichen. Das Antigen wird typischerweise an Aluminiumsalz für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren adsorbiert. Die 3D-MPL-Suspension wird dann zum adsorbierten Antigen hinzugegeben, und die Formulierung wird bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert und dann bei 4°C bis zur Verwendung gehalten.

[0005] WO 98/15287 offenbart eine Impfstoffzusammensetzung, die Liposome (einschließlich Sterol), QS21 und Alaun und 3-desacyliertes Monophosphoryllipid A als Adjuvans und ein Antigen umfaßt.

[0006] WO 97/00697 offenbart Impfstoffzusammensetzungen, die ein an Aluminiumphosphat adsorbiertes Polysaccharid-konjugiertes Antigen enthalten.

[0007] WO 96/26741 offenbart Impfstoffzusammensetzungen, die Hepatitis B-Oberflächenantigen in Kombination mit Aluminiumphosphat und 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A enthalten.

[0008] Die Formulierungsverfahren des Standes der Technik liefern wirksame Impfstoffe in immunologischer Hinsicht, jedoch enthalten sie mehrere kommerzielle Nachteile. Für die Eignung eines Impfstoffs für die humane Verabreichung muß das Verfahren gleichförmig sein und der Kontrolle der guten Herstellungspraxis („Good Manufacturing Practice“, GMP) und Qualitätskontrolle („Quality Control“, QC) unterliegen. In einigen Fällen liefern die Verfahren des Standes der Technik einen Impfstoff, in dem das gesamte Antigen oder alle Antigene auf dem gleichen Partikel von Metallsalz adsorbiert sind. Das Verfahren wird dann durch das Erfordernis verkompliziert, daß 3D-MPL am gleichen Metallpartikel adsorbiert sein soll. Dies kann besonders problematisch im Fall von Kombinationsimpfstoffen sein, die multiple Antigene enthalten (deren Adsorption von der Affinität jedes Antigens für das besondere Metallsalz bei einem gegebenen pH abhängig sein kann). Die Verfahren des Standes der Technik können in Abhängigkeit davon, welche Antigene vorhanden sind, Probleme der Reproduzierbarkeit und Impfstoff-QC haben. Falls irgend etwas unerwünschtes mit der QC eines besonderen Antigens oder ein Ereignis, das zur Kontamination des Impfstoffs führen kann, auftritt, kann dies außerdem zur Verschwendung aller individuellen Komponenten und nicht nur des besonderen Antigens führen, in dem das Problem auftrat. Außerdem können Kombinationsimpfstoffe unter manchen Umständen die aufeinanderfolgende Zugabe der Antigene erfordern, wobei ein solches Verfahren äußerst zeitaufwendig und kostspielig ist. Die Verfahren des Standes der Technik können deshalb komplex, schwierig zu steuern und kostspielig sein.

[0009] Überraschend haben die vorliegenden Erfinder festgestellt, daß es nicht notwendig ist, Antigen und das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A an das gleiche Aluminiumpartikel zu adsorbieren. Im Gegensatz zur akzeptierten Ansicht auf diesem Gebiet wurde festgestellt, daß gute Impfstoffe hergestellt werden können, wenn Antigen an besonderen Aluminiumsalzpartikeln adsorbiert wird, die getrennt von denjenigen Aluminiumsalzpartikeln sind, die mit dem 3-des-O-acylierten Monophosphoryllipid A assoziiert sind.

[0010] Das verbesserte Verfahren umfaßt die Adsorption von Immunstimulans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, an ein Aluminiumsalzpartikel, gefolgt von der Adsorption des Antigens an ein anderes Aluminiumsalzpartikel, gefolgt vom Vermischen der diskreten Aluminiumpartikel zur Bildung eines Impfstoffs. Außerdem werden durch die vorliegende Erfindung Impfstoffe bereitgestellt und sind dadurch gekennzeichnet, daß das Immunstimulans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, an Partikeln aus Aluminiumsalz adsorbiert ist und nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an die Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials ein Antigen ist und daß die Partikel aus Aluminiumsalz, die an das Antigen adsorbiert sind, dadurch gekennzeichnet sind, daß nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an die Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials Monophosphoryllipid A ist.

[0011] Entsprechend wird ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs bereitgestellt, umfassend das Vermischen eines Adjuvans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A umfaßt, das an ein Partikel eines Aluminiumsalzes adsorbiert wurde, dadurch gekennzeichnet, daß nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials ein Antigen ist, mit einem Antigen. Bevorzugt wurde das Antigen an ein Aluminiumsalz voradsorbiert. Das Aluminiumsalz kann identisch mit oder ähnlich dem Aluminiumsalz sein, das an das 3-des-O-acylierte Monophosphoryllipid A adsorbiert ist.

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt ferner eine Impfstoffzusammensetzung bereit, die Immunstimulans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, adsorbiert an ein erstes Partikel eines Aluminiumsalzes, und ein Antigen umfaßt, adsorbiert an ein Aluminiumsalz, dadurch gekennzeichnet, daß die ersten und zweiten Partikel aus Aluminiumsalz unterschiedlich sind.

[0013] Alternativ umfassen Impfstoffe, die einen Teil der vorliegenden Erfindung bilden, zwei Hauptpopulationen von Komplexen, einen ersten Komplex, der (a) Immunstimulans umfaßt, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, dadurch gekennzeichnet, daß nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an die Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials ein Antigen ist; und einen zweiten Komplex, der (b) Antigen umfaßt, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel. Auch die Impfstoffzusammensetzung kann zwei Hauptpopulationen von Komplexen umfassen, einen ersten Komplex, der (a) Immunstimulans umfaßt, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, dadurch gekennzeichnet, daß nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials ein Antigen ist; und einen zweiten Komplex, der (b) Antigen umfaßt, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, dadurch gekennzeichnet, das nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an die Aluminiumsalzpartikel fähigen Materials 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist.

[0014] Die in diesen zwei Hauptpopulationen von Komplexen vorhandenen Aluminiumsalze können identisch oder verschieden sein. Außerdem kann im Fall eines Kombinationsimpfstoffs, worin eine Mehrzahl unterschiedlicher Antigene vorhanden sein kann, der zweite Komplex (oben beschrieben) eine Mehrzahl von Antigenen umfassen, die an unterschiedlichen Aluminiumpartikeln adsorbiert sind.

[0015] Wenn nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Partikel aus Aluminiumsalz fähigen Materials Antigen ist, ist es bevorzugt nicht mehr als 10 % und am meisten bevorzugt nicht mehr als 5 %. Alternativ, wenn nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Partikel aus Aluminiumsalz fähigen Materials 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, ist es bevorzugt nicht mehr als 10 % und am meisten bevorzugt nicht mehr als 5 %. Routinetests, die dem Fachmann ersichtlich sind, können zur Bestimmung verwendet werden, ob das Antigen und 3-des-O-acylierte Monophosphoryllipid A an unterschiedliche diskrete Partikel adsorbiert sind, ohne Beschränkung einschließlich die Trennung des Impfstoffs in zwei unterschiedliche Fraktionen durch freien Fluß der Formulierung in einem elektrischen Feld oder durch Techniken wie die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit, die besonders geeignet für nicht-teilchenförmige Antigene sind, gefolgt vom Test auf das 3-des-O-acylierte Monophosphoryllipid A oder Antigen in den Fraktionen.

[0016] Auch bereitgestellt in der vorliegenden Erfindung wird ein Kit, das einen Behälter, der an Aluminiumsalz adsorbiertes 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A aufweist; und einen zweiten Behälter mit an ein Aluminiumsalz adsorbiertem Antigen umfaßt.

[0017] Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders nützlich, wenn Mengen von Kombinationsimpfstoffen im gewerblichen Maßstab erforderlich sind. Kombinationsimpfstoffe sind Einzeldosisimpfstoffe, die mehr als ein Antigen aus mehr als einem Pathogen enthalten. Solche Impfstoffe können die Anzahl der Impfungen reduzieren, die zur Induzierung von Schutz gegen viele Pathogene und Krankheiten erforderlich sind.

[0018] Falls zum Beispiel ein Impfstoff Al(OH)_3 , 3D-MPL und die Antigene V, W, X, Y, Z umfaßt, beinhalten frühere Verfahren das Formulieren der Antigene und des 3D-MPL am gleichen Partikel aus Al(OH)_3 . Solche Verfahren des Standes der Technik erfordern, daß V, W, X, Y, Z an Al(OH)_3 adsorbiert werden, gefolgt von der Zugabe von freiem 3D-MPL zu jedem der voradsorbierten Antigenkomplexe.

[0019] Im Gegensatz werden im erfindungsgemäßen Formulierungsverfahren Antigen V, W, X, Y, Z jeweils individuell an separate Partikel aus Al(OH)_3 in separaten Behältern adsorbiert. 3D-MPL wird ebenfalls an Al(OH)_3 in einem anderen Behälter adsorbiert. Der Impfstoff wird dann durch einfaches Vermischen des aus jedem der separaten Behälter entnommenen Materials gebildet. In diesem Fall können die Partikel aus Al(OH)_3 , das mit dem 3D-MPL assoziiert ist, unterschiedlich gegenüber den Partikeln aus Al(OH)_3 sein, die mit den Antigenen assoziiert sind.

[0020] Alternativ stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs bereit, der 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, Antigen und ein Aluminiumsalz umfaßt, umfassend:

1. Adsorbieren von Antigen an ein erstes Partikel eines Aluminiumsalzes,
2. Adsorbieren der 3-des-O-acylierten Monophosphoryllipid A an ein zweites Partikel eines Aluminiumsalzes und
3. Vermischen der Produkte der obigen Schritte 1 und 2.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen bereit, die die im Stand der Technik vorhandenen Probleme ausräumen. Jeder individuelle Antigen-Aluminiumsalz-Komplex kann GMP-Kontrollen unterliegen, und sollte es eine etwaige nachteilige Kontamination einer besonderen Antigen-Aluminiumsalz-Zubereitung geben, dann wird die Integrität anderer Antigene und von Immunstimulans-Adjuvans nicht beeinträchtigt werden. Überraschend und im Gegensatz zur akzeptierten Annahme auf dem Gebiet sind die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellten Impfstoffe so wirksam wie diejenigen, die unter Verwendung des Verfahrens des Standes der Technik hergestellt werden.

[0022] Monophosphoryllipid A ist eine von Bakterien stammende oder abgeleitete Verbindung mit Adjuvansaktivität. Diese toxische Verbindung wurde zur Bildung weniger toxischer Derivate verändert, und ein solches Derivat ist 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (als 3D-MPL oder d3-MPL bezeichnet, um anzuzeigen, daß Stellung 3 des Glucosamins am reduzierenden Ende des-O-acyliert ist). Zur Herstellung von 3D-MPL siehe GB 2 220 211 A. Chemisch ist es eine Mischung aus 3-desacyliertem Monophosphoryllipid A mit 3, 4, 5 oder 6 acylierten Ketten. Bevorzugt wird in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen MPL aus kleinen Partikeln verwendet. MPL aus kleinen Partikeln hat eine Partikelgröße, so daß es durch ein $0,22 \mu\text{m}$ -Filter sterilfiltriert werden kann. Solche Zubereitungen werden in WO 94/21292 beschrieben. Weitere Verbesserungen werden in GB 9807933.8 beschrieben, das stabile Zubereitungen von 3D-MPL offenbart, die aus den Tri- und Tetraacyl-Gattungsverwandten bestehen.

[0023] GB 2 220 211 A erwähnt, daß die Endotoxizität der zuvor verwendeten enterobakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) reduziert ist, während die immunogenen Eigenschaften bewahrt werden. Jedoch nannte GB 2 220 211 diese Befunde bloß im Zusammenhang mit bakteriellen (Gram-negativen) Systemen.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft das besondere Formulierungsverfahren und die besonderen Eigenschaften des Adjuvans und kann somit mit einer großen Vielzahl von Antigenen verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können für Erst- und Auffrischungsdosen und für die Induzierung von Immunreaktionen gegen eine große Vielzahl von Antigenen und zum Schutz vor Infektion, die dadurch vermittelt wird, verwendet werden. Einige der Pathogene und Antigene werden nachfolgend aufgeführt.

[0025] Virale Hepatitis, die durch die Hepatitisviren A, B, C, D und E verursacht wird, ist eine sehr verbreitete virale Erkrankung. Über die B- und C-Viren ist sie insbesondere auch verantwortlich für viele Fälle von Leberkrebs. Somit ist die Entwicklung von wirksamen Impfstoffen kritisch und, trotz merklicher Erfolge, eine anhaltende Aufgabe. Eine Übersicht über moderne Hepatitisimpfstoffe, die eine Anzahl von Schlüsselliteraturstellen einschließt, kann gefunden werden in Lancet, 12. Mai 1990 auf Seite 1142 ff. (Prof. A.L.W.F. Eddleston). Siehe auch „Viral Hepatitis and Liver Disease“ (B.N. Vyas, J.L. Dienstag und J.H. Hoofnagle, Hrsg. Grune and Strat-

ton, Inc. (1984)) und „Viral Hepatitis and Liver Disease“ (Proceedings of the 1990 International Symposium, Hrsg. F.B. Hollinger, S.M. Lemon und H. Margolis, veröffentlicht von Williams and Wilkins).

[0026] Wie hier verwendet, wird der Ausdruck „Hepatitis B-Antigen“ verwendet, um jedes antigene Material zu bezeichnen, das von einem Hepatitis B-Virus stammt oder abgeleitet ist und verwendet werden kann, um Immunität gegen das Virus im Menschen zu induzieren.

[0027] Infektion mit Hepatitis B-Virus (HBV) ist ein weitverbreitetes Problem, aber Impfstoffe, die für die Massenimmunisierung verwendet werden können, sind jetzt erhältlich, zum Beispiel das Produkt „Engerix-B“ (SmithKline Beecham plc), das durch Gentechnik erhalten wird.

[0028] Die Herstellung von Hepatitis B-Oberflächenantigenen (HBsAg) ist gut dokumentiert. Siehe zum Beispiel Harford et al., *Develop. Biol. Standard* 54, S. 125 (1983), Gregg et al., *Biotechnology*, 5, S. 479 (1987), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108 und Literaturstellen darin.

[0029] Wie hier verwendet, schließt der Begriff „Hepatitis B-Oberflächenantigen“ oder „HBsAg“ jedes HBsAg-Antigen oder Fragment davon ein, das die Antigenität von HBV-Oberflächenantigenen zeigt. Es versteht sich, daß HBsAg wie hier beschrieben zusätzlich zur Sequenz des HBsAg-S-Antigens mit 226 Aminosäuren (siehe Tiollais et al., *Nature*, 317, 489 (1985) und Literaturstellen darin) nach Wunsch die gesamte oder einen Teil einer Prä-S-Sequenz enthalten kann, wie in den obigen Literaturstellen und in EP-A-0 278 970 beschrieben. Insbesondere kann das HBsAg ein Polypeptid umfassen, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die die Reste 12-52 umfaßt, gefolgt von den Resten 133-145, gefolgt von den Resten 175-400 des L-Proteins von HBsAg, relativ zum offenen Leseraster auf einem Hepatitis B-Virus vom ad-Serotyp (dieses Polypeptid wird als L* bezeichnet; siehe EP 0 414 374). HBsAg im Umfang der Erfindung kann auch das in EP 0 198 474 (Endotronics) beschriebene preS1-preS2-S-Polypeptid oder Analoga davon einschließen, wie die in EP 0 304 578 (McCormick and Jones) beschriebenen. HBsAg wie hier beschrieben kann auch Mutanten bezeichnen, zum Beispiel die in WO 91/14703 oder EP 0 511 855 A1 beschriebene „Escape-Mutante“, speziell HBsAg, worin die Aminosäuresubstitution in Position 145 von Glycin zu Arginin ist.

[0030] Normalerweise wird das HBsAg in Partikelform sein. Die Partikel können zum Beispiel S-Protein allein umfassen oder können Verbundpartikel sein, zum Beispiel (L*, S), worin L* wie oben definiert ist und S das S-Protein von HBsAg bezeichnet. Das Partikel ist vorteilhaft in der Form, in der es in Hefe exprimiert wird.

[0031] Die Komponente, die Schutz gegen Hepatitis A liefert, ist bevorzugt das als „Havrix“ (SmithKline Beecham Biologicals) bekannte Produkt, das ein abgetöteter abgeschwächter Impfstoff ist, der aus dem HM-175-Stamm von HAV stammt oder abgeleitet ist [siehe „Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A“ von F.E. Andre, A. Hepburn und E. D'Hondt (1980), *Prog. Med. Virol.*, Bd. 37, S. 72-95 und die Produktmonographie „Havrix“, veröffentlicht von SmithKline Beecham Biologicals (1991)].

[0032] Somit wird in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Kombinationsimpfstoff bereitgestellt, der HBsAg und Hepatitis A-Antigen umfaßt. Auch wird durch die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Hepatitis A- und B-Kombinationsimpfstoffs und ein aus dem Verfahren stammendes Produkt bereitgestellt.

[0033] Andere Kombinationsimpfstoffe sind auf dem Markt verfügbar, einschließlich der Infanrix™-Reihe, hergestellt von SmithKline Beecham Biologicals. Solche Impfstoffe basieren auf einer „Kern“-Kombination aus Diphtherietoxin-, Tetanustoxin- und B. pertussis-Antigenen. Dieser Impfstoff umfaßt eine Pertussiskomponente (entweder abgetötetes ganzzelliges B. pertussis oder azelluläres Pertussis, das typischerweise aus zwei Antigenen, PT und FHA, und häufig 69 kDa besteht, gegebenenfalls mit einem oder beiden aus Agglutinogen 2 oder Agglutinogen 3). Solche Impfstoffe werden häufig als DTPw (ganze Zelle) oder DTPa (azellulär) bezeichnet.

[0034] Besondere Kombinationsimpfstoffe im Umfang der Erfindung schließen ein: Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Hepatitis B (DTP-HB)
Diphtherie-Tetanus-Hepatitis B (DT-HB)
Hib-Hepatitis B
DTP-Hib-Hepatitis B
IPV (inaktivierter Polioimpfstoff)-DTP-Hib-Hepatitis B

[0035] Die Pertussiskomponente ist in geeigneter Weise ein ganzzelliger Pertussisimpfstoff oder ein azellulärer Pertussisimpfstoff, der teilweise oder hochgereinigte Antigene enthält. Die obigen Kombinationen können

optional eine Komponente einschließen, die gegen Hepatitis A schützt. Bevorzugt ist die Hepatitis A-Komponente Formalin-inaktiviertes HM-175. Vorteilhaft wird das HM-175 durch Behandeln des kultivierten HM-175 mit Trypsin, Abtrennen des intakten Virus von kleinem Protease-verdauten Protein durch Permeationschromatographie und Inaktivieren mit Formalin gereinigt. Vorteilhaft ist der Hepatitis B-Kombinationsimpfstoff ein pädiatrischer Impfstoff.

[0036] Andere Kombinationsimpfstoffe der vorliegenden Erfindung werden in GB 9805105.5 (SmithKline Beecham Biologicals s.a.) offenbart, wobei solche Kombinationsimpfstoffe besonders vorteilhaft für Impfstoffe für Heranwachsende sind. Bevorzugte Kombinationen beruhen auf einer „Kern“-Kombination eines Hepatitis B-Antigens (Hep B) und eines Herpes Simplex (HSV)-Antigens. Gegebenenfalls können zu diesem „Kern“ ein oder mehrere Antigene gegeben werden, die aus der folgenden Gruppe stammen oder abgeleitet sind von: Epstein Barr-Virus-(EBV)-Antigen, Hepatitis A-Antigen (HepA), humanes Papilloma Virus-(HPV)-Antigen. Diese Kombinationsimpfstoffe können zusätzlich Varicella Zoster-Virus(VZV), humane Cytomegalovirus- (HCMV) oder Toxoplasma-Antigene umfassen.

[0037] Bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Impfstoffformulierungen ein Antigen oder eine antigene Zusammensetzung, das/die eine Immunreaktion gegen ein humanes Pathogen hervorrufen kann, wobei das Antigen oder die antigene Zusammensetzung von folgendem stammt oder abgeleitet ist: HIV-1 (wie tat, nef, gp120 oder gp160), humane Herpesviren wie gD oder Derivate davon oder unmittelbar frühes Protein wie ICP27 aus HSV1 oder HSV2, Cytomegalovirus (speziell human) (wie gB oder Derivate davon), Rotavirus (einschließlich lebendabgeschwächter Viren), Epstein Barr-Virus (wie gp350 oder Derivate davon), Varicella Zoster-Virus (wie gpl, II und IE63), oder aus einem Hepatitisvirus wie Hepatitis B-Virus (zum Beispiel Hepatitis B-Oberflächenantigen oder ein Derivat davon), Hepatitis A-Virus, Hepatitis C-Virus und Hepatitis E-Virus, oder aus anderen viralen Pathogenen, wie zum Beispiel Paramyxoviren; respiratorischem Synzytialvirus (wie F- und G-Proteine oder Derivate davon), Parainfluenzavirus, Masernvirus, Mumpsvirus, humane Papillomaviren (zum Beispiel HPV6, 11, 16 und 18), Flaviviren (z.B. Gelbfieberevirus, Denguevirus, zeckenbürtiges Enzephalitisvirus, Japanisches Enzephalitisvirus) oder Influenzavirus, oder von Pathogenen stammt oder abgeleitet, wie zum Beispiel *Neisseria* spp., einschließlich *N. gonorrhoea* und *N. meningitidis* (zum Beispiel Kapselpolysaccharide und Konjugate davon, Transferrin-bindende Proteine, Lactoferrin-bindende Proteine, PilC, Adhäsine); *Streptococcus* spp., einschließlich *S. pneumoniae* (zum Beispiel Kapselpolysaccharide und Konjugate davon, PsaA, PspA, Streptolysin, Cholin-bindende Proteine), *S. pyogenes* (zum Beispiel M-Proteine oder Fragmente davon, C5A-Protease, Lipoteichonsäuren), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus* spp., einschließlich *H. influenzae* Typ B (zum Beispiel PRP und Konjugate davon), nicht-typisierbares *H. influenzae* (zum Beispiel OMP26, Adhäsine mit hohem Molekulargewicht, P5, P6, Lipoprotein D), *H. ducreyi*; *Moraxella* spp., einschließlich *M. catarrhalis*, auch bekannt als *Branhamella catarrhalis* (zum Beispiel Adhäsine und Invasine mit hohem und niedrigem Molekulargewicht); *Bordetella* spp., einschließlich *B. pertussis* (zum Beispiel Pertactin, Pertussistoxin oder Derivate davon, filamentöses Hämagglutinin, Adenylatcyclase, Fimbrien), *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., einschließlich *M. tuberculosis* (zum Beispiel ESAT6, Antigen 85A, -B oder -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp., einschließlich *L. pneumophila*; *Escherichia* spp., einschließlich enterotoxischem *E. coli* (zum Beispiel Kolonisierungsfaktoren, hitzelabiles Toxin oder Derivate davon, hitzestabiles Toxin oder Derivate davon), enterohämorrhagisches *E. coli*, enteropathogenes *E. coli* (zum Beispiel Shigatoxin-artiges Toxin oder Derivate davon); *Vibrio* spp., einschließlich *V. cholera* (zum Beispiel Cholera-toxin oder Derivate davon); *Shigella* spp., einschließlich *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp., einschließlich *Y. enterocolitica* (zum Beispiel ein Yop-Protein), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp., einschließlich *C. jejuni* (zum Beispiel Toxine, Adhäsine und Invasine) und *C. coli*; *Salmonella* spp., einschließlich *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., einschließlich *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp., einschließlich *H. pylori* (zum Beispiel Urease, Catalase, vacuolisierendes Toxin); *Pseudomonas* spp., einschließlich *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., einschließlich *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., einschließlich *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., einschließlich *C. tetani* (zum Beispiel Tetanustoxin und Derivate davon), *C. botulinum* (zum Beispiel Botulinumtoxin und Derivate davon), *C. difficile* (zum Beispiel Clostridiumtoxine A oder B und Derivate davon); *Bacillus* spp., einschließlich *B. anthracis* (zum Beispiel Botulinumtoxin und Derivate davon); *Corynebacterium* spp., einschließlich *C. diphtheriae* (zum Beispiel Diphtherietoxin und Derivate davon); *Borrelia* spp., einschließlich *B. burgdorferi* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., einschließlich *E. equi* und des Verursachers der humanen granulozytischen Ehrlichiose; *Rickettsia* spp., einschließlich *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., einschließlich *C. trachomatis* (zum Beispiel MOMP, Heparin-bindende Proteine), *C. pneumoniae* (zum Beispiel MOMP, Heparin-bindende Proteine), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., einschließlich *L. interrogans*; *Treponema* spp., einschließlich *T. pallidum* (zum Beispiel die seltenen Außenmembranproteine), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; oder stammend oder abgeleitet

von Parasiten wie Plasmodium spp., einschließlich *P. falciparum*, Toxoplasma spp., einschließlich *T. gondii* (zum Beispiel SAG2, SAG3, Tg34); Entamoeba spp., einschließlich *E. histolytica*; Babesia spp., einschließlich *B. microti*; Trypanosoma spp., einschließlich *T. cruzi*; Giardia spp., einschließlich *G. lamblia*; Leshmania spp., einschließlich *L. major*; Pneumocystis spp., einschließlich *P. carinii*; Trichomonas spp., einschließlich *T. vaginalis*; Schistosoma spp., einschließlich *S. mansoni*, oder stammend oder abgeleitet von Hefe wie Candida spp., einschließlich *C. albicans*; Cryptococcus spp., einschließlich *C. neoformans*.

[0038] In einem bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffformulierung der Erfindung das HIV-1-Antigen, gp120, speziell bei Expression in CHO-Zellen. In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Impfstoffformulierung der Erfindung gD2t wie hier oben definiert.

[0039] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Impfstoffe, die das beanspruchte Adjuvans enthalten, die HPV-Viren, die als verantwortlich für Genitalwarzen betrachtet werden (HPV6 oder HPV11 und andere), und die HPV-Viren, die für Gebärmutterhalskrebs verantwortlich sind (HPV 16, HPV18 und andere). Besonders bevorzugte Formen von Impfstoff umfassen L1-Partikel oder Capsomere und Fusionsproteine, die ein oder mehrere Antigene umfassen, die aus den HPV6- oder HPV11-Proteinen E6, E7, L1 und L2 ausgewählt sind. Die am meisten bevorzugten Formen von Fusionsprotein sind: L2E7 wie in GB 95 15478.7 offenbart und Protein D(1/3)-E7, offenbart in GB 9717953.5 (WO 99/10375).

[0040] Impfstoffe der vorliegenden Erfindung umfassen ferner Antigene, die von Parasiten stammen oder abgeleitet sind, die Malaria verursachen. Zum Beispiel schließen bevorzugte Antigene aus Plasmodia falciparum RTS,S und TRAP ein. RTS ist ein Hybridprotein, das im wesentlichen den gesamten C-terminalen Anteil des Circumsporozoit-(CS)-Proteins von *P. falciparum* umfaßt, gebunden über vier Aminosäuren des preS2-Anteils von Hepatitis B-Oberflächenantigen an das Oberflächen-(S)-Antigen von Hepatitis B-Virus. Seine volle Struktur wird in der internationalen Patentanmeldung Nr. PCT/EP95/02591 offenbart, veröffentlicht als WO 96/10152 unter Beanspruchung der Priorität aus der GB-Patentanmeldung Nr. 9124390.7. Bei Expression in Hefe wird RTS als Lipoproteinpartikel erzeugt, und wenn es mit dem S-Antigen aus HBV koexprimiert wird, erzeugt es ein als RTS,S bekanntes gemischtes Partikel. TRAP-Antigene werden in der internationalen Patentanmeldung Nr. PCT/GB89/00895 beschrieben, veröffentlicht als WO 90/01496. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Malariaimpfstoff, in dem die antigene Zubereitung eine Kombination der RTS,S- und TRAP-Antigene umfaßt. Andere Plasmodiaantigene, die wahrscheinliche Kandidaten als Komponenten eines mehrstufigen Malariaimpfstoffs sind, sind *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STRAP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/75, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 und ihre Analoga in Plasmodium spp.

[0041] Die Formulierungen können auch ein Antitumorantigen enthalten und nützlich für die immuntherapeutische Behandlung von Krebs sein. Zum Beispiel findet die Impfstoffformulierung Verwendung auch mit Tumorabstoßungsantigenen wie denjenigen für Prostata-, Brust-, kolorektalen, Lungen-, Pankreas-, renalen oder Melanomkrebs. Exemplarische Antigene schließen MAGE1 und MAGE3 oder andere MAGE-Antigene zur Behandlung von Melanom, PRAME, BAGE oder GAGE ein (Robbins und Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, S. 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (eingereicht 1997); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, S. 293). Tatsächlich werden diese Antigene in einer großen Reihe von Tumortypen wie Melanom, Lungenkarzinom, Sarkom und Blasenkarzinom exprimiert. Andere Tumor-spezifische Antigene sind geeignet zur Verwendung mit dem Adjuvans der vorliegenden Erfindung und schließen ohne Beschränkung Prostataspezifisches Antigen (PSA) oder Her-2/neu, KSA (GA733), MUC-1 und karzinoembryonisches Antigen (CEA) ein. Andere Antigene wurden allgemein als krebstherapeutische Antigene dargestellt, einschließlich Tyrosinase und Survivin. Entsprechend wird in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Impfstoff bereitgestellt, der eine erfindungsgemäße Adjuvanzusammensetzung und ein Tumorabstoßungsantigen umfaßt.

[0042] Es wird vorhergesehen, daß erfindungsgemäße Zusammensetzungen zur Formulierung von Impfstoffen verwendet werden, die Antigene enthalten, die von Borrelia sp. stammen oder abgeleitet sind. Zum Beispiel können Antigene Nukleinsäure, von einem Pathogen stammendes oder abgeleitetes Antigen oder antigene Zubereitungen, rekombinant erzeugtes Protein oder Peptide und chimäre Fusionsproteine einschließen. Insbesondere ist das Antigen OspA. Das OspA kann ein vollständiges reifes Protein in einer lipidierten Form; bezeichnet aufgrund der Wirtszelle (*E. coli*) bezeichnet (Lipo-OspA), oder ein nicht-lipidiertes Derivat sein.

[0043] Solche nicht-lipidierten Derivate schließen das nicht-lipidierte NS1-OspA-Fusionsprotein ein, das die ersten 81 N-terminalen Aminosäuren des Nicht-Strukturproteins (NS1) und des Influenzavirus hat, und das

vollständige OspA-Protein, und ein anderes, MDP-OspA, ist eine nicht-lipidierte Form von OspA, die 3 zusätzliche N-terminale Aminosäuren trägt.

[0044] Erfindungsgemäße Impfstoffe können zur Prophylaxe oder Therapie von Allergie verwendet werden. Solche Impfstoffe würden Allergen-spezifische (zum Beispiel Der p1 und pollenbezogene Antigene) und Allergen-unspezifische Antigene (zum Beispiel das Stanworth-Decapeptid) umfassen.

[0045] Die Menge an Antigen in jeder Impfstoffdosis wird als eine Menge ausgewählt, die eine immunprotektive Reaktion ohne signifikante, nachteilige Nebenwirkungen in typischen Impfungen induziert. Eine solche Menge wird in Abhängigkeit davon variieren, welches spezifische Immunogen eingesetzt wird und wie es angeboten wird. Allgemein wird erwartet, daß jede Dosis 1-1000 µg Antigen, bevorzugt 1-500 µg, bevorzugt 1-100 µg und am meisten bevorzugt 1-50 µg umfassen wird. Eine optimale Menge für einen besonderen Impfstoff kann durch Standardstudien sichergestellt werden, die die Beobachtung geeigneter Immunreaktionen in Probanden beinhalten. Nach einer Erstimpfung können Probanden eine oder mehrere Auffrischungsimpfungen in angemessenem Abstand erhalten. Typischerweise wird das Immunstimulans für die humane Verabreichung im Bereich von 1-1000 µg, bevorzugt 10-500 µg, besonders bevorzugt 20-200 µg pro Dosis, besonders bevorzugt 20-100 µg pro Dosis und am meisten bevorzugt 10-50 µg pro Dosis vorhanden sein.

[0046] Die vorliegende Erfindung sieht ferner die erfindungsgemäßen Impfstoffe zur Verwendung in der Medizin vor. Auch vorgesehen ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Impfstoffe in der Herstellung einer immunprophylaktischen und immuntherapeutischen Behandlung von viralen, bakteriellen, parasitischen Infektionen, Allergie oder Krebs. Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung können sowohl für prophylaktische als auch therapeutische Zwecke verwendet werden.

[0047] Die Impfstoffherstellung wird allgemein beschrieben in „Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach“, herausgegeben von M.F. Powell und M.J. Newman; 1995, Pharmaceutical Biotechnology (Plenum Press, New York und London, ISBN 0-306-44867-X).

[0048] Die vorliegende Erfindung wird jetzt ohne Beschränkung durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiel 1, Materialien und Methoden

Serologie

[0049] Die Quantifizierung von Anti-HBs-Antikörper wurde durch ELISA unter Verwendung von HBs (Hep 286) als Hüllantigen durchgeführt. Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % TWEEN 20 enthielt (Sättigungspuffer; 100 µl/Vertiefung). Zweifache Verdünnungen von Seren (ausgehend mit 1/100 Verdünnung) in Sättigungspuffer wurden zu den HBs-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS, 0,1 % TWEEN 20 gespült, und Biotinkonjugiertes Anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b oder -Ig (Amersham, UK), verdünnt 1/1000 in Sättigungspuffer, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Spülschritt wurde Streptavidin-biotinylierter Peroxidasekomplex (Amersham, UK), verdünnt 115000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gespült und für 20 min mit einer Lösung aus o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04 % H₂O₂, 0,03 % in 0,1 % TWEEN 20, 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂SO₄ 2 N angehalten und bei 490/630 nm ausgelesen. ELISA-Titer wurden aus einer Referenz von SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

T-Zellproliferation

[0050] 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden Mäuse getötet, und ihre Milz aseptisch in Gruppen entfernt. Zellsuspensionen wurden in RPMI1640-Medium (GIBCO) hergestellt, das 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 1 % syngenes normales Mäuseserum enthielt. Milzzellen wurden in einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml in 200 µl in Platten mit 96 rundbödigen Vertiefungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-0,03 µg/ml) von HBS-Antigen kultiviert. Jeder Test wurde 4-fach durchgeführt. Nach 96 h Kultur bei 37°C unter 5 % CO₂ wurden die Zellen für 18 h mit ³H-Thymidin (Amersham, UK, 5 Ci/mmol) mit 0,5 µCi/Vertiefung gepulst und dann auf Unifilterplatten (Packard) mit einem Zellernter geerntet. Die aufgenommene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Topcount, Packard) gemessen. Die

Ergebnisse werden in cpm (mittlere Impulse pro Minute in vierfachen Vertiefungen) oder als Stimulationsindizes (mittlere cpm-Werte in Kulturen von Zellen mit Antigen/mittlere cpm-Werte in Kulturen von Zellen ohne Antigen) ausgedrückt.

Cytokinproduktion

[0051] Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milz aseptisch in Ansammlungen entfernt (3 Ansammlungen pro Gruppe). Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO) hergestellt, das 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 5 % fötales Kälberserum enthielt. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml in 1 ml in Platten mit 24 flachbödigen Vertiefungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-0,1 µg/ml) von HBs-Antigen kultiviert. Überstände wurden 96 h später geerntet und bis zum Test auf Gegenwart von IFN γ und IL-5 durch ELISA eingefroren.

IFN γ -Produktion

[0052] Die Quantifizierung von IFN γ erfolgte durch ELISA unter Verwendung von Reagentien von Genzyme. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl von Hamster-Anti-Maus-IFN γ , verdünnt mit 1,5 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5 beschichtet. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit 100 µl von PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen von Überstand aus In-vitro-Stimulation (ausgehend von 1/2) in Sättigungspuffer wurden zu den Anti-IFN γ -beschichteten Platten hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 4-mal mit PBS TWEEN 0,1 % (Waschpuffer) gespült, und Biotin-konjugiertes Ziege-Anti-Maus-IFN γ , verdünnt in Sättigungspuffer auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Spülschritt wurde AMDEX-Konjugat (Amersham), verdünnt 1/10000 in Sättigungspuffer, für 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gespült und mit 50 µl TMB (Biorad) für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂SO₄ 0,4 N angehalten und bei 450/630 nm ausgelesen. Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (Maus-IFN γ -Standard) durch SoftmaxPro (Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

IL-5-Produktion

[0053] Die Quantifizierung von IL-5 erfolgte durch ELISA unter Verwendung von Reagentien von Pharmingen. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl von Ratte-anti-Maus-IL-5, verdünnt auf 1 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5, beschichtet. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit 100 µl PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen von Überstand aus In-Vitro-Stimulation (ausgehend von 1/2) in Sättigungspuffer wurden zu den anti-IFN γ -beschichteten Platten hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 4-mal mit PBS TWEEN 0,1 % (Waschpuffer) gespült, und Biotin-konjugiertes Ratte-anti-Maus-IL-5, verdünnt in Sättigungspuffer auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Spülschritt wurde AMDEX-Konjugat (Amersham), verdünnt 1/10000 in Sättigungspuffer, für 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und mit 50 µl TMB (Biorad) für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂SO₄ 0,4 N angehalten und bei 450/630 nm ausgelesen. Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (rekombinantes Mäuse-IL-5) durch Softmax-Pro (Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

Beispiel 2, Immunogenitätsstudien in Mäusen

[0054] Zur Untersuchung des Konzepts von MPL auf einem festen teilchenförmigen, antigenfreien Träger wurde eine Immunogenitätsstudie in Balb/C-Mäusen unter Verwendung verschiedener Sequenzen von Formulierungen von HABMPL-Impfstoffen durchgeführt:

Tabelle 1: Impfstoffformulierungen

Gruppe	Formulierung
1	(HB-AIPO ₄) + 3D-MPL + (HA-Al(OH) ₃)
2	(3D-MPL-Al(OH) ₃) + (HA-Al(OH) ₃) + (HB-AIPO ₄)
3	(3D-MPL-AIPO ₄) + (HA-Al(OH) ₃), + (HB-AIPO ₄)

Beschreibung des Formulierungsverfahrens:

[0055] Gruppe 1, das Formulierungsverfahren des Standes der Technik. Das Antigen wird zuerst am Metallsalz adsorbiert, gefolgt von der Zugabe von freiem 3D-MPL, was zur Adsorption von 3D-MPL am gleichen Partikel aus Metallsalz wie das Antigen führt.

[0056] Gruppe 2 und 3, das erfindungsgemäße Formulierungsverfahren. Das 3D-MPL wird an einem Partikel aus Metallsalz adsorbiert, die Antigene werden an separaten Partikeln aus Metallsalz adsorbiert, gefolgt vom Vermischen der voradsorbierten Komplexe.

Immunisierungsschema

[0057] Gruppen von 10 Mäusen wurden subkutan zweimal in einem Intervall von 4 Wochen mit Formulierungen auf HAB-Basis immunisiert (1/10 Humandosis, d.h. HAV 72 ELU, HBs 2 µg, MPL 5 µg). Am Tag 14 nach II wurden die lymphoproliferative Reaktion und die Cytokinproduktion (IL5/IFN γ) nach In-vitro-Restimulation von Milzzellen mit HBs und HAV analysiert. Blut wurde aus dem retroorbitalen Sinus am Tag 35 entnommen, und die Antikörperreaktion auf HBs und HAV sowie das induzierte Isotypprofil (nur HBs) wurden durch ELISA überwacht.

Ergebnisse

[0058] Humorale Reaktion (Ig und Isotypen) wurden durch ELISA unter Verwendung von HBs als Hüllantigen für HBV unter Verwendung des Behring-Kits für HAV gemessen. Nur Blutentnahmen 14 Tage nach II wurden analysiert.

[0059] Fig. 1 zeigt Anti-HBs-Ig-Antikörperreaktionen, die an individuellen Seren gemessen wurden und als GMT dargestellt sind.

[0060] Fig. 2 zeigt die Isotypverteilung (IgG1, IgG2a und IgG2b), berechnet aus der Analyse an vereinigten Seren.

[0061] Keine Unterschiede der Antikörpertiter werden zwischen Gruppe 1 und den neuen Formulierungen (Gruppen 2 und 3) beobachtet. Ferner stimulieren die neuen Formulierungen (Gruppen 2 und 3) ähnliche Anteile von IgG1- und IgG2a/b-Isotypen wie diejenigen, die durch die Formulierungen des Standes der Technik stimuliert werden (Gruppe 1).

Zellvermittelte Immunreaktionen

[0062] Zellvermittelte Immunreaktionen (Lymphproliferation und IFN γ /IL-5-Produktion) wurden 14 Tage nach II nach In-vitro-Restimulation von Milzzellen mit HBs- oder HA-Antigenen gemessen. Für jede Gruppe von Mäusen wurden 5 Tiere getötet und die Milz für die Untersuchung in vitro gesammelt.

[0063] Fig. 3 zeigt die in mit HBs restimulierten Milzzellen überwachte Lymphproliferation.

[0064] Fig. 4 zeigt die in mit HBS restimulierten Milzzellen überwachte Cytokinproduktion.

[0065] Keine Unterschiede der lymphoproliferativen Reaktionen können zwischen den Formulierungen beobachtet werden.

[0066] Starke IFN γ -Reaktionen (+/- 1000 pg/ml) wurden bei allen Gruppen beobachtet, außerdem wird kein Unterschied der IL-5-Produktion (unterhalb 60 pg/ml) zwischen den Gruppen beobachtet.

Schlußfolgerungen

[0067] Keine signifikanten Unterschiede der humoralen und zellvermittelten Immunreaktionen auf HBsAg wurden zwischen den HABMPL-Formulierungssequenzen beobachtet.

Beispiel 3, HSV-Impfung von Meerschweinchen

[0068] Das vorhergehende Beispiel zeigte die Wirksamkeit der neuen Formulierungen und Verfahren in bezug auf Hepatitis-Antigene. Dieses Beispiel untersuchte die Immunogenität und Schutzwirksamkeit von Herpes Simplex-Virus-gD-Impfstoffen, die mit Alaun und 3D-MPL im klassischen Verfahren formuliert werden, im Vergleich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die zwei Impfstoffe wurden im intravaginalen HSV-Schutzmodell mit dem Meerschweinchen verglichen.

Gruppe	Formulierungen
4	gD2t (20 µg) + 3D-MPL (50 µg) + Al(OH) ₃ (500 µg)
5	gD2t (20 µg) + Al(OH) ₃ (400 µg) 3D-MPL (50 µg) + Al(OH) ₃ (100 µg)
6	unbehandelt

Experimentelles Protokoll

[0069] Gruppen von 12 weiblichen Hartley-Meerschweinchen wurden zweimal an den Tagen 0 und 28 immunisiert. Am Tag 57 wurden die Tiere intravaginal mit 10⁵ pfu von HSV2 MS-Stamm (100 µl) in Kontakt gebracht. Nach der Exposition wurden die Tiere täglich auf klinische Anzeichen von Primärerkrankung am Tag 4 bis 12 überwacht. Blut wurde aus dem retroorbitalen Sinus an den Tagen 14 und 28 nach der zweiten Immunisierung entnommen, und die Anti-gD-Antikörperreaktion (IgG) wurde durch ELISA überwacht.

Formulierungsverfahren

[0070] gD2t aus HSV2 wurde gemäß den in WO 92/16231 beschriebenen Techniken hergestellt. 3D-MPL wurde von Ribi ImmunoChem Inc., Montana, USA, erworben. Al(OH)₃, wurde von Superfos erworben. Formulierungen wurden 15 Tage vor der ersten Injektion hergestellt. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur unter Rühren durchgeführt.

Gruppe 4, Al(OH)₃ basierte Formulierungen (250 µl/Dosis): klassische Weise

[0071] gD2t (5 µg) wurde an 125 µg Al(OH)₃ für 15 min vor der MPL-Zugabe (12,5 µg) adsorbiert. 30 Minuten später wurde die Formulierung mit einer 10-fach konzentrierten PBS-Lösung von pH 7,4 gepuffert. Nach 15 min wurden 500 µg/ml Phenoxyethanol als Konservierungsmittel hinzugegeben. H₂O+Al(OH)₃+Ag-15m-MPL-30m-10×PBSpH7,4-15m-2-Phenoxy

Gruppe 5, Al(OH)₃ basierte Formulierungen (250 µl/Dosis): neue Weise

[0072] gD2t (5 µg) wurde an 100 µg Al(OH)₃ für 15 min adsorbiert und als konzentrierter Monobulk gelagert. Andererseits wurde MPL (12,5 µg) an 25 µg Al(OH)₃ für 30 min adsorbiert und als anderer konzentrierter Monobulk gelagert. Für die fertige Formulierung wurde das adsorbierte gD2t in H₂O und 10-fach konzentriertem PBS pH 7,4 verdünnt. 15 Minuten später wurde adsorbiertes MPL vor der Phenoxyethanolzugabe als Konservierungsmittel hinzugegeben. Al(OH)₃+Ag Al(OH)₃+MPL H₂O+10×PBS pH 7,4+Ads gD2t-15m-Ads MPL-15m-2-Phenoxy

Probenquantifizierung

[0073] Die Quantifizierung von Anti-gD-Antikörper erfolgte durch ELISA unter Verwendung von gD 43B318 als Hüllantigen. Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immunoplate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen der Seren im Sättigungspuffer wurden zu den gD-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1 % Tween 20 gespült, und Biotin-

konjugiertes Anti-Meerschweinchen-IgG (Amersham, UK), verdünnt 1/10 000 in Sättigungspuffer, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Spülschritt wurde Streptavidin-biotinylierter Peroxydase-Komplex (Amersham, UK), verdünnt 1/1000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gespült und für 20 min mit einer Lösung aus o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04 % H₂O₂, 0,03 % in 0,1 % Tween 20, 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂SO₄ 2 N angehalten und bei 490/630 nm ausgelesen. ELISA-Titer wurden aus einer Referenz durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

Statistische Analyse

[0074] Statistische Analysen wurden an Serologiedaten unter Verwendung von UNISTAT durchgeführt: Das für eine einseitige Varianzanalyse eingesetzte Protokoll kann kurz wie folgt beschrieben werden:

- 1) Logarithmische Transformation der Daten.
- 2) Kolmogorov-Smirnov-Test an jeder Population (Gruppe) zur Verifizierung der Normalität.
- 3) Hartley- und Cochran-Tests zur Verifizierung der Homogenität der Varianz zwischen unterschiedlichen Populationen (Gruppen).
- 4) Varianzanalyse an ausgewählten Daten: 14 Tage nach II oder 28 Tage nach II.

Ergebnisse

Serologie

[0075] Fig. 5 zeigt zum Zeitpunkt nach II an individuellen Seren gemessene Anti-gD-IgG-Antikörperreaktionen.

[0076] Kein auffallender Unterschied der Antikörpertiter wird zwischen allen Formulierungen zum Tag 14 nach II (17090-18508 EU/ml für GMT) oder am Tag 28 nach II (10227-11965 EU/ml für GMT) beobachtet. Die einseitige Varianzanalyse wurde separat an durch jede Impfstoffformulierung hervorgerufenen Anti-gD-IgG-Titern durchgeführt, von beiden Zeitpunkten nach logarithmischer Datentransformation. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Formulierungen wurden detektiert (p-Werte = 0,7397 und 0,5078 für Daten 14 Tage nach II bzw. 28 Tage nach II).

Schutz vor Krankheit

[0077] Schutz gegen Primärerkrankung wurde 4 bis 12 Tage nach der Exposition durch Vergleichen mehrerer Parameter in geimpften und unbehandelten Tieren bewertet:

- Der Prozentanteil an Tieren mit und ohne Läsionen (vaginal oder äußerlich).
- Der primäre Infektionsindex (PI), berechnet für jede Gruppe wie folgt:
 Σ (Bewertungsmaximum \times Auftreten, ausgedrückt in %).
- Die Summe der Läsionsbewertungen (Tag 4 bis 12), ausgedrückt als Medianwert, und die Anzahl der Tiere, die Läsionen zeigen (N).
- Die mittleren kumulativen Bewertungen, berechnet für jede Gruppe zwischen Tag 4 und Tag 12.

Tabelle 2 faßt die Läsionsparameter zusammen

Gruppe	Tiere ohne Läsionen (%)	Vaginale Läsionen (%)	Äußere Läsionen (%)	Primärer Infektionsindex*	Läsions-schwere(n)**
4	66,7	25	8,3	29,2 -97 %	1 (4)
5	83,3	16,7	0	8,3 -99 %	0,5 (2)
6	11,1	0	88,9	844,4	28,3 (8)

Gruppe	Tiere ohne Läsionen (%)	Vaginale Läsionen (%)	Äußere Läsionen (%)	Primärer Infektionsindex*	Läsions-schwere(n)**
* Summe der Läsionsbewertungen für die Tage 4 bis 12 nach der Infektion (Tiere ohne Läsionen wurden nicht berücksichtigt). Läsionsbewertungen: keine Läsion (0), Vaginalläsionen (0,5 oder 1), äußere Haut-vesikel (2, 4, 8 oder 16).					
** Primärer Infektionsindex = (max. Bewertung I) × (Auftreten %); mit I=0, 0,5, 1, 2, 4, 8 oder 16.					

[0078] Fig. 6 zeigt die Kurven der kumulativen Läsionsbewertung nach HSV-Exposition.

[0079] Ein hoher Prozentanteil geimpfter Tiere entwickelte keinerlei Läsion (66 bis 83 %) oder entwickelte vaginale Läsionen. Im Vergleich zeigten 89 % der Tiere der Kontrollgruppe externe Läsionen.

[0080] Eine starke Reduzierung des primären Infektionsindex wurde in geimpften Tieren beobachtet (97 bis 99 %). Dies war von einer sehr geringen Läsionsschwere begleitet, die für die geimpften Gruppen (Medianwert = 0,5 oder 1) im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe (Medianwert = 28) aufgezeichnet wurde.

[0081] Wie durch die Kurven der kumulativen Bewertungen gezeigt wird, ergaben beide Gruppen (4 und 5) einen sehr guten und vergleichbaren Grad an Schutz gegen Primärerkrankung.

Schlußfolgerung

[0082] Alte und neue Verfahren zur HSV-Impfstoffformulierung wurden verglichen. Kein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den zwei Verfahren in beiden IgG-Titern oder im Schutz gegen Primärerkrankung beobachtet.

Beispiel 4, HPV-Impfung von Mäusen

[0083] Verschiedene Sequenzen von Formulierungen (AIOH- oder AlPO₄-basiert) von humanem Papillomavirus E7-Antigen und 3D-MPL wurden in bezug auf ihre Fähigkeit zur Induzierung Antigen-spezifischer humoraler Reaktionen verglichen. Vergleichbare Ig-Titer werden mit Formulierungen mit gemischter Adsorption von 3D-MPL und Protein D1/3-E7 am gleichen Träger (Weg 1) und mit Formulierungen erhalten, in denen 3D-MPL separat an einen antigenfreien Träger adsorbiert wird (Weg 2). Protein D1/3-E7 wurde gemäß dem Verfahren aus WO 99/10375 hergestellt. Die Antigen- und MPL-Formulierungen waren entweder AIOH-basiert oder AlPO₄-basiert. Antigen und 3D-MPL wurden nacheinander an die gleichen Partikel aus Aluminiumsalz adsorbiert (Weg 1), oder separate Adsorptionen erfolgten vor dem Vermischen (Weg 2). Gruppen von 10 Mäusen wurden unter Verwendung der folgenden Formulierungen immunisiert (Beschreibung in Material und Methoden):

Gruppe	Beschreibung	Formulierung
7	ProtD1/3 E7-AIOH	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AIOH
8	ProtD1/3 E7-AIOH/MPL	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AIOH, mit MPL (Weg 1)
9	ProtD1/3 E7-AIOH/ (AlPO ₄ /MPL)	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AIOH, kombiniert mit MPL, adsorbiert an AlPO ₄ (Weg 2)
10	ProtD1/3 E7-AlPO ₄	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AlPO ₄
11	ProtD1/3 E7-AlPO ₄ /MPL	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AlPO ₄ , mit MPL (Weg 1)
12	ProtD1/3 E7-AlPO ₄ / (AIOH/MPL)	5 µ ProtD 1/3 E7, adsorbiert an AlPO ₄ , kombiniert mit MPL, adsorbiert an AIOH (Weg 2)
13	ProtD1/3 E7 o/w	5 µ ProtD 1/3 E7, formuliert in Öl-in-Wasser-Emulsion/3D-MPL/QS21

[0084] Die Mäuse wurden zweimal in einem 21-tägigen Intervall auf dem intramuskulären Weg immunisiert. Seren wurden am Tag 35 (14 Tage nach II) aufgefangen und auf Gegenwart von E7-spezifischen Antikörpern analysiert (siehe Material und Methoden). Die Formulierungen wurden 5 Tage vor der ersten Injektion hergestellt. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur unter Rühren durchgeführt.

Al-basierte Formulierungen (50 µl/Dosis): klassische Weise (Weg 1)

[0085] PD1/3E7 (5 µg) wurde an 50 µg Al(OH)₃ oder AlPO₄ für 30 min vor der MPL-Zugabe (5 µg) adsorbiert. 30 Minuten später wurde die Formulierung mit einer 10-fach konzentrierten Lösung von PO₄, NaCl pH 6,8 gepuffert. Nach 15 min wurden 50 µg/ml Thiomersal als Konservierungsmittel hinzugegeben. H₂O+Al+Ag-30m-MPL-30m-1 0×PNpH6,8-15m-Thio

II. Al-basierte Formulierungen (50 µl/Dosis): neue Weise (Weg 2)

[0086] PD1/3E7 (5 µg) wurde an 10 µg Al(OH)₃ oder AlPO₄ für 30 min adsorbiert und als konzentrierte Monobulks gelagert. Andererseits wurde MPL (5 µg) an 20 µg Al(OH)₃ oder AlPO₄ für 30 min adsorbiert und als weitere konzentrierte Monobulks gelagert. Für die fertigen Formulierungen wurde das adsorbierte Antigen in H₂O und 10-fach konzentrierter Lösung mit PO₄, NaCl pH 6,8 verdünnt, vor Zugabe des adsorbierten MPL und des Rests von Al (20 µg). 13 Minuten später wurden 50 µg/ml Thiomersal als Konservierungsmittel hinzugegeben. Al+Ag Al+MPL H₂O+10×PN pH 6,8+Ads PD1/3E7+Ads MPL+Al-30m-Thio

Serologie

[0087] Die Quantifizierung von Anti-E7-Antikörper erfolgte durch ELISA unter Verwendung von E7 (Bollen) als Hüllantigen. Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 3 µg/ml Carbonatpuffer, pH 9,5 verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen von Seren (beginnend mit 1/100-Verdünnung) im Sättigungspuffer wurden zu den E7-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 3-mal mit PBS 0,1 % Tween 20 gespült, und Biotinkonjugiertes Anti-Maus (IgG1, IgG2a oder IgG2b oder IgGtot) (Amersham, UK), verdünnt 1/5000 in Sättigungspuffer, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Spülschritt wurde Streptavidin-biotinylierter Peroxidasekomplex (Amersham, UK), verdünnt 1/5000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gespült und für 10 min mit TMB (Tetramethylbenzidin) inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂SO₄ 4 N angehalten und bei 450 nm ausgelesen. Mittelpunktverdünnungen wurden durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet.

Ergebnisse

[0088] Die an vereinigten Seren durch ELISA gemessenen Anti-E7-Ig-Titer, ausgedrückt in EU/ml, sind wie folgt:

	E7-AlOH-basierte Formulierungen	E7-AlPO ₄ -basierte Formulierungen
Alaun	4434	1651
Alaun/MPL	10780	12666
Alaun/(Alaun/MPL)	13390	15495

[0089] Vergleichbare Titer werden erhalten, wenn die AlOH-basierten Formulierungen oder die AlPO₄-basierten Formulierungen verglichen werden. Wenn MPL zu den AlOH- oder AlPO₄-Formulierungen hinzugegeben wird, sind die erreichten Titer oberhalb 10 000 EU/ml im Vergleich zu weniger als 5000 EU/ml für die Al-Formulierungen. Vergleichbare Titer werden mit beiden Formulierungssequenzen erhalten.

[0090] Verschiedene Sequenzen von Formulierungen (AlOH- oder AlPO₄-basiert) von Antigen und MPL wurden in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Induzierung der Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern verglichen:

[0091] Alle Formulierungen, die MPL enthalten, induzieren höhere Grade von E7-spezifischem Ig als Alaun-Formulierungen. Vergleichbare Ig-Titer werden mit Formulierungen mit gemischter Adsorption von MPL und pD1/3-E7 am gleichen Träger (Weg 1) und Formulierungen erhalten, in denen MPL separat an einem antigen-freien Träger adsorbiert ist (weg 2).

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- EP 0576478 B1 [0004]
- EP 0689454 B1 [0004]
- EP 0633784 B1 [0004]
- WO 9815287 [0005]
- WO 9700697 [0006]
- WO 96/26741 [0007]
- GB 2220211 A [0022, 0023]
- WO 9421292 [0022]
- GB 9807933 [0022]
- GB 2220211 [0023]
- EP 0226846 A [0028]
- EP 0299108 A [0028]
- EP 0278970 A [0029]
- EP 0414374 [0029]
- EP 0198474 [0029]
- EP 0304578 [0029]
- WO 9114703 [0029]
- EP 0511855 A1 [0029]
- GB 9805105 [0036]
- GB 9515478 [0039]
- GB 9717953 [0039]
- WO 9910375 [0039, 0083]
- EP 95/02591 PCT [0040]
- WO 9610152 [0040]
- GB 9124390 [0040]
- WO 90/01496 [0040]
- WO 9216231 [0070]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Harford et al., Develop. Biol. Standard 54, S. 125 (1983) [0028]
- Gregg et al., Biotechnology, 5, S. 479 (1987) [0028]
- Tiollais et al., Nature, 317, 489 (1985) [0029]
- „Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A“ von F.E. Andre, A. Hepburn und E. D'Hondt (1980), Prog. Med. Virol., Bd. 37, S. 72-95 und die Produktmonographie „Havrix“, veröffentlicht von SmithKline Beecham Biologicals (1991) [0031]
- Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (eingereicht 1997) [0041]
- Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, S. 293 [0041]
- „Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach“, herausgegeben von M.F. Powell und M.J. Newman; 1995, Pharmaceutical Biotechnology (Plenum Press, New York und London, ISBN 0-306-44867-X) [0047]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Impfstoffzusammensetzung, umfassend die Mischung von a) einer Adjuvanzzusammensetzung, umfassend ein Immunstimulans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials ein Antigen ist, und b) einem Antigen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nicht mehr als 5 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials ein Antigen ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Aluminiumsalzpartikelfrei von adsorbiertem Antigen ist.
4. Verfahren zur Herstellung einer Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Antigen des Schritts (b) an das Aluminiumsalzpartikel adsorbiert wird.
5. Verfahren zur Herstellung einer Impfstoffzusammensetzung, umfassend ein Immunstimulans, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist, ein Antigen und ein Aluminiumsalzpartikel, das Folgendes umfasst: (a) Adsorbieren des Antigens an ein erstes Partikel eines Aluminiumsalzes, (b) Adsorbieren des Immunstimulans an ein zweites Partikel eines Aluminiumsalzes und (c) Mischen der Produkte der Schritte (a) und (b).
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Antigen aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: Antigenen, die von humanem Immunschwächevirus, Varicella-Zoster-Virus, Herpes-simplex-Virus Typ 1, Herpes-simplex-Virus Typ 2, humanem Cytomegalievirus, Dengue-Virus, Hepatitis A, B, C oder E, respiratorischem Syncytialvirus, humanem Papillomvirus, Influenza-Virus, Hib, Meningitisvirus, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella oder Toxoplasma stammen oder abgeleitet sind, IgE-Peptiden, Der p1, pollenverwandten Antigenen oder tumorassoziierten Antigenen (TAA), MAGE, BAGE, GAGE, MUC-1, Her-2 neu, LnRH(Gn-RH), CEA, PSA, KSA oder PRAME.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Antigen eine Kombination von Hepatitis-A-Antigen und Hepatitis-B-Antigen ist.
8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Antigen Hepatitis-B-Oberflächenantigen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Antigen von humanem Papillomvirus stammt oder abgeleitet ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das humane Papillomvirus-Antigen von HPV6, 11, 16 oder 18 stammt oder abgeleitet ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei das humane Papillomvirus-Antigen ein L1 -Partikel oder Capsomer ist.
12. Impfstoff, der nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 herstellbar ist.
13. Impfstoffzusammensetzung, umfassend zwei Hauptpopulationen von Komplexen, einen ersten Komplex, der a) ein Immunstimulans umfasst, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials ein Antigen ist; und einen zweiten Komplex, der b) ein Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst.
14. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 13, umfassend zwei Hauptpopulationen von Komplexen, einen ersten Komplex, der a) ein Immunstimulans umfasst, das 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials ein Antigen ist; und einen zweiten Komplex, der b) ein Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 20 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist.
15. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14, wobei der zweite Komplex b) Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 5 Massen-% des

gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist.

16. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 15, wobei der zweite Komplex b) Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Aluminiumsalzpartikel frei von adsorbiertem 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A ist.

17. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei der erste Komplex a) ein Immunstimulans, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass nicht mehr als 5 Massen-% des gesamten, zur Adsorption an das Aluminiumsalzpartikel befähigten Materials ein Antigen ist.

18. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 17, wobei der erste Komplex a) ein Immunstimulans, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Aluminiumsalzpartikel frei von adsorbiertem Antigen ist.

19. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei das in dem ersten und dem zweiten Komplex vorliegende Aluminiumsalz identisch ist.

20. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei der zweite Komplex eine Mehrzahl Subkomplexe umfasst, wobei jeder Subkomplex ein anderes Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalzpartikel, umfasst.

21. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das Aluminiumsalz Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat ist.

22. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 21, wobei das Aluminiumsalz Aluminiumhydroxid ist.

23. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei das Antigen aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: humanem Immunschwächevirus, Varicella-Zoster-Virus, Herpes-simplex-Virus Typ 1, Herpes-simplex-Virus Typ 2, humanem Cytomegalievirus, Dengue-Virus, Hepatitis A, B, C oder E, respiratorischem Syncytialvirus, humanem Papillomvirus, Influenza-Virus, Hib, Meningitisvirus, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella oder Toxoplasma, Stanworth-Decapeptid, Der p1, pollenverwandten Antigenen oder krebsassoziierten Antigenen, MAGE, BAGE, GAGE, MUC-1, Her-2 neu, LnRH(GnRH), CEA, PSA, Tyrosinase, Survivin, KSA oder PRAME.

24. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Antigen eine Kombination von Hepatitis-A-Antigen und Hepatitis-B-Antigen ist.

25. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Antigen Hepatitis-B-Oberflächenantigen ist.

26. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Antigen von humanem Papillomvirus stammt oder abgeleitet ist.

27. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 26, wobei das humane Papillomvirus-Antigen von HPV6, 11,16 oder 18 stammt oder abgeleitet ist.

28. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 26 oder 27, wobei das humane Papillomvirus-Antigen ein L1-Partikel oder Capsomer ist.

29. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 23, wobei das Antigen ein Plasmodium-Antigen ist, bei dem es sich um ein oder mehrere Antigene handelt, das/die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist/sind: RTS, S und TRAP.

30. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 29 zur Verwendung in der Medizin.

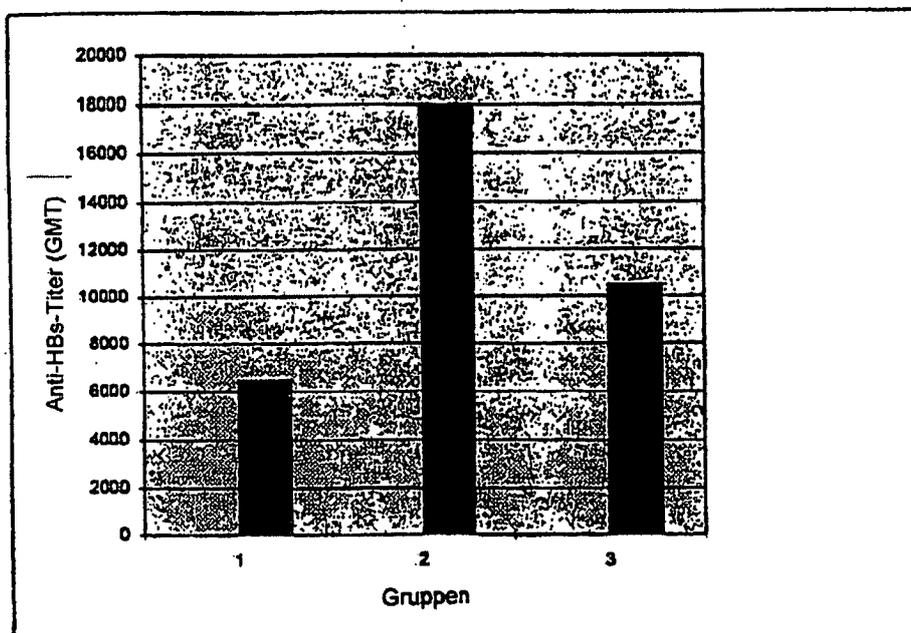
31. Verwendung einer Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 29 zur Herstellung eines Medikaments, das sich zur Prophylaxe oder Behandlung viraler, bakterieller, parasitischer Infektionen, von Allergie oder Krebs eignet.

32. Kit, umfassend zwei Behälter, wobei ein Behälter 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A, adsorbiert an ein Aluminiumsalz, aufweist und der zweite Behälter Antigen, adsorbiert an ein Aluminiumsalz, aufweist.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

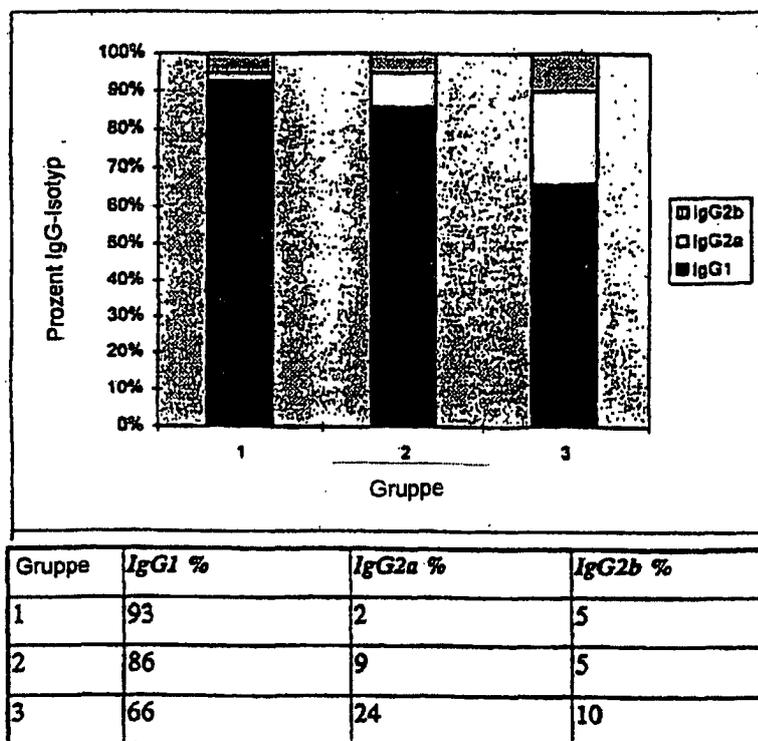
Anhängende Zeichnungen

Figur 1 zeigt Anti-HBs-Ig-Antikörperreaktionen, gemessen an individuellen Seren und dargestellt als GMT.

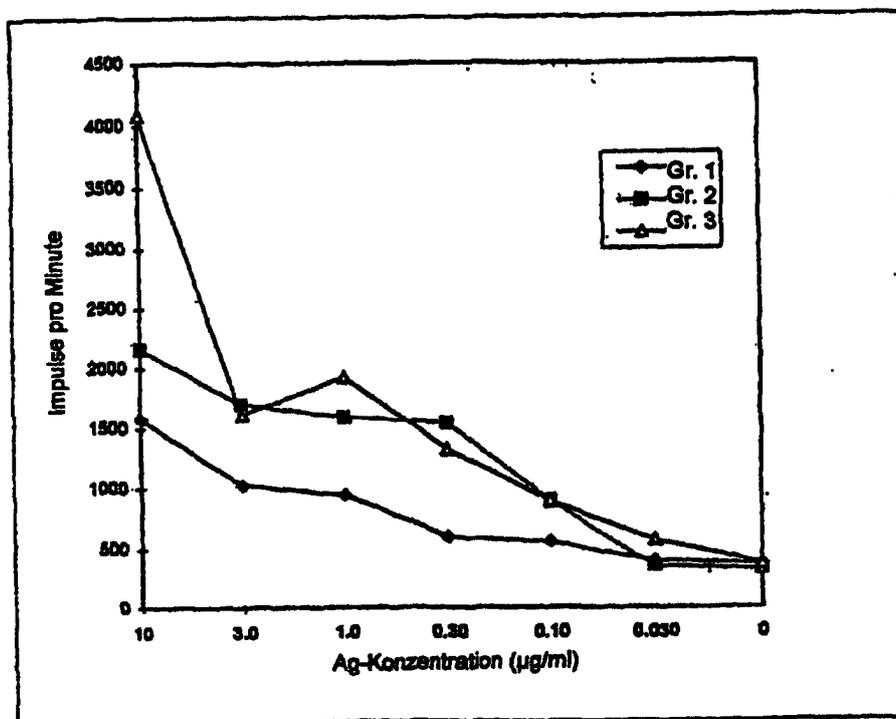


Gruppe	ELISA-Titer (GMT)
1	6495
2	18006
3	10496

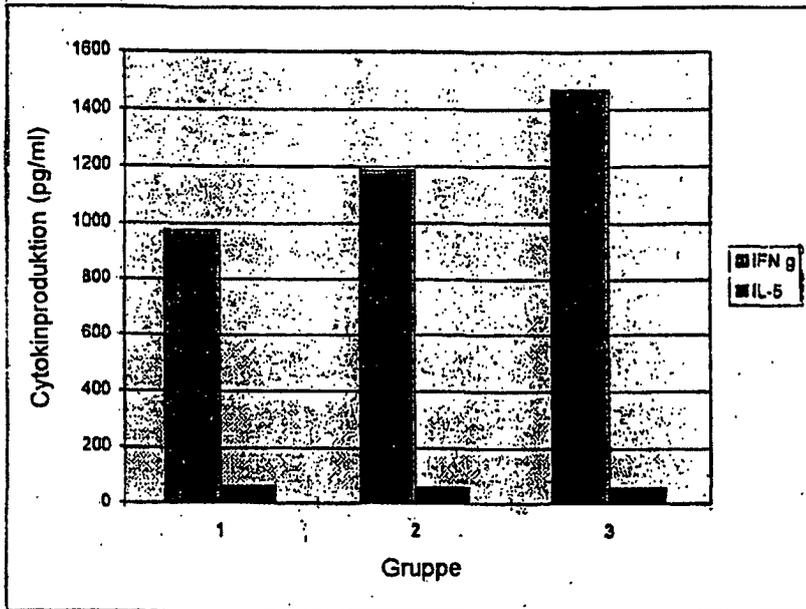
Figur 2 zeigt die Isotypverteilung (IgG1, IgG2a und IgG2b), berechnet aus der Analyse an vereinigten Seren.



Figur 3 zeigt die in mit HBs restimulierten Milzzellen überwachte Lymphproliferation.



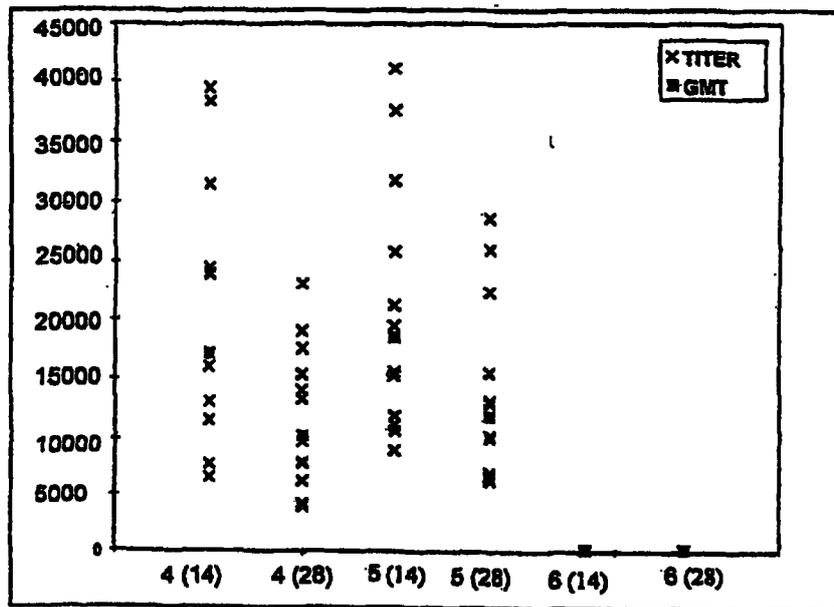
Figur 4 zeigt die in Milzzellen, die mit HBs restimuliert wurden, überwachte Cytokinproduktion.



Cytokin (pg/ml)		Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3
IFN g	HBsAg 10µg/ml	975	1187	1465
	leer	157*	173*	173*
IL-5	HBsAg 10µg/ml	64*	59*	59*
	leer	64*	59*	59*
Verhältnis IFNg/IL-5		15:1	20:1	25:1

* = Bestimmungsgrenze

Figur 5, Anti-HSV-gD-Titer (siehe Beispiel 3)



Gruppe (Blutentnahmeschema)	ELISA-Titer	
	GMT	Durchschnitt
4 (14 Tage nach II)	17090	20336
4 (28 Tage nach II)	10227	11825
5 (14 Tage nach II)	18508	20903
5 (28 Tage nach II)	11965	13796
6 (14 Tage nach II)	200	200
6 (28 Tage nach II)	200	200

Figur 6, mittlere kumulative HSV-Läsionsbewertungen (siehe Beispiel 3)

