



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 02 650 T2 2004.03.11

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 097 721 B1

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 9/113

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 02 650.7

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 123 909.4

(96) Europäischer Anmeldetag: 03.11.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.05.2001

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 14.05.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11.03.2004

(30) Unionspriorität:  
31612199 05.11.1999 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
BE, DE, DK, ES, FR, GB, IT, NL

(73) Patentinhaber:  
NOF Corp., Tokio/Tokyo, JP; Juridical Foundation  
The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute,  
Kumamoto, JP

(72) Erfinder:  
Saito, Koichi, Amagasaki-shi, JP; Kishimoto,  
Yoko, Akashi-shi, JP; Miyahara, Tokuji,  
Kikuchi-gun, JP; Takase, Kouzou, Kikuchi-gun,  
Kumamoto 869-1236, JP

(74) Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

(54) Bezeichnung: Öladijuvierter Impfstoff

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Öladjuvansimpfstoff. Genauer bezieht sich die vorliegende Erfindung auf einen Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs, der in der Adjuvanswirkung und der Stabilität als Zubereitung überlegen ist.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0002] Von Öladjuvansimpfstoffen ist seit langem bekannt, daß sie die Immunität wirkungsvoll verstärken. Insbesondere das Freundsche Adjuvans zeigt eine äußerst überlegene immunitätsverstärkende Wirkung, wenn ein inaktiviertes Antigen verwendet wird, und ist ein bei Tierversuchen breit verwendetes, repräsentatives Adjuvans. Da dieses Adjuvans jedoch auch starke Nebenwirkungen wie etwa schwere Abszesse und Granulome hervorruft, wird es nur in Laboratorien verwendet.

[0003] So sind viele Versuche unternommen worden, derartige Nebenwirkungen zu verringern und ein Öladjuvans zum allgemeinen Gebrauch anzuwenden. Öladjuvantien weisen verschiedene Zubereitungstypen wie etwa ein w/o-Typ wie das Freundsche Adjuvans, ein in der Sicherheit überlegener o/w-Typ, ein komplexer w/o/w-Typ und dergleichen auf.

[0004] Zum Beispiel berichtet die JP-B-6-81731 über ein Öladjuvans des w/o-Typs, das wasserfreien Mannitolsäureester als Tensid und Flüssigparaffin als Ölkomponente enthält und die WO91/00107 (japanische PCT-Anmeldung, offengelegt unter Kohyo Nr. 4-506521) berichtet über ein niedrigviskoses Öladjuvans des w/o-Typs, das ein metabolisierbares Öl wie etwa Pflanzenöl und ein nicht metabolisierbares Öl wie etwa Mineralöl in Kombination als Ölkomponente enthält.

[0005] Außerdem offenbart die WO90/14837 ein Adjuvans des o/w-Typs als Adjuvanzubereitung, das eine Emulsion aus Submikron-Öltropfen enthält und die EP-A-315 153 offenbart ein Impfstoffadjuvans des o/w-Typs, das einen Emulgator, der ein POP-POE-Blockpolymer enthält und ein Glycopeptid als Immunstimulans enthält.

[0006] Von diesen Adjuvantien zeigt das Öladjuvans des w/o-Typs eine hohe immunverstärkende Wirkung, weist aber aufgrund der kontinuierlichen Ölphase der Zubereitung die Tendenz auf, an der Injektionsstelle zu verbleiben. In nicht seltenen Fällen entwickelt es einen sterilen Abszeß und ein Granulom in der Nähe einer Impfstelle und verursacht möglicherweise einen scharfen Schmerz während der Impfung. Daher ist dieser Typ Öladjuvans in eingeschränktem Gebrauch als Zubereitung, die das direkte Einimpfen in einen Körper erlaubt. Ein Öladjuvans des o/w-Typs zeigt eine leichte topische Reaktion an der Injektionsstelle und ist in der Sicherheit überlegen. Da jedoch ein Antigen in einer kontinuierlichen Phase enthalten ist, diffundiert es rasch an der Injektionsstelle, was es schwierig macht, eine ausreichende Wirkung zu liefern und oft ein spezielles Immunstimulans erfordert.

[0007] Im Hinblick auf die vorstehende Lage befindet sich in den letzten Jahren ein neuer Typ Öladjuvans, ein Öladjuvans des w/o/w-Typs in Untersuchung.

[0008] Zum Beispiel offenbart die WO91/00106 eine Mehrphasenemulsion des w/o/w-Typs, die beim Aussetzen gegenüber der Körpertemperatur des Tieres nach der Injektion ein w/o-Typ wird. Diese Technik versagt beim Lösen aller mit herkömmlichen Öladjuvantien des w/o-Typs verbundener Probleme wie etwa der topischen Reaktion und dergleichen, da in dem Körper ein Öladjuvans in Form eines Adjuvans des w/o-Typs vorliegt.

[0009] Da ein Öladjuvans des w/o/w-Typs die Form einer komplexen Emulsion annimmt, kann die Stabilität als Zubereitung verglichen mit Öladjuvantien des w/o-Typs und o/w-Typs nicht leicht aufrecht erhalten werden. Daher stellt ein Öladjuvansimpfstoff vom w/o/w-Typ, von dem erwartet wird, daß er gleichzeitig die charakteristischen Merkmale eines w/o-Typs, der eine überlegene Adjuvanseigenschaft zeigt, als auch eines in der Sicherheit überlegenen o/w-Typs zeigt, viele zu lösende Probleme, bevor er die Entwicklung eines Öladjuvans ermöglicht, das wohl ausgeglichene Eigenschaften beider Typen zeigt.

[0010] Die Erfinder haben im USP-5 814 321 einen in der Sicherheit und Zubereitungsstabilität überlegenen Öladjuvansimpfstoff des w/o-Typs und einen durch Dispergieren des w/o-Impfstoffs in einer wäßrigen Phase erhaltenen Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs vorgestellt.

[0011] Die JP-A-11-106351 offenbart einen A (10–90 Gew.-% eines Ölbestandteils, der bei gewöhnlicher Temperatur als Flüssigkeit auftritt), B (0,5–30 Gew.-% eines Emulgators, der aus nichtionischen Tensiden ausgewählt ist) und C (ein wäßriger Bestandteil, der 0,1–30 Gew.-% Polyethylenglykol und eine biologisch annehmbare, wirksame Menge Antigen enthält) enthaltenden Öladjuvansimpfstoff.

[0012] Ein durch eine herkömmliche Technik hergestellter Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs zeigt in Abhängigkeit von der Formulierung und dem Herstellungsverfahren jedoch eine große Schwankung bei den Eigenschaften. Sie ist mit den Problemen verbunden, daß eine Antigenkomponente verglichen mit einem Ölad-

juvans des w/o-Typs manchmal die Viskosität auffallend erhöht und eine stabile Einführung der Immunität nicht möglich ist.

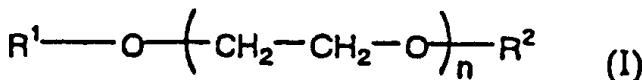
## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher das Bereitstellen eines Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs, der in der Lagerstabilität als Zubereitung und der topischen Reaktion an der Injektionsstelle verbessert ist und eine hohe immunologische Wirkung zeigt.

[0014] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Öladjuvansimpfstoß des w/o/w-Typs bereitgestellt, der in einer äußeren wässrigen Phase eine spezielle Menge eines Polyethylenglykolderivats mit einem speziellen Molekulargewicht umfaßt, wobei der Impfstoff eine hohe Stabilität als Zubereitung, eine überlegene Sicherheit vor einer topischen Reaktion und dergleichen und eine hohe immunverstärkende Wirkung zeigt.

[0015] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung folgendes bereit.

(1) Einen Öladjuvansimpfstoß des w/o/w-Typs mit einer äußeren wässrigen Phase, die 0,5 bis 20 Gew.-% eines Polyethylenglykoderivats mit einem Molekulargewicht von 400 bis 20000 umfaßt, das durch die folgende Formel (I) dargestellt wird:



wobei R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sein können und jeweils ein Wasserstoffatom oder Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und n ein Polymerisationsgrad ist, und einer inneren wässrigen Phase, die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens enthält.

(2) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (1), wobei das Polyethylenglykoderivat der Formel (I) ein Molekulargewicht von 1000 bis 10000 hat.

(3) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (1), wobei die äußere wässrige Phase 1–10 Gew.-% des Polyethylenglykoderivats der Formel (I) enthält.

(4) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (1), bei dem es sich um einen Öladjuvansimpfstoß des w/o/w-Typs handelt, der durch Dispergieren oder Emulgieren einer w/o-Emulsion hergestellt wird, die aus einer Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, einem Emulgator (B) und einer wässrigen Komponente (C), die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens enthält, in einer Flüssigkeit, die einen Emulgator (D) und eine wässrige Komponente (E) enthält, hergestellt wird, wobei die Flüssigkeit 0,5–20 Gew.-% des Polyethylenglykoderivats der Formel (I) mit einem Molekulargewicht von 400–20000 enthält.

(5) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (1), bei dem es sich um einen Öladjuvansimpfstoß des w/o/w-Typs handelt, der durch Dispergieren oder Emulgieren einer w/o-Emulsion hergestellt wird, die aus einer Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, einem Emulgator (B) und einer wässrigen Komponente (C), die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens enthält, in einer Flüssigkeit, die einen Emulgator (D) und eine wässrige Komponente (E) enthält, und

anschließend Hinzufügen des Polyethylenglykoderivats der Formel (I), das ein Molekulargewicht von 400–2000 aufweist, zu der äußeren wässrigen Phase in einer Konzentration von 0,5–20 Gew.-% hergestellt wird.

(6) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (4) oder (5), wobei die Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, einen Fettsäureester und/oder Squalen in einem Anteil von nicht weniger als 20 Gew.-% der Ölphase enthält.

(7) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (4) oder (5), wobei der Emulgator (B) ein HLB von weniger als 10 hat.

(8) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (7), wobei der Emulgator (B) wenigstens einen Vertreter umfaßt, der aus einem partiellen Ester eines mehrwertigen Alkohols und einer Fettsäure sowie einem nichtionischen Tensid mit einer Polyoxyethylenkette ausgewählt ist.

(9) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (4) oder (5), wobei der Emulgator (D) ein HLB von nicht weniger als 10 hat.

(10) Der Öladjuvansimpfstoß aus vorstehend (9), wobei der Emulgator (D) ein nichtionisches Tensid mit einer Polyoxyethylenkette enthält.

## GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0016] Der Öladjuvansimpfstoß der vorliegenden Erfindung wird durch Dispergieren oder Emulgieren (Schritt 2) einer W/O-Emulsion, die aus einer Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, einem Emulgator (B) und einer wässrigen Komponente (C), die eine biologisch annehmbare und wirksame Menge eines Antigens enthält hergestellt ist (Schritt 1), in einer Flüssigkeit, die einen Emulgator (D) und einen wässrigen Be standteil (E) enthält, hergestellt, wobei eine äußere, wässrige Phase des schließlich erhaltenen Öladjuvan-

simpfstoß des w/o/w-Typs eine spezielle Menge eines Polyethylenglykolderivats mit einem speziellen Molekulargewicht enthält.

[0017] Die Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, stellt eine kontinuierliche Phase der in Schritt 1 hergestellten w/o-Emulsion dar und stellt eine Ölphase dar, die eine Dispersionsphase des in Schritt 2 erhaltenen Öladjuvansimpfstoß des w/o/w-Typs wird. In der vorliegenden Erfindung wird unter Ölphase eine Ölphase in diesem Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs verstanden. In dieser Beschreibung wird unter „bei Raumtemperatur“ eine Temperatur in dem Bereich von 15–25°C verstanden. Die Ölkomponente (A), die bei Raumtemperatur flüssig wird, kann zur Verwendung aus Ester- und Nicht-Esterölgrundlagen ausgewählt werden, die herkömmlicherweise für Nahrungsmittel, pharmazeutische Produkte, Kosmetika und dergleichen verwendet werden und bei Raumtemperatur flüssig werden.

[0018] Die Nicht-Esterölgrundlage, die bei Raumtemperatur flüssig wird, kann zum Beispiel ein Kohlenwasserstoff wie etwa leichtes Flüssigparaffin, Squalen, Squalan, Polybuten und dergleichen, eine Fettsäure wie etwa eine gesättigte mittelkettige Fettsäure (z. B. Caprylsäure, Caprinsäure und dergleichen), langkettige, ungesättigte Fettsäure (z. B. Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure und dergleichen), ein mittelkettiger oder langketiger aliphatischer Alkohol und dergleichen sein. Beispiele der Esterölgrundlage, die bei Raumtemperatur flüssig ist, schließen sowohl verschiedene, aus einer gesättigten, mittelkettigen Fettsäure wie etwa Caprylsäure und Caprinsäure oder einer ungesättigten, langkettigen Fettsäure wie etwa Ölsäure und Linolsäure und einem Alkohol abgeleitete Fettsäureester als auch natürlich vorkommende Fettsäureester wie etwa flüssiges Pflanzenöl (z. B. Erdnussöl, Olivenöl, Distelöl, Sonnenblumenöl, Jojobaöl und dergleichen) ein flüssiges Öl aus Tieren wie etwa Kaiserbarschöl und dergleichen ein.

[0019] Als Ölkomponente (A) kann eines der vorstehenden Beispiele verwendet werden oder zwei oder mehr aus den vorstehenden Beispielen können gemischt und verwendet werden. Von diesen Ölkomponenten weist ein Öl wie etwa Fettsäureester, ein Pflanzenöl und Squalen vorteilhafterweise eine verhältnismäßig hohe Oxidationsbeständigkeit und hohe Affinität zum Körper auf. Als zu dem Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung zu verwendende Ölkomponente wird/werden daher vorzugsweise eines oder mehrere aus diesen Ölen ausgewählt. Insbesondere ist als Fettsäureester eine Ölgrundlage, die aus einer veresterten Verbindung einer ungesättigten cis-Δ9-Fettsäure mit 16 bis 22 Kohlenstoffatomen, die auch ein Bestandteil eines biologischen Lipids ist, und einem Alkohol mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen hergestellt wurde, bevorzugt.

[0020] Weiterhin kann der endgültige Öladjuvansimpfstoff Nebenwirkungen wie etwa eine topische Reaktion und dergleichen weiter verringern und die Sicherheit erhöhen, indem er einen Fettsäureester und/oder Squalen in einer Ölphase wenigstens in einem Anteil von nicht weniger 20 Gew.-% enthält. Wenn ein Fettsäureester und Squalen gleichzeitig verwendet werden, sollte deren Gesamtmenge wenigstens nicht weniger als 20 Gew.-% der Ölphase betragen.

[0021] In der vorliegenden Erfindung können ein oder mehr Tenside, die beim Körper eine hohe Sicherheit zeigen und im allgemeinen für pharmazeutische Produkte und Lebensmittel verwendet werden, ausgewählt und als Emulgator (B) und Emulgator (D) als Bestandteil eines Öladjuvansimpfstoßes verwendet werden.

[0022] Der Emulgator (B) wird in Schritt 1 zur Herstellung einer aus einer Antigen enthaltenden, wäßrigen Komponente (C) und einer Ölkomponente (A) bestehenden w/o-Emulsion verwendet.

[0023] Ein als Emulgator (B) verwendetes Tensid ist im Hinblick auf die Stabilität des fertigen Öladjuvansimpfstoßes des w/o/w-Typs vorzugsweise lipophil. Das heißt, es weist vorzugsweise ein verhältnismäßig niederes HLB (Hydrophilie-Lipophilie-Gleichgewicht), insbesondere bevorzugt ein HLB von weniger als 10 auf. Der Emulgator (B) kann von einer einzigen Art oder eine Kombination zweier oder mehrerer Arten sein. In diesem Fall wird der Emulgator (B) vorzugsweise gewählt, um das Gesamt-HLB weniger als 10 zu machen.

[0024] Genauer werden ein partieller Ester eines mehrwertigen Alkohols und einer Fettsäure wie etwa Sorbitanfettsäureester (z. B. Sorbitanmonooleat, Sorbitandioleat, Sorbitansesquioleat usw.), Glycerinfettsäureester (z. B. Glycerinmonooleat usw.), Polyglycerinfettsäureester (z. B. Diglycerinmonooleat, Diglycerindioleat usw.) und dergleichen, ein nichtionisches Tensid mit einer Polyoxyethylenkette im Molekül wie etwa Polyoxyethylen-sorbitanfettsäureester (Polysorbat) [z. B. Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat usw.], Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl, Polyoxyethylenpolyoxypropylenglykol und dergleichen verwendet. Ein natürlich vorkommendes Lecithin enthaltendes Glycerophospholipid kann ebenfalls verwendet werden.

[0025] Von diesen werden ein partieller Ester eines mehrwertigen Alkohols mit 3 bis 10 Hydroxygruppen im Molekül wie etwa Sorbitan, Glycerin und Polyglycerin und einer Fettsäure mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen und ein Hydroxyfettsäuretriglycerid mit einer angefügten Polyoxyethylenkette, das durch Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl dargestellt wird, besonders in Kombination verwendet, so daß das Gesamt-HLB des Emulgators (B) kleiner als 10 ist. Auf diese Weise kann ein Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs mit viel höherer Stabilität als Zubereitung erhalten werden.

[0026] In der vorliegenden Beschreibung wird das HLB gemäß der von W. C. Griffin [W. C. Griffin, J. Soc. Cosmetic. Chemists, 1, 311 (1949)] vorgeschlagenen Formel bestimmt.

[0027] Zur Herstellung des Öladjuvansimpfstoßes der vorliegenden Erfindung wird eine Emulgatorzusammensetzung als Komponente verwendet, die eine Antigenlösung enthaltende w/o-Emulsion darstellt und durch Vor-

mischen einer Aminosäure oder eines Salzes davon und einer wäßrigen Lösung, die einen nicht-reduzierenden Zucker oder Zuckeralkohol mit mindestens 5 Hydroxygruppen im Molekül enthält, und eines partiellen Esters eines mehrwertigen Alkohols mit 3 oder mehr Hydroxygruppen und einer Fettsäure, die ein nichtionisches Tensid ist, das bei Raumtemperatur flüssig wird, zusammen mit dem vorstehend angeführten Emulgator (B) zum Verstärken der Wirksamkeit des Öladijuvans und der Zubereitungsstabilität erhalten wird. Die Aminosäure oder ein Salz davon und der in Form einer wäßrigen Lösung verwendete Zucker oder Zuckeralkohol können aus den im allgemeinen für Nahrungsmittel und pharmazeutische Produkte verwendeten, in der japanischen Pharmakopoe und dem japanischen Kodex pharmazeutischer Wirkstoffen aufgeführten ausgewählt werden. Die hier verwendete Antigenlösung kann jede Form aufweisen, solange sie eine Flüssigkeit ist und wird durch eine Lösung, Suspension und dergleichen veranschaulicht. Die Aminosäure oder ein Salz davon können zum Beispiel Glycin, Alanin, Argininhydrochlorid, Histidin, Phenylalanin, Natriumaspartat, Kaliumaspartat, Natriumglutamat, Kaliumglutamat oder ein Hydrat davon sein, wobei der Zucker und Zuckeralkohol vorzugsweise aus Trehalose, Xylit, Sorbit, Mannit, Maltit, Lactit und dergleichen ausgewählt sind.

[0028] Die vorstehend angeführte Emulgatorzusammensetzung wird durch Herstellen einer die vorstehend angeführte Aminosäure oder ein Salz davon enthaltende wäßrige Lösung und Mischen und Rühren der wäßrigen Lösung mit dem vorstehend angeführten, nichtionischen Tensid in einem Gewichtsverhältnis von 10 : 1–1 : 1 (wässrige Lösung : Tensid) erhalten. Die Emulgatorzusammensetzung wird in einem Anteil von etwa 1–20 Gew.-%, vorzugsweise etwa 2–10 Gew.-% einer eine Antigenlösung enthaltenden w/o-Emulsion verwendet.

[0029] Der Emulgator (D) wird in Schritt 2 zum Dispergieren oder Emulgieren der vorstehend angeführten w/o-Emulsion in einer einen Emulgator (D) und eine wäßrige Komponente (E) enthaltenden Flüssigkeit verwendet.

[0030] Ein als Emulgator (D) verwendetes Tensid ist im Hinblick auf die Stabilität des fertigen Öladijuvantimpfstoffs des w/o/w-Typs vorzugsweise hydrophil und weist einen verhältnismäßig hohen HLB-Wert auf, der besonders bevorzugt nicht kleiner als 10 ist. Dieser Emulgator (D) kann bei Bedarf allein oder in Kombination verwendet werden. In diesem Fall wird der Emulgator (D) vorzugsweise so bestimmt, daß das Gesamt-HLB mindestens 10 beträgt.

[0031] Genauer werden ein nichtionisches Tensid mit einer Polyoxyethylenkette im Molekül und mit einem HLB von nicht weniger als 10 wie etwa (ein) Polyoxyethylensorbitanfettsäureester, Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl, Polyoxyethylenpolyoxypropylenglykol und dergleichen verwendet. Diese Tenside können in Kombination mit einem partiellen Ester eines mehrwertigen Alkohols und einer Fettsäure wie etwa Sorbitanfettsäureester, Glycerinfettsäureester, Sucrosefettsäureester, Polyglycerinfettsäureester und dergleichen und einem natürlich vorkommendes Lecithin enthaltenden Glycerophospholipid verwendet werden. Davon ermöglicht die Verwendung besonders von Polyoxyethylenpolyoxypropylenglykol allein oder in Kombination mit anderen Tensiden die Herstellung eines Öladijuvantimpfstoffs des w/o/w-Typs mit überlegener Zubereitungsstabilität.

[0032] Das als Emulgator (B) oder Emulgator (D) zu verwendende Glycerophospholipid kann zum Beispiel ein natürlich vorkommendes Phospholipid wie etwa ein aus Eigelb und Sojabohnen extrahiertes und gereinigtes Phospholipid und ein hydriertes Addukt davon und verschiedene synthetische Phospholipide und Lysophospholipide sein, wobei die Zusammensetzung der Acylstrukturheit und der Grundstruktureinheit geregelt ist.

[0033] Bei dem Öladijuvantimpfstoff des w/o/w-Typs der vorliegenden Erfindung stellt die wäßrige Komponente (C) eine wäßrige Phase dar, die eine Dispersionsphase in der in Schritt 1 hergestellten w/o-Emulsion ist und stellt eine innere, wäßrige Phase dar, die in einer Ölphase dispergiert ist, die eine Dispersionsphase in dem fertigen Öladijuvantimpfstoff des w/o/w-Typs ist. Die wäßrige Komponente (C) enthält verschiedene Antigene.

[0034] Das in der wäßrigen Komponente (C) enthaltene Antigen kann von verschiedener Art sein und kann verschiedene Formen aufweisen. Genauer werden allgemein sowohl inaktivierte Zellen, inaktivierte Virusteilchen, inaktiviertes Mycoplasma als auch ein prophylaktischer Faktor gegen eine Pathogeninfektion wie etwa ein für einen Untereinheit-Impfstoff verwendetes Bindungsprotein, Hüllantigen und dergleichen verwendet. Die inaktivierten Zellen können Gram-negative Bakterien wie etwa *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli* usw., Gram-positive Bakterien wie etwa *Erysipelothrix rhusiopathiae* usw. und dergleichen sein. Das Virus des inaktivierten Virusteilchens schließt zum Beispiel das japanische Enzephalitisvirus und dergleichen ein. Das Mycoplasma des inaktivierten Mycoplasmas wird durch Schweine- und Hühnermycoplasma veranschaulicht. Als prophylaktischer Faktor gegen eine Pathogeninfektion wird das F-Protein des Newcastle-Krankheitsvirus veranschaulicht. Es ist ferner möglich, einen mehrere Antigene enthaltenden kombinierten Impfstoff zu verwenden.

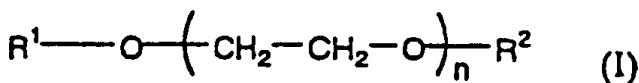
[0035] Der Öladijuvantimpfstoff der vorliegenden Erfindung kann außer einem Antigen eine andere wirksame Komponente als das Antigen wie etwa Antibiotika enthalten. Beispiele der Antibiotika schließen Kanamycin-sulfat, Oxytetracyclinhydrochlorid und dergleichen ein.

[0036] Die biologisch annehmbare und wirksame Menge eines Antigens in einem wäßrigen Bestandteil (C) wird gemäß dem Ziel und der Art des zu verwendenden Antigens geeignet bestimmt.

[0037] Bei der vorliegenden Erfindung ist das vorstehend angeführte Antigen in der inneren, wäßrigen Phase enthalten. Selbst wenn ein Teil des Antigens während des Herstellungsverfahrens des Öladijuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs der vorliegenden Erfindung in die äußere, wäßrige Phase austritt, wird die Wirkung der vorliegenden Erfindung nicht beeinträchtigt.

[0038] Bei der vorliegenden Erfindung stellt die wäßrige Komponente (E) die äußere wäßrige Phase des Öladijuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs dar. Genauer wird die wäßrige Komponente (E) unter Berücksichtigung der Stabilität und Sicherheit des fertigen Adjuvansimpfstoffs gegenüber dem Körper geeignet ausgewählt. Zum Beispiel werden physiologische Kochsalzlösung, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung und dergleichen verwendet.

[0039] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird das in der äußeren, wäßrigen Phase eines Öladijuvansimpfstoffs enthaltene Polyethylenglykolderivat durch die folgende Formel (I) ausgedrückt:



worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sein können und jeweils ein Wasserstoffatom oder Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und n der Polymerisationsgrad ist.

[0040] In der vorstehend angeführten Formel (I) kann Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen als R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> eine gerade Kette oder verzweigte Kette sein und wird durch Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl und tert-Butyl veranschaulicht. Geeignete R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> sind ein Wasserstoffatom, Methyl und Ethyl, wobei ein Wasserstoffatom besonders geeignet ist. Geeignete Kombinationen von R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> sind ein Wasserstoffatom und ein Wasserstoffatom, ein Wasserstoffatom und Methyl, ein Wasserstoffatom und Ethyl, Methyl und Methyl und dergleichen. Die Kombination eines Wasserstoffatoms und eines Wasserstoffatoms ist besonders geeignet. n ist der Polymerisationsgrad, der ein Molekulargewicht in dem Bereich 400–20000 ergibt.

[0041] Das Polyethylenglykoderivat der vorstehend angeführten Formel (I) weist ein Molekulargewicht von 400–20000, vorzugsweise 1000–10000, besonders bevorzugt 3000–9000 auf. Es ist in der äußeren, wäßrigen Phase in einem Anteil von 0,5–20 Gew.-%, vorzugsweise 1–10 Gew.-%, bevorzugter 1–5 Gew.-% der Phase enthalten.

[0042] Wenn das Polyethylenglykoderivat ein Molekulargewicht von weniger als 400 aufweist oder wenn der Gehalt weniger als 0,5 Gew.-% ist, kann keine zufriedenstellende Viskositätserniedrigende Wirkung erzielt werden. Außerdem kann die Wirkung als Adjuvant abgeschwächt werden. Wenn das Molekulargewicht des Polyethylenglykoderivats 20000 überschreitet, weist die äußere, wäßrige Phase selbst eine erhöhte Viskosität auf, was wiederum die Viskosität des Öladijuvansimpfstoffs als ganzes erhöht und dadurch eine unzureichende Viskositätserniedrigende Wirkung liefert. Wenn der Gehalt 20 Gew.-% überschreitet, zeigen die innere wäßrige Phase und die äußere wäßrige Phase völlig unterschiedliche osmotische Drucke. Als Ergebnis kann keine stabile Emulsion des w/o/w-Typs geliefert werden, was wiederum die Herstellung eines stabilen Öladijuvansimpfstoffs unerreichbar macht.

[0043] Bei der vorliegenden Erfindung bewirkt ein höheres Molekulargewicht des vorstehend angeführten Polyethylenglykoderivats eine höhere Viskosität der äußeren wäßrigen Phase, als Ergebnis dessen der Öladijuvantimpfstoff eine höhere Viskosität aufweist. Es ist erwünscht, seinen Gehalt so einzustellen, daß er gemäß dem Molekulargewicht des Polyethylenglykoderivats in den vorstehend angeführten Bereich fällt.

[0044] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein Polyethylenglykoderivat, wovon die vorstehend beispielhaft angeführten ein Molekulargewicht in dem Bereich von 400–20000 aufweisen, allein verwendet werden, oder zwei oder mehr Derivate mit verschiedenen Molekulargewichten können in Kombination verwendet werden.

[0045] Hinsichtlich der Stabilität als Zubereitung und der Adjuvanswirkung des fertigen Öladijuvansimpfstoffs weist das Polyethylenglykoderivat vorzugsweise ein Molekulargewicht von 1000–10000 auf und ist in einer äußeren wäßrigen Phase insbesondere in einem Anteil von 1–10 Gew.-%, vorzugsweise 1–5 Gew.-% der Phase enthalten.

[0046] Der gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellte Öladijuvansimpfstoff ist durch eine überlegene Adjuvanswirkung und niedrigere Viskosität gekennzeichnet, die der Tatsache zuzuschreiben sind, daß das Polyethylenglykoderivat in der äußeren wäßrigen Phase vorliegt. Im allgemeinen zeigt eine Emulsion des w/o/w-Typs oft eine stark erhöhte Viskosität und Aggregation von w/o-Teilchen, was auf die Wirkung der in der inneren wäßrigen Phase enthaltenen Substanzen und die Tatsache, daß in der inneren wäßrigen Phase und der äußeren wäßrigen Phase unterschiedliche Komponenten enthalten sind, zurückzuführen ist. Insbesondere kann eine für einen Öladijuvansimpfstoff verwendete Antigenlösung verschiedene Bestandteile wie etwa Zellkomponenten und Mediumkomponenten in hohen Konzentrationen enthalten. Zur Verwendung als Öladijuvantimpfstoff des w/o/w-Typs können Emulsionen des w/o/w-Typs mit derselben Zusammensetzung daher auch dramatisch verschiedene Viskositäts- und Stabilitätswerte zeigen, was auf die Wirkung anderer Komponenten in der zu verwendenden Antigenlösung zurückzuführen ist. Dies wirft insbesondere, wenn mehrere Arten An-

tigene unter Ergeben eines Impfstoffs vermischt werden, ein ernstes Problem auf und muß mit allen Mitteln während der Produktion und Kontrolle eines Impfstoffs vermieden werden. Bei der vorliegenden Erfindung ist jedoch ungeachtet der Zusammensetzung oder Komponenten der inneren wäßrigen Phase in der äußeren wäßrigen Phase ein Polyethylenglykolderivat zum Verringern der Viskosität enthalten, was wiederum ein derartiges Problem überwindet. Wenn ein Öladjuvansimpfstoff eine hohe Viskosität aufweist, wird die Verarbeitbarkeit während der Verabreichung an einen Körper schlecht, was wiederum zu einem schlechteren Diffusionsverhalten im Körper und Nebenwirkungen wie etwa einer topischen Reaktion und Restimpfstoff an der Injektionsstelle führt. Durch den Zusatz eines Polyethylenglykoderivats zu der äußeren wäßrigen Phase können diese Aspekte ebenfalls verbessert werden.

[0047] Einer der Hauptfaktoren, die die Eigenschaften des Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs beeinflussen, ist die Teilchengröße der in der äußeren wäßrigen Phase enthaltenen w/o-Emulsion. Wenn allgemein die Teilchengröße der in der äußeren wäßrigen Phase enthaltenen w/o-Emulsion groß ist, zeigt das Öladjuvans des w/o/w-Typs beim Einbringen das Verhalten eines Öladjuvans des w/o-Typs. Dies bedeutet, daß die Adjuvanswirkung höher wird, die Nebenwirkungen wie etwa eine topische Reaktion aber ebenfalls stark werden. Außerdem neigen die Teilchen zum Agglomerieren, wodurch die Stabilität als Zubereitung erniedrigt wird. Wenn im Gegensatz dazu eine w/o-Emulsion verhältnismäßig kleinere Teilchen enthält, weist die Zubereitung eine höhere Stabilität, verringerte Nebenwirkungen und eine schwächere Adjuvanswirkung auf. Der durch die vorliegende Erfindung hergestellte Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs zeigt eine hohe immunverstärkende Wirkung, selbst wenn die Teilchen der w/o-Emulsion verhältnismäßig klein sind. So zeigt der erfindungsgemäßige Impfstoff eine überlegene Stabilität als Zubereitung, weniger und ein niedrigeres Ausmaß an Nebenwirkungen und eine überlegene Wirksamkeit. Unter dem Aspekt der Stabilität als Zubereitung und der Verringerung der Nebenwirkungen weisen im wesentlichen alle Teilchen der w/o-Emulsion, die den Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs darstellen, vorzugsweise eine Teilchengröße von nicht mehr als 50 µm und eine durchschnittliche Teilchengröße von nicht mehr als 20 µm auf.

[0048] Das Herstellungsverfahren des Öladjuvansimpfstoffs der vorliegenden Erfindung ist nicht besonders eingeschränkt und kann ein bekanntes Verfahren sein. Wenn der Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, enthält die in Schritt 1 hergestellte w/o-Emulsion eine Ölkomponente (A) in einem Anteil von 30–90 Gew.-%, vorzugsweise 40–80 Gew.-%, einen Emulgator (B) in einem Anteil von 1–20 Gew.-%, vorzugsweise 2–15 Gew.-%, und eine ein Antigen enthaltende wäßrige Komponente (C) in einem Anteil von 5–75 Gew.-%, vorzugsweise 15–60 Gew.-%, alles bezogen auf die w/o-Emulsion. Der Emulgator (D) wird in Schritt 2 in einem Anteil von 0,1–20 Gew.-%, vorzugsweise 0,5–10 Gew.-% der Summe des Emulgators (D), der wäßrigen Komponente (E) und des Polyethylenglykoderivats verwendet.

[0049] Das Mischungsverhältnis der (in Schritt 1 hergestellten) w/o-Emulsion und einer einen Emulgator (D) und einen wäßrigen Bestandteil (E) in Schritt 2 enthaltenden Flüssigkeit wird in Abhängigkeit von der Art des beabsichtigten oder gewählten Antigens geeignet bestimmt. Vorzugsweise ist das Gewichtsverhältnis w/o-Emulsion : einen Emulgator (D) und eine wäßrige Komponente (E) enthaltende Flüssigkeit = 2 : 1–1 : 10, bevorzugt 2 : 1–1 : 5.

[0050] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird der äußeren wäßrigen Phase durch teilweises oder vollständiges Zufügen des vorstehend angeführten Polyethylenglykoderivats der Formel (I), das ein Molekulargewicht von 400–20000 aufweist, vor der vorstehend angeführten, einen Emulgator (D) und eine wäßrige Komponente (E) enthaltenden Flüssigkeit ein Polyethylenglykoderivat zugesetzt. Wahlweise wird ein Öladjuvans des w/o/w-Typs hergestellt und das getrennt in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Puffer gelöste Polyethylenglykoderivat wird zugefügt. Die zuzusetzende Menge des Polyethylenglykoderivats ist wie vorstehend angeführt.

[0051] Wenn ein mehrere Arten Antigene enthaltender Öladjuvansimpfstoff hergestellt wird, werden jede Art Antigen in der inneren wäßrigen Phase enthaltende w/o-Emulsionen wie später dargestellt hergestellt, gemischt und in einer einen Emulgator (D) und einen wäßrigen Bestandteil (E) enthalten Flüssigkeit dispergiert. Wahlweise werden Öladjuvantien des w/o/w-Typs für eine beliebige Zahl Antigene wie später angeführt hergestellt und gemischt.

[0052] Der Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung kann als pharmazeutisches Produkt verschiedene Additive, die nicht direkt an der Adjuvansaktivität beteiligt sind, wie etwa Puffermittel, Antiseptika, den osmotischen Druck regelnde Mittel und dergleichen enthalten.

[0053] Zur Herstellung des Öladjuvansimpfstoffs der vorliegenden Erfindung kann jede zum Emulgieren befähigte Apparatur sowohl bei der Herstellung einer ein Antigen in der inneren wäßrigen Phase (Schritt 1) enthaltenden w/o-Emulsion als auch zum Dispergieren oder Emulgieren der in einer Flüssigkeit einen Emulgator (D) und eine wäßrige Komponente (E) (Schritt 2) enthaltenden w/o-Emulsion, eine typische Emulgierapparatur (z. B. Homomischer, Homogenisator, CLEARMIX (hergestellt von M TECHNIQUE) und dergleichen), eine Membranemulgierapparatur unter Verwenden einer porösen Membran, eine Hochdruckstrahlemulgierapparatur und dergleichen verwendet werden. Wenn nötig, wird die den Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung darstellende w/o-Emulsion durch ein Membranfilter geführt, um die Teilchengröße unter einen bestimm-

ten Wert zu bringen.

[0054] Bei der Herstellung des Impfstoffs kann weiterhin jede zu verwendende Komponente zuvor einer Sterilisierungsbehandlung in Abhängigkeit von deren Eigenschaften wie etwa einer Sterilisierung durch Erhitzen oder Sterilisierung durch Filtrieren unterzogen werden.

[0055] Wenn der durch die vorliegende Erfahrung hergestellte Öladjuvansimpfstoff auf einen Körper angewandt wird, wird ein geeigneter Verabreichungsweg wie etwa subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Injektionen und eine Verabreichung durch die Schleimhaut der Nasenhöhle und des Darms eingesetzt. Die Dosis und Verabreichungshäufigkeit sollten zum Erzielen einer gewünschten immunologischen Wirkung gemäß einem typischerweise auf dem betreffenden Gebiet eingesetzten Verfahren geeignet bestimmt werden.

[0056] Die vorliegende Erfahrung wird durch Bezug auf Anschauungsbeispiele genau erläutert.

[0057] In den folgenden Beispielen wurde Polyethylenglykol (hierin nachstehend auch als PEG oder Macrogol bezeichnet) als Polyethylenglykolderivat verwendet.

#### [Herstellung eines Öladjuvansimpfstoffs]

[0058] Der in den folgenden Beispielen verwendete Öladjuvansimpfstoff wurde durch das folgende Verfahren unter Verwenden eines CLEARMIX CLM-0.8S (M TECHNIQUE) hergestellt. Die Emulgierung wurde bei Raumtemperatur ausgeführt und Kühlwasser wurde nötigenfalls verwendet. Jede Komponente in den folgenden Zusammensetzungen wurde einer Sterilisierungsbehandlung durch ein geeignetes Sterilisierungsverfahren unterzogen. Jeder Rühr- und Emulgervorgang usw. wurde in steriler Umgebung ausgeführt. In den Beispielen bedeutet „Teile“ „Gewichtsteile“.

[0059] Bei den folgenden Zubereitungen von Öladjuvansimpfstoffen bedeutet die „äußere wäßrige Phase“ eine mit einer w/o-Emulsion zur Herstellung des Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs zu vermischtende Flüssigkeit.

#### «Beispiel 1: Herstellung des Impfstoffs 1»

[0060] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-1 in Tabelle 1 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension gewogen in ein Becherglas eingebracht. Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl wurde vor Gebrauch auf 50°C erhitzt und gelöst. Eine wäßrige Lösung von Natriumglutamat und Sorbit wurde mit Sorbitan-Sesquioleat in einem Gewichtsverhältnis von 1/1 gemischt, gerührt und zugefügt. Das restliche Sorbitan-Sesquioleat wurde so zugefügt, wie es war. Die Antigensuspension wurde allmählich unter Röhren hinzugefügt und durch 5 min Rühren mit 12000 Upm bei normaler Temperatur in einem CLEARMIX CLM-0.8S (M TECHNIQUE) unter Ergeben einer Emulsion des w/o-Typs (W/O-1) gemischt.

[0061] Gemäß der Zusammensetzung der äußeren wäßrigen Phase 1 in Tabelle 3 wurde jede Komponente in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) (äußere wäßrige Phase 1) gelöst. Die vorstehende W/O-1 (1 Teil) und die äußere wäßrige Phase 1 (1 Teil) wurden in einem Becherglas gewogen und mittels des CLEARMIX CLM-0.8S 5 min mit 9000 Upm unter Ergeben eines Öladjuvansimpfstoffs 1 gemischt. In den folgenden Beispielen und Vergleichsbeispiele wurden die w/o-Emulsion und die äußere wäßrige Phase solange nicht anders angegeben unter denselben Bedingungen wie bei Beispiel 1 zur Impfstoffherstellung gemischt.

#### «Beispiel 2: Herstellung des Impfstoffs 2»

[0062] Die in Beispiel 1 hergestellte Emulsion des w/o-Typs (W/O-1, 1 Teil) und die entsprechend der Zusammensetzung der äußeren wäßrigen Phase 2 in Tabelle 3 hergestellte äußere wäßrige Phase 2 (1 Teil) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 2 hergestellt.

#### «Beispiel 3: Herstellung des Impfstoffs 3»

[0063] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-2 in Tabelle 1 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension in einem Becherglas gewogen. Das Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl wurden vor Gebrauch auf 50°C erwärmt und gelöst. Macrogol 6000 der japanischen Pharmakopoe wurde vorher in der Antigensuspension homogen gelöst. Unter denselben Bedingungen wie in Beispiel 1 wurde eine Emulsion des w/o-Typs hergestellt (W/O-2).

[0064] Anschließend wurde W/O-2 (3 Teile) und die äußere wäßrige Phase 3 (2 Teile) gemäß der Zusammensetzung der äußeren wäßrigen Phase 3 in Tabelle 3 gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 3 hergestellt.

# DE 600 02 650 T2 2004.03.11

## «Beispiel 4: Herstellung des Impfstoffs 4»

[0065] Gemäß der Zusammensetzung der äußeren wässrigen Phase 4 in Tabelle 3 wurde jede Komponente gewogen. Die Komponenten wurden auf etwa 60°C erwärmt, gründlich gemischt, dispergiert und zur Verwendung als äußere wässrige Phase 4 auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde eine in Beispiel 3 hergestellte Emulsion des w/o-Typs (W/O-2, 1 Teil) und die äußere wässrige Phase 4 (3 Teile) gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 4 hergestellt.

## «Beispiel 5: Herstellung des Impfstoffs 5»

[0066] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-3 in Tabelle 1 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension in einem Becherglas gewogen. Auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 wurde die Antigensuspension allmählich unter Rühren des Gemisches zugefügt und es wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 eine Emulsion des w/o-Typs hergestellt (W/O-3).

[0067] Anschließend wurden diese Emulsion des w/o-Typs (W/O-3, 2 Teile) und die äußere wässrige Phase 2 (3 Teile) in einem Becherglas gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 5 hergestellt.

## «Beispiel 6: Herstellung des Impfstoffs 6»

[0068] Die in Beispiel 5 hergestellte Emulsion des w/o-Typs (W/O-3, 2 Teile) und die gemäß der Zusammensetzung der äußeren wässrigen Phase 5 in Tabelle 4 hergestellte äußere wässrige Phase (2 Teile) wurden gewogen und mittels eines CLEARMIX CLM-0.8S 5 min bei 9000 Upm unter Ergeben einer Emulsion gemischt. Macrogol 6000 der japanischen Pharmakopoe wurde in PBS auf eine Konzentration von 10 Gew.-% gelöst und die sich daraus ergebende Lösung (1 Teil) wurde zugefügt. Das Gemisch wurde unter Ergeben des Öladjuvansimpfstoffs 6 gelinde gerührt.

## «Beispiel 7: Herstellung des Impfstoffs 7»

[0069] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-4 in Tabelle 2 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension in einem Becherglas gewogen. Auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 wurde mittels eines CLEARMIX CLM-0.8S eine Emulsion des w/o-Typs hergestellt (W/O-4).

[0070] Anschließend wurde W/O-4 (1 Teil) und die gemäß der Zusammensetzung der äußeren wässrigen Phase 4 in Tabelle 3 hergestellte äußere wässrige Phase 4 (1 Teil) gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 7 hergestellt.

## «Beispiel 8: Herstellung des Impfstoffs 8»

[0071] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-5 in Tabelle 2 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension in einem Becherglas gewogen. Das Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl wurde vor Gebrauch auf 60°C erwärmt und gelöst.

[0072] Die Antigensuspension wurde allmählich unter Rühren zugefügt und eine Emulsion des w/o-Typs (W/O-5) wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 hergestellt.

[0073] Anschließend wurde W/O-5 (1 Teil) und die äußere wässrige Phase 2 (1 Teil) gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 8 hergestellt.

## «Beispiel 9: Herstellung des Impfstoffs 9»

[0074] Gemäß der Zusammensetzung von W/O-6 in Tabelle 2 wurde jede andere Komponente als die Antigensuspension in einem Becherglas gewogen. Eigelblecithin wurde in der Ölphase homogen gelöst und Polyoxyethylen – hydriertes Rizinusöl wurde vor Gebrauch auf 60°C erhitzt und gelöst. Die Antigensuspension wurde allmählich unter Rühren zugefügt und eine Emulsion des w/o-Typs (W/O-6) wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 hergestellt.

[0075] Anschließend wurde W/O-6 (3 Teile) und die äußere wässrige Phase 3 (2 Teile) gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 9 hergestellt.

## «Vergleichsbeispiel 1: Herstellung des Impfstoffs 10»

[0076] Die in Beispiel 1 hergestellte W/O-1 (1 Teil) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 5 (1 Teil) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 10 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 2: Herstellung des Impfstoffs 11»

[0077] Die in Beispiel 1 hergestellte W/O-1 (1 Teil) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 6 (1 Teil) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 11 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 3: Herstellung des Impfstoffs 12»

[0078] Die in Beispiel 3 hergestellte W/O-2 (3 Teile) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 7 (2 Teile) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 12 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 4: Herstellung des Impfstoffs 13»

[0079] Die in Beispiel 5 hergestellte W/O-3 (2 Teile) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 5 (3 Teile) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 13 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 5: Herstellung des Impfstoffs 14»

[0080] Die in Beispiel 7 hergestellte W/O-4 (1 Teil) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 8 (1 Teil) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 14 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 6: Herstellung des Impfstoffs 15»

[0081] Die in Beispiel 8 hergestellte W/O-5 (1 Teil) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 6 (1 Teil) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 15 hergestellt.

«Vergleichsbeispiel 7: Herstellung des Impfstoffs 16»

[0082] Die in Beispiel 9 hergestellte W/O-6 (3 Teile) und in Tabelle 4 dargestellte äußere wässrige Phase 7 (2 Teile) wurden gewogen und es wurde ein Öladjuvansimpfstoff 16 hergestellt.

[0083] Die Zusammensetzungen der für die Impfstoffe der Beispiele und Vergleichsbeispiele verwendeten w/o-Emulsionen werden in Tabelle 1 und 2 dargestellt, die Zusammensetzungen der äußeren wässrigen Phasen werden in Tabelle 3 und 4 dargestellt und die Mischungsverhältnisse der w/o-Emulsion und der äußeren wässrigen Phase der Impfstoffe werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der w/o-Emulsion – 1

zugesetzte Komponente	Mischungsverhältnis (Gew.-%)		
Verbindung	w/o-1	w/o-2	w/o-3
Ethyloleat	40	–	–
Squalen	–	55	20
gereinigtes Sojabohnenöl	–	–	15
Sorbitansesquioleat	10	10	10
Polyoxyethylen (20) - hydriertes Rizinusöl <sup>*1)</sup>	–	–	5
Polyoxyethylen (40) - hydriertes Rizinusöl <sup>*1)</sup>	5	3	–
Polyoxyethylen (20) - Sorbitanmonooleat <sup>*1)</sup>	–	2	–
wässrige Lösung <sup>*2)</sup> von Natriumglutamat und Sorbit	5	–	–
Antigensuspension	40	29	50
Macrogol 6000 <sup>*3)</sup> der japanischen Pharmakopoe	–	1	–
Summe	100	100	100

\*1) Die Zahlen in Klammern zeigen die durchschnittliche Anzahl Mol addiertes Ethylenoxid

\*2) durch Lösen von Natriumglutamat-monohydrat (25 g) und Sorbit (10 g) in destilliertem Wasser hergestellte wässrige Lösung (100 ml)

\*3) Macrogol wurde zuvor in der Antigensuspension gelöst

Tabelle 2: Zusammensetzung der w/o-Emulsion – 2

zugesetzte Komponenten	Mischungsverhältnis (Gew.-%)		
Verbindung	w/o-4	w/o-5	w/o-6
Ethyloleat	40	–	30
Squalen	–	–	20
Isopropylmyristat	–	60	–
gereinigtes Eigelblecithin	–	–	2
Glycerinmonooleat	15	10	8
Polyoxyethylen (10) - hydriertes Rizinusöl <sup>*1)</sup>	5	5	–
Polyoxyethylen (60) - hydriertes Rizinusöl <sup>*1)</sup>	–	5	5
Antigensuspension	40	20	35
Summe	100	100	100

\*1) Die Zahlen in Klammern zeigen die durchschnittliche Anzahl Mol addiertes Ethylenoxid

Tabelle 3: Zusammensetzung der äußeren wässrigen Phase des Öladjuvansimpfstoffs – 1

zugesetzte Verbindungen	Mischungsverhältnis (%)			
	äußere wässrige Phase 1	äußere wässrige Phase 2	äußere wässrige Phase 3	äußere wässrige Phase 4
Polyoxyethylen (60) - hydriertes Rizinusöl* <sup>1)</sup>	2	-	-	2
Polyoxyethylen (10) - Sorbitan-monooleat* <sup>1)</sup>	-	-	2	-
Polyoxyethylen (196) - Polyoxypropylenglykol (67)* <sup>1)</sup>	1	3	-	-
gereinigtes Eigelblecithin	-	-	-	2
Macrogol 1000* <sup>2)</sup>	-	-	-	1
Macrogol 4000 der japanischen Pharmakopoe	-	4	1	-
Macrogol 6000 der japanischen Pharmakopoe	3	-	1	-
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	94	93	96	95
Summe	100	100	100	100

\*1) Die Zahlen in Klammern zeigen die durchschnittliche Anzahl Mol addiertes Ethylenoxid

\*2) annehmbares japanisches pharmazeutisches Arzneistoffträgerprodukt

Tabelle 4: Zusammensetzung der äußeren wässrigen Phase des Öladjuvansimpfstoffs – 2

zugesetzte Komponente	Mischungsverhältnis (%)			
	äußere wässrige Phase 5	äußere wässrige Phase 6	äußere wässrige Phase 7	äußere wässrige Phase 8
Polyoxyethylen (60) - hydriertes Rizinusöl* <sup>1)</sup>	2	-	-	2
Polyoxyethylen (20) - Sorbitan-monooleat* <sup>1)</sup>	-	-	2	-
Polyoxyethylen (196) - Polyoxypropylenglykol* <sup>1)</sup>	1	3	-	-
gereinigtes Eigelblecithin	-	-	-	2
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	97	97	98	96
Summe	100	100	100	100

\*1) Die Zahlen in Klammern zeigen die durchschnittliche Anzahl Mol addiertes Ethylenoxid

Tabelle 5: für jede Impfstoffzubereitung verwendete w/o-Emulsion und äußere wäßrige Phase und deren Zusatzmengen

Impfstoff Nr.		w/o-Emulsion	äußere wäßrige Phase
Verbindung	Impfstoff 1	W/O-1 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 1 (1 Teil)
	Impfstoff 2	W/O-1 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 2 (1 Teil)
	Impfstoff 3	W/O-2 (3 Teile)	äußere wäßrige Phase 3 (2 Teile)
	Impfstoff 4	W/O-2 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 4 (3 Teile)
	Impfstoff 5	W/O-3 (2 Teile)	äußere wäßrige Phase 2 (3 Teile)
	Impfstoff 6	W/O-3 (2 Teile)	äußere wäßrige Phase 5 (2 Teile) Macrogollösung (1 Teil)*1)
	Impfstoff 7	W/O-4 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 4 (1 Teil)
	Impfstoff 8	W/O-5 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 2 (1 Teil)
	Impfstoff 9	W/O-6 (3 Teile)	äußere wäßrige Phase 3 (2 Teile)
Vergleichsbeispiel	Impfstoff 10	W/O-1 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 5 (1 Teil)
	Impfstoff 11	W/O-1 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 6 (1 Teil)
	Impfstoff 12	W/O-2 (3 Teile)	äußere wäßrige Phase 7 (2 Teile)
	Impfstoff 13	W/O-3 (2 Teile)	äußere wäßrige Phase 5 (3 Teile)
	Impfstoff 14	W/O-4 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 8 (1 Teil)
	Impfstoff 15	W/O-5 (1 Teil)	äußere wäßrige Phase 6 (1 Teil)
	Impfstoff 16	W/O-6 (3 Teile)	äußere wäßrige Phase 7 (2 Teile)

\*1) siehe Beispiel 6 in der Beschreibung zu Einzelheiten des Herstellungsverfahrens

#### [Immunitätstest]

[0084] Die verschiedene Antigene enthaltenden Öladjuvansimpfstoffe wurden Immunitätstests unterzogen. Die Symbole der bei den jeweiligen Versuchsbeispielen verwendeten Impfstoffe entsprechen den bei den vorstehend angeführten Beispielen und Vergleichsbeispielen verwendeten.

#### «Versuchsbeispiel 1: inaktivierter Schweineimpfstoff aus Erysipelothrix rhusiopathiae (Er)»

[0085] Die Kultur des Stammes SE-9 von *Erysipelothrix rhusiopathiae* (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION) in 5% Rinderserum enthaltender Hirn-Herz-Infusionsbrühe (BHIB) wurde unter Ergeben eines Antigens mit Formalin inaktiviert. Unter Verwenden des Antigens wurden die Impfstoffe 1, 3, 5, 7, 10, 12 und 14 hergestellt. Zur Herstellung wurde die Antigenkonzentration jedes Impfstoffs mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf  $5,0 \times 10^8$  CFU/ml geeignet eingestellt. Ein PBS anstatt Antigenlösung enthaltendes Placebo wurde für jeden Impfstoff hergestellt. Jeder Impfstoff wurde mit dem entsprechenden Placebo unter Ergeben einer 5fachen seriellen Verdünnung verdünnt. Als Kontrolle wurden Freundsches unvollständiges Adjuvans (IFA), ein Adjuvans (IFA-PEG), bei dem PEG 1000 der inneren wäßrigen Phase von IFA in einem Anteil von 5% der inneren wäßrigen Phase zugefügt wurde, und ein Aluminiumhydroxidgel als Adjuvans enthaltender Impfstoff hergestellt.

[0086] Jeder Impfstoff (oder verdünnte Impfstoff) wurde subkutan in den Innenoberschenkel einer 5 Wochen alten Clean-Maus (5 Mäuse je Gruppe) eingebracht (0,25 ml/Maus). 3 Wochen nach der Immunisierung wurde Er Fujisawa-Stamm [Japanische Vereinigung von Veterinärbiologen (JAVB)] subkutan ( $2,2 \times 10^6$  CFU/0,1 ml/Maus) in den Innenoberschenkel jeder Maus injiziert. Nach der Injektion wurde das Überleben der Mäuse 10 Tage überwacht und das als  $PD_{50}$  ausgedrückte Impfstoffverdünnungsvielfache bei 50% Überleben wurde berechnet. 2 Wochen nach der Immunisierung wurden ein unverdünnter Impfstoff und ein 5fach verdünnter Impfstoff in die Mäuse eingebracht (10 Mäuse für jede Formulierung) und die Injektionsstelle wurde durch Abtasten zum Bestimmen des Verhärtungsgrades untersucht. Der Verhärtungsgrad wurde in 5 Stufen bewertet (0: keine, 1: leicht – 4: schwer) und für jede Formulierung wurde der Durchschnitt berechnet.

[0087] Bei den zu diesem Zeitpunkt hergestellten Öladjuvansimpfstoffe des w/o/w-Typs wurde durch einen Laserbeugungsteilchengrößenanalysator SALD-2100 (SHIMADZU CORPORATION) die durchschnittliche Teilchengröße gemessen.

[0088] Die Ergebnisse der Wirksamkeit ( $PD_{50}$ ) werden in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Schweinerotlauf – Testergebnisse der Mausimmunisierung (Versuchsbeispiel 1)

	Testergebnisse (überlebende Mäuse/getestete Mäuse)							$PD_{50}$ (fach)
	unverdünnter Impfstoff	5	25	125	625	3125	15625	
<b>[Immunisierungsgruppe]</b>								
Impfstoff 1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	2660.4
Impfstoff 3	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	1397.5
Impfstoff 5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	1928.2
Impfstoff 7	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
<b>[Immunisierungsgruppe zum Vergleich]</b>								
Impfstoff 10	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	532.1
Impfstoff 12	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	1/5	0/5	385.7
Impfstoff 14	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	279.5
IFA	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3670.7
IFA-PEG	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
Aluminiumgel	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	77.1

[0089] Die Ergebnisse werden als Zahl der überlebenden Mäuse, in die ein verdünnter Impfstoff (oder ein unverdünnter Impfstoff) eingebracht worden war, und  $PD_{50}$ -Werte davon dargestellt. Hierin verwendet zeigt eine größere  $PD_{50}$  eine höhere Wirksamkeit. Von den Immunisierungsgruppen zeigte die Gruppe, in die Impfstoff 1, 3, 5 und 7 eingebracht worden war, eine  $PD_{50}$  von nicht weniger als 1300, was die mit IFA vergleichbare, überlegene Wirksamkeit zeigt. Im Gegensatz dazu zeigte die Immunisierungsgruppe zum Vergleich (denen Impfstoff 10, 12, 14 und ein Aluminiumgeladjuvans verabfolgt worden war)  $PD_{50}$ -Werte von 532,1, 385,7, 279,5 und 77,1. Es ist offensichtlich, daß der durch die vorliegende Erfindung hergestellte Impfstoff bedeutend höhere  $PD_{50}$ -Werte zeigte. Diese Ergebnisse haben nachgewiesen, daß der durch die vorliegende Erfindung hergestellte Impfstoff sehr wirkungsvoll ist.

[0090] Anschließend wurde die Injektionsstelle durch Abtasten zum Bestimmen des Verhärtungsgrades untersucht. Die durchschnittliche Teilchengröße des Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs wird in Tabelle 7 zusammen mit dem Verhärtungsgrad dargestellt.

Tabelle 7: Schweinerotlauf – topische Reaktion an der Injektionsstelle bei der Maus (Versuchsbeispiel 1)

	topische Reaktion (Durchschnitt) der Injektionsstelle	durchschnittliche Teilchengröße ( $\mu\text{m}$ )
<b>[Immunisierungsgruppe]</b>		
Impfstoff 1	0.1	6.8
Impfstoff 3	0.2	8.1
Impfstoff 5	0	7.2
Impfstoff 7	0.2	7.9
<b>[Vergleichsimmunisierungsgruppe]</b>		
Impfstoff 10	0.3	7.5
Impfstoff 12	0.2	8.5
Impfstoff 14	0.8	8.8
IFA	3.8	—
IFA-PEG	3.2	—
Aluminiumgel	0	—

[0091] Bewertung der topischen Reaktion an der Injektionsstelle (0: keine, 1: leicht – 4: schwer)

[0092] Die Immunisierungsgruppe zeigte selten eine Reaktion an der Injektionsstelle, wodurch die hohe Sicherheit der Injektion bewiesen wurde, und die durchschnittliche Teilchengröße betrug nicht mehr als 7,2–8,1 oder 20  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu zeigte die Vergleichsimmunisierungsgruppe eine durchschnittliche Teilchengröße des Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs in fast derselben Höhe und die Reaktion an der Injektionsstelle der Vergleichsimmunisierungsgruppe außer IFA und IFA-PEG war klein. Die Mäuse in der IFA- und

IFA-PEG-Injektionsgruppe entwickelten jedoch eine schwere Verhärtung, was eine äußerst hohe Reaktionsbewertung ergab, wobei etwa 3/4 oder mehr der Mäuse, in die IFA oder IFA-PEG eingebracht worden war, an Gangstörungen litten.

[0093] Die vorangehenden Ergebnisse weisen nach, daß der Öladijuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung sowohl eine dramatisch überlegene Wirksamkeit als auch eine äußerst geringe Reaktion an der Injektionsstelle wie bei einem Aluminiumgelimpfstoff zeigt. Der erfindungsgemäße Impfstoff ist sehr sicher.

«Versuchsbeispiel 2: inaktivierter Impfstoff aus Schweinemycoplasma»

[0094] Die Impfstoffe 2, 4, 6, 11 und 13 wurden aus *Mycoplasma hypnopneumoniae* Stamm 92-28 (aus Ackerschweinen isolierter Stamm; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) in mit Schweineserum ergänztem BHL-Medium kultiviert und mit Formalin inaktiviert. Zur Herstellung wurde der Antigengehalt jedes Impfstoffs mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf eine Antigenkonzentration von  $8,0 \times 10^8$  CCU/ml eingestellt. Ein Impfstoff (Impfstoff AL) unter Verwendung eines Aluminiumhydroxidgels (AL-HYDROGEL 85, Superfos, 9 mg/ml als Aluminium) als Adjuvans und ein Impfstoff (Impfstoff AL-PEG), der durch Zufügen von Macrogol 4000 der japanischen Pharmakopoe zu einem Aluminiumhydroxidgel auf eine Endkonzentration von 4% erhalten wurde, wurden so eingestellt, daß sie dieselbe Antigenkonzentration aufwiesen.

[0095] Jeder Impfstoff (2 ml/Schwein) wurde im Abstand von 2 Wochen zweimal in SPF-Schweine (frei von spezifischem Antigen) (8 Schweine/Gruppe, zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung 4 Wochen alt) in den Halsmuskel eingebracht. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurde Lungenhomogenisat ( $3 \times 10^6$  CCU/6 ml/Schwein), das aus mit *Mycoplasma hypnopneumoniae* Stamm 92-28 (aus Ackerschweinen isolierter Stamm; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) infizierten Schweinen stammte, in die Luftröhre verabfolgt. Vier Wochen nach der Verabfolgung wurden die Schweine der Autopsie unterzogen und die Lungenläsionen wurden in Augenschein genommen. Die jeweiligen Lungenläsionen wurden bewertet und die Abnahme (%) der Läsionen durch jeden Impfstoff bezogen auf die Läsion der nicht-immunisierten Kontrolls Schweine wurde berechnet.

[0096] Die Ergebnisse werden in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Schweine-Mycoplasma-Infektion – Ergebnisse des Mausimmunisierungstests (Versuchsbeispiel 2)

	Immunisierungsgruppe			Vergleichsimmunisierungsgruppe				nicht-immunisierte Gruppe
	Impfstoff 2	Impfstoff 4	Impfstoff 6	Impfstoff 11	Impfstoff 13	Impfstoff AL	Impfstoff AL-PEG	
Läsionenbewertung (jeweils einzeln)	0	0	0	15.2	16.4	23.6	50.2	5.5
	1.5	2.0	0	0.5	5.5	15.2	16.5	11.8
	0.5	9.6	3.6	9.1	22.0	5.5	22.1	14.5
	16.2	30.2	5.8	4.5	4.58	19.6	25.9	32.7
	2.6	5.5	18.6	14.2	19.5	56.3	30.6	15.9
	9.2	16.3	20.6	23.0	23.3	12.4	11.1	40.2
	3.5	1.5	9.6	38.6	36.2	28.4	9.1	25.5
	19.6	10.5	10.2	10.2	14.4	30	30	45.5
(Durchschnitt)	6.6	9.5	8.6	14.4	17.7	23.9	24.4	24.0
Abnahme (%) der Läsionen	72.3	60.5	64.3	39.8	26.0	0.3	-2.0	-

[0097] Die Immunisierungsgruppen, in die die Impfstoffe 2, 4 und 6 eingebracht worden waren, zeigten eine Abnahme der Läsionen um 60% oder darüber, was die überlegene Wirksamkeit nachwies. Der Impfstoff 6, dem PEG nach der sekundären Emulgierung zugesetzt worden war, zeigte fast dieselbe Wirkung wie die anderen Immunisierungsgruppen. Im Gegensatz dazu zeigten die Vergleichsimmunisierungsgruppen, denen Impfstoff 11 und 13 verabfolgt worden war, eine Abnahme der Läsionen um 39,8% beziehungsweise 26,0% und der Aluminiumgelimpfstoff zeigte ungeachtet der Anwesenheit oder andererseits der PEG-Zugabe überhaupt keine

Läsionen-verringernde Wirkung durch den Impfstoff.

[0098] Die vorangehenden Wirkungen weisen nach, daß der Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung selbst dann überlegene Wirkungen zeigt, wenn Mycoplasma als Antigen verwendet wird. Außerdem weisen die Ergebnisse nach, daß der PEG-Zusatz entweder vor oder nach der sekundären Emulgierung zu der äußeren wäßrigen Phase wirkungsvoll ist.

[Messung der Viskosität einer Emulsion]

[0099] Die Viskosität der hergestellten Öladjuvansimpfstoffe des w/o/w-Typs wurde gemessen. Sowohl der im vorstehenden Versuchsbeispiel 1 hergestellte Schweineimpfstoff aus *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Impfstoffe 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14) als auch gemäß den Formulierungen der Impfstoffe 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15 und 16 hergestellte entsprechende Impfstoffe und unter Verwendung von *Erysipelothrix rhusiopathiae* aus dem Schwein als Antigen wurden der Messung unterzogen, so daß ein Vergleich unter derselben Formulierung der Antigensuspension angestellt werden konnte. Die Viskosität wurde eine Woche nach der Impfstoffherstellung mittels eines Drehviskosimeters des Typs E (TOKI SANGYO CO., LTD., Typ RE105H) bei 25°C gemessen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Viskosität der Impfstoffzubereitung

Impfstoff Nr.		Viskosität (mPa·s, 25°C)
Beispiel	Impfstoff 1	33
	Impfstoff 2	28
	Impfstoff 3	42
	Impfstoff 4	35
	Impfstoff 5	31
	Impfstoff 6	32
	Impfstoff 7	38
	Impfstoff 8	45
	Impfstoff 9	29
Vergleichs- beispiel	Impfstoff 10	153
	Impfstoff 11	161
	Impfstoff 12	206
	Impfstoff 13	187
	Impfstoff 14	470
	Impfstoff 15	396
	Impfstoff 16	315

[0100] Wie in Tabelle 9 dargestellt zeigen die Impfstoffe der Beispiele bei 25°C alle eine Viskosität von nicht mehr als 50 mPa·s. Die Viskosität war sehr niedrig und erleichterte die Injektion. Im Gegensatz dazu wiesen die Impfstoffe der Vergleichsbeispiele eine Viskosität von nicht weniger als 150 mPa·s auf, was für die Injektion eine beträchtliche Kraft und Zeit erforderte.

[0101] Die vorstehenden Ergebnisse legen nahe, daß der Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs eine wesentlich verringerte Viskosität aufweisen kann, indem er ein Polyethylenglykolderivat in der äußeren wäßrigen Phase enthält und auf diese Weise zeigt, daß die Verabreichung des erfindungsgemäßen Impfstoffs in großem Maße Arbeit einsparen kann.

[Messung der Einschlußrate der Emulsion]

[0102] Bei den hergestellten Öladjuvansimpfstoffen des w/o/w-Typs wurde die Einschlußrate gemessen. Sowohl im vorstehenden Versuchsbeispiel 2 verwendeter Schweine-Mycoplasmaimpfstoff (Impfstoff 2, 4, 6, 11, 13) als auch gemäß den Formulierungen der Impfstoffe 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15 und 16 hergestellte, entsprechende Impfstoffe wurden unter Verwendung des Mycoplasmas als Antigen der Messung unterzogen, so-

daß ein Vergleich unter derselben Formulierung der Antigensuspension angestellt werden konnte. Die hergestellten Impfstoffe wurden mit PBS verdünnt und zum Abtrennen des Emulsionsteils von der äußeren wäßrigen Phase zentrifugiert. Diese wurden isoliert und die Proteinmenge in der äußeren wäßrigen Phase wurde gemessen. Die Proteinmenge in der äußeren wäßrigen Phase wurde von der in der Antigensuspension (die die innere wäßrige Phase darstellt) während der Herstellung der w/o-Emulsion zugesetzten abgezogen, um die Menge des in der inneren wäßrigen Phase zurückgehaltenen Proteins zu bestimmen, auf deren Grundlage die Einschlußrate aus der folgenden Formel berechnet wurde.

Einschlußrate (%) = [(Proteinmenge in der zugesetzten Antigenlösung) – (Proteinmenge in der äußeren wäßrigen Phase)]/Proteinmenge in der zugesetzten Antigensuspension

[0103] Die Impfstoffe wurde nach der Herstellung bei 4°C gelagert und die Einschlußrate wurde am nächsten Tag der Impfstoffherstellung und 3 Monate später gemessen.

[0104] Die Ergebnisse für die Einschlußrate werden in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Einschlußrate des hergestellten Impfstoffs

		Einschlußrate (%)	
		am nächsten Tag nach der Herstellung	3 Monate nach der Herstellung
Beispiel	Impfstoff 1	98	97
	Impfstoff 2	98	98
	Impfstoff 3	93	90
	Impfstoff 4	94	92
	Impfstoff 5	93	93
	Impfstoff 6	92	90
	Impfstoff 7	94	92
	Impfstoff 8	97	97
	Impfstoff 9	92	89
Vergleichsbeispiel	Impfstoff 10	97	95
	Impfstoff 11	98	98
	Impfstoff 12	81	71
	Impfstoff 13	91	90
	Impfstoff 14	96	96
	Impfstoff 15	94	94
	Impfstoff 16	87	85

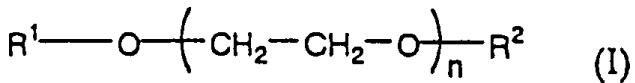
[0105] Sowohl bei den Beispielen als auch Vergleichsbeispielen wurde am nächsten Tag nach der Herstellung und 3 Monate nach der Herstellung eine hohe Einschlußrate von nicht weniger als 70% beobachtet, was auf diese Weise eine überlegene Stabilität beweist. Insbesondere die Impfstoffe der Beispiele zeigten wie in Tabelle 9 dargestellt eine äußerst niedrige Viskosität und eine überlegene Einschlußrate. Die vorangehenden Beispiele weisen nach, daß der Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs der vorliegenden Erfindung mit einer dramatisch niedrigen Viskosität eine hohe Stabilität aufweist.

[0106] Wie aus den in Tabelle 6–Tabelle 10 dargestellten Ergebnissen offensichtlich ist, zeigt der Öladjuvansimpfstoff der vorliegenden Erfindung eine wohl ausgewogene, überlegene Wirksamkeit, die für ein Öladjuvans des w/o-Typs charakteristisch ist, und eine überlegene Sicherheit, die für ein Öladjuvans des o/w-Typs charakteristisch ist. Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung, wo ein spezielles Polyethylenlykolderivat in der äußeren wäßrigen Phase des Öladjuvansimpfstoffs des w/o/w-Typs enthalten ist, ermöglicht die Herstellung eines brauchbaren Öladjuvansimpfstoffs, der frei von Einflüssen der in der inneren wäßrigen Phase enthaltenen Komponenten ist und der bei der Zubereitungsstabilität und Verarbeitbarkeit überlegen ist, um einer Person zu erlauben, aufgrund der erniedrigten Viskosität leicht eine Injektion zu setzen.

[0107] Der Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs der vorliegenden Erfindung liefert eine hohe Adjuvanswirkung und zeigt eine überlegene Zubereitungsstabilität und weniger Nebenwirkungen wie etwa eine topische Reaktion.

**Patentansprüche**

1. Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs mit einer äußeren wässrigen Phase, die 0,5 bis 20 Gew.-% eines Polyethylenglycolderivats mit einem Molekulargewicht von 400 bis 20000 umfasst, das durch die folgende Formel (I) dargestellt wird:



wobei R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sein können und jeweils ein Wasserstoffatom oder Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und n ein Polymerisationsgrad ist, und einer inneren wässrigen Phase, die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens umfasst.

2. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 1, wobei das Polyethylenglycolderivat der Formel (I) ein Molekulargewicht von 1000 bis 10000 hat.

3. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 1, wobei die äußere wässrige Phase 1 bis 10 Gew.-% des Polyethylenglycolderivats der Formel (I) umfasst.

4. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 1, bei dem es sich um einen Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs handelt, der durch die folgenden Schritte hergestellt wird:

(a) Herstellen einer w/o-Emulsion mit einer Ölkomponente (A), die bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 25°C flüssig wird, einem Emulgator (B) und einer wässrigen Komponente (C), die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens umfasst; und

(b) Dispergieren oder Emulgieren der w/o-Emulsion in einer Flüssigkeit, die einen Emulgator (D) und eine wässrige Komponente (E) umfasst, wobei die Flüssigkeit 0,5 bis 20 Gew.-% eines Polyethylenglycolderivats mit einem Molekulargewicht von 400 bis 20000 umfasst, das durch die Formel (I) dargestellt wird.

5. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 1, bei dem es sich um einen Öladjuvansimpfstoff des w/o/w-Typs handelt, der durch die folgenden Schritte hergestellt wird:

(a) Herstellen einer w/o-Emulsion mit einer Ölkomponente (A), die bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 25°C flüssig wird, einem Emulgator (B) und einer wässrigen Komponente (C), die eine biologisch annehmbare und effektive Menge eines Antigens umfasst; und

(b) Dispergieren oder Emulgieren der w/o-Emulsion in einer Flüssigkeit, die einen Emulgator (D) und eine wässrige Komponente (E) umfasst; und

(c) Hinzufügen eines Polyethylenglycolderivats mit einem Molekulargewicht von 400 bis 20000, das durch die Formel (I) dargestellt wird, zu der äußeren wässrigen Phase in einer Konzentration von 0,5 bis 20 Gew.-%.

6. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei die Ölkomponente (A), die bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 25°C flüssig wird, einen Fettsäureester oder Squalen oder sowohl einen Fettsäureester als auch Squalen in einem Anteil von nicht weniger als 20 Gew.-% der Ölphase umfasst.

7. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei der Emulgator (B) ein HLB von weniger als 10 hat.

8. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 7, wobei der Emulgator (B) wenigstens einen Vertreter umfasst, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem partiellen Ester eines mehrwertigen Alkohols und einer Fettsäure sowie einem nichtionischen Tensid mit einer Polyoxyethylenkette besteht.

9. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei der Emulgator (D) ein HLB von nicht weniger als 10 hat.

10. Öladjuvansimpfstoff gemäß Anspruch 9, wobei der Emulgator (D) ein nichtionisches Tensid mit einer Polyoxyethylenkette umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen