

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. November 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/71154 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 39/00 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04565
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Mai 2000 (19.05.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 23 256.3 20. Mai 1999 (20.05.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PHARMASOL GMBH [DE/DE]; Blohmstrasse 66A, D-12307 Berlin (DE).  
**Veröffentlicht:**  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (72) Erfinder; und  
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Rainer, Helmut [DE/DE]; Stubenrauchstrasse 66, D-12161 Berlin (DE). GRUBHOFER, Nikolaus [DE/DE]; Am Kirchwald 6, D-69251 Gaiberg (DE). OLBRICH, Carsten [DE/DE]; Hasenheide 63, D-10967 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER  
GBR; Postfach 22 16 11, D-80506 München (DE).

(54) Title: STABILITY, BIOCOMPATIBILITY OPTIMIZED ADJUVANT (SBA) FOR ENHANCING HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE

(54) Bezeichnung: STABILITÄTS-, BIOKOMPATIBILITÄTS-OPTIMIERTES ADJUVANS (SBA) ZUR ERHÖHUNG DER HUMORALEN UND ZELLULÄREN IMMUNANTWORT

(57) Abstract: The invention relates to a stability and biocompatibility-optimized adjuvant (SBA) for enhancing the humoral and cellular immune response by jointly injecting said adjuvant with one or more antigens. The adjuvant consists of particles based on solid lipids or solid lipid mixtures and can be used in the production of more efficient and compatible vaccines, the inoculation of human beings and animals and for obtaining antibodies. The strength of the immune response can be modulated in a targeted manner and additionally adapted to the specific species by selecting the size, charge and surface characteristics of the particles. Other adjuvants, e.g. molecular adjuvants such as GMDP, can be added to the SBA, whereby the cellular immune response is additionally enhanced. The SBA is more effective and cost-efficient and easier to use than existing products and is well tolerated in vivo.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beinhaltet ein Stabilitäts- und Biokompatibilitäts-optimiertes Adjuvans (SBA) zur Erhöhung der humoralen und zellulären Immunantwort bei Injektion zusammen mit einem oder mehreren Antigenen. Das Adjuvans besteht aus Partikeln auf der Basis von festen Lipiden oder festen Lipidmischungen. Einsatzmöglichkeiten sind Herstellung effizienterer und verträglicherer Impfstoffe, Impfungen von Menschen und Tieren, aber auch die Gewinnung von Antikörpern. Durch Wahl von Partikelgröße, Partikelladung und Oberflächeneigenschaften kann die Stärke der Immunantwort gezielt moduliert und zusätzlich speziesspezifisch angepaßt werden. Dem SBA können noch andere Adjuvantien, z.B. molekulare Adjuvantien wie GMDP, zugesetzt werden, wobei dadurch die zelluläre Immunantwort zusätzlich gesteigert wird. Das SBA ist leistungsfähiger und kostengünstiger, einfacher zu handhaben als bisherige Produkte und wird in vivo gut vertragen.



WO 00/71154 A2

## **Stabilitäts-, Biokompatibilitäts-optimiertes Adjuvans (SBA) zur Erhöhung der humoralen und zellulären Immunantwort**

5

### **1. Hintergrund der Erfindung**

Antigene werden Tieren und Menschen appliziert, um Antikörper zu erzeugen. Ziele sind dabei zum Beispiel die Immunisierung von Menschen oder Tieren zum Schutz vor Erkrankungen oder die Erzeugung von Antikörpern, die nachher isoliert und zu Produkten verarbeitet werden. Der häufigste Applikationsweg für Antigene ist die parenterale Verabreichung, alternative Wege sind z.B. die orale, nasale und topische Applikation.

15

Ein häufiges Problem ist, daß oft die Stärke der Immunantwort auf das verabreichte Antigen für den beabsichtigten Zweck nicht ausreicht.

Manchmal kann das Problem dadurch gelöst werden, daß die verabreichte Dosis des Antigens stark erhöht wird. Ein ernsthaftes Problem ist jedoch, daß Antigene oft sehr teuer sind und die Dosiserhöhung zu einer entsprechenden Verteuerung des Impfstoffes führt. Diese Kosten führen zu einer starken Belastung des Gesundheitssystems, für viele Bevölkerungsschichten – insbesondere in der Dritten Welt – wird der Impfstoff zu teuer und wünschenswerte Massenimpfungen können nicht durchgeführt werden.

25

Ein alternativer Lösungsansatz ist die Verabreichung von Antigenen zusammen mit einem Adjuvans, das die Antigenwirkung verstärkt und so zu einem höheren Antikörpertiter führt. Das Adjuvans-Prinzip wurde erstma-

lig 1948 von Jules Freund beschrieben [Freund, J. J. Immunology 1948, 60, 383-398] und durch zwei Emulsionen auf der Basis von Mineralöl realisiert. Freund's unvollständiges Adjuvans (Freund's Incomplete Adjuvant – FIA) ist eine Mischung von Mineralöl mit Mannide Monooleat (Montanide, Arlacel). Zur Anwendung mischt man es mit der Antigenlösung und injiziert die gebildete Emulsion. Die dadurch hervorgerufene Verstärkung der Immunantwort ist so groß, daß FIA immer noch als "Goldstandard" herangezogen wird, wenn neue Adjuvantien entwickelt und getestet werden. Man bewertet ihre Effizienz und Qualität durch Vergleich mit FIA, wobei jedoch viele neu entwickelte Adjuvantien deutlich unterhalb der Effizienz von FIA bleiben (z. B. bei 0,2, FIA = 1,0).

Der Zusatz von abgetöteten Mycobakterien zu FIA (z. B. *M. tuberculosis*) erhöhte weiterhin die Immunantwort. Diese Mischung wird als Freund's komplettes Adjuvans bezeichnet (Freund's Complete Adjuvant – FCA). Die Ölemulsion nach Freund erzeugt jedoch entzündliche und ulzerierende Geschwülste (Granulome) an der Injektionsstelle, teilweise brechen sie auf und gehen in sich ausbreitende Abszesse über. Nach heutigem Standard steht daher die Anwendung der Ölemulsion nach Freund am Menschen außerhalb jeglicher Frage. Teilweise erfolgt die Anwendung bei Tieren. Oft ist das Allgemeinbefinden der Tiere so stark beeinträchtigt, daß es zu unwirtschaftlichen Ausfällen kommt. Die von Freund zur Komplettierung des Adjuvans vorgeschlagenen Mycobakterien *M. tuberculosis* oder *M. butyricum* sind ebenfalls schlecht verträglich. Auch sie rufen Granulome und Fieber sowie Abszesse an der Einstichstelle hervor [Brown, E.A. Rev Allergy 1969 23(5):389-400].

Es besteht daher die Aufgabe, ein verträglicheres Adjuvans zu finden, insbesondere unter den Gesichtspunkten kostengünstige Impfstoffe herzu-

stellen, wünschenswerten weltweiten Impfungen gegen bestimmte Er-  
krankungen, die nur mit einem kostengünstigen Impfstoff finanziell reali-  
sierbar sind und der zunehmenden Bedeutung immunologischer Produk-  
tionstechniken und Produkte. Auch unter zunehmendem Bewußtsein für  
5 die Schutzbedürftigkeit von Tieren und entsprechendem Druck der Ge-  
setzgebung muß ein verträglicheres, (d.h. biokompatibles) gleich effizien-  
tes, aber gleichzeitig kostengünstiges Adjuvans gefunden werden. Zusätz-  
lich muß es physikalisch stabil sein, damit eine Zumischung vor der In-  
jektion entfallen kann und Schwankungen in der Effizienz – z.B. durch  
10 unterschiedliche Dispergierung – eliminiert werden.

Das heutzutage am häufigsten eingesetzte Adjuvans mit Zulassung zur  
Anwendung am Menschen ist eine feine Suspension von Aluminium-  
hydroxid, dessen Wurzeln noch archaischer sind als die der Emulsion von  
15 Freund [Glenny, A.T. et al. J. Pathol. 1926, 29 31-40]. Es basiert auf der  
Annahme, daß Antigene vom Immunsystem besser erkannt werden, wenn  
sie auf der Oberfläche der Aluminiumhydroxid-Partikel adsorbiert sind.  
Nachteilig ist jedoch, daß Aluminiumhydroxid weniger effizient ist als  
Freunds Adjuvans und es ebenfalls Granulome bewirken kann.

20 Ausgehend von Freunds Emulsion wurden neuerdings Emulsionen be-  
schrieben, welche aus verträglicheren Materialien bestehen wie z. B.  
Squalan und Sqalen, [Sanchez-Pestador, L. et al. J. Immunol. 1988 141,  
1720-1727, Masihi KN, Lunge,W., Bremer W., Ribí, E. Int. J. Immuno-  
25 pharmacol. 1986 8(3),339-45, Hunter R.L., Bennett, B. Scand J Immunol.  
1986 23(3), 287-300, Allison AC, et al. Semin Immunol. 1990 2(5), 369-  
74]. Eines dieser Systeme ist MF59 (European Patent Application  
0399843A2).

Basierend auf den Suspensionen nach Glenny wurden Partikel aus unterschiedlichen Polymeren bis hin zu diversen anorganischen und organischen Partikeln (z. B. Kohlenstoff) eingesetzt [O'Hagan, D.T., Jeffrey, H., Roberts M.J., McGee, J.P., Davies, S.S. Vaccine. 1991 9(10), 68-71, 5 Glenny, A.T. et al. J. Pathol. 1926, 29 31-40]. Nachteile dieser Systeme sind die Zytotoxizität einiger Polymere (z. B. Formaldehydbildung bei Polyalkylcyanoacrylaten), fehlende oder zu langsame Abbaugeschwindigkeit im Organismus (z. B. Polystyrol oder Polymethacrylatderivate), unzureichende Biokompatibilität (z. B. Kapselbildung bei PLA-Partikeln, pH- 10 Verschiebung bis zu pH2) sowie mangelnde Zulassungsfähigkeit durch die Registrierungsbehörden (z. B. Rußpartikel).

Ein alternativer Weg zur Verwendung von partikulären Adjuvantien wie Öltropfen oder Feststoffpartikeln ist der Einsatz von makromolekularen 15 Adjuvantien. Es wurde gezeigt, daß die von Freund beschriebenen Mycobakterien durch Bausteine aus deren Kapselsubstanz ersetzt werden können, welche größere Körperverträglichkeit aufweisen. Besonders beschrieben und synthetisiert wurden MDP (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin) [Adam, A., Lederer, E. Med. Res. Rev. 1984 4, 111-152] Thr- 20 MDP (threonyl Analog des MDP) [Byars NE, et al. Vaccine. 1987 5(3), 223-8] und das aus dem Joghurtbazillus stammende GMDP (N-acetylglucosaminy-N-acetylmuramyl-dipeptide) [Grubhofer, N. Immunology Letters 1995 44, 19-24]. GMDP ist ein Homolog des MDP, für GMDP wurde inzwischen eine gesteigerte immunstimulierende Wirkung nachge- 25 wiesen (Patentschrift DE 19611235 C1).

Weitere Ansätze bei der Entwicklung eines Adjuvans waren die Verwendung von molekularen Adjuvantien in hoher Konzentration, so daß die Löslichkeit überschritten wurde und man eine Suspension erhielt (z. B.

DDA (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) [Grubhofer, N. Immunology Letters 1995 44, 19-24] und zur Erhöhung der humoralen Antwort die Mischung von makromolekularen Adjuvantien wie Glykopeptiden mit Feststoffpartikeln (z. B. GMDP mit kolloidalen Partikeln) [Grubhofer, N. Immunology Letters 1995 44, 19-24].

Bis jetzt ist jedoch noch keine Lösung gefunden worden, welche eine gleiche Wirkungseffizienz wie Freund's Adjuvans aufweist und gleichzeitig den übrigen Anforderungen entspricht: Die neuen Emulsionen werden keineswegs immer reaktionsfrei vertragen, die synthetischen Makromoleküle wie Glykopeptide haben sich bislang den Mycobakterien nicht überlegen gezeigt, zusätzlich sind sie viel zu teuer. Feststoffpartikel haben Zulassungsprobleme. Viele Adjuvantien zeigen zu hohe Toxizität und somit zu geringe Biokompatibilität. Hinzu kommen Probleme mit der physikalischen Stabilität (Vermeidung von Aggregation bzw. Koaleszenz). So muß die FIA-Emulsion frisch hergestellt und injiziert werden, langfristige Lagerung ist nicht möglich. Ausreichend physikalische Lagerstabilität ist jedoch die essentielle Voraussetzung für ein vermarktbares Produkt – insbesondere für Arzneimittel.

Ziele sind somit die Herstellung eines neuen Adjuvans mit:

1. ausreichend physikalischer Stabilität
2. geringer Zytotoxizität und ausreichender Biokompatibilität
3. vergleichbarer Wirkungseffizienz zu FIA
4. kostengünstiger Herstellung.

## 1. Beschreibung der Erfindung

Bisher mußte zur Erhöhung der immunstimulierenden Wirkung GMDP in  
5 Mischung mit kolloiddispersen festen Lipidpartikeln in einer Partikelgröße  
<200 nm eingesetzt werden (USA Patent Gerbu, Bearbeitungsnummer des  
US Patentamtes ist 08/816,787). Der Aufbau der Partikel wurde in Unter-  
suchungen für diese Erfindung systematisch modifiziert (z.B. eingesetzte  
Tenside, Stabilisatoren) um Lipidpartikel zu finden, die die immunstimu-  
10 lierende Wirkung von GMDP weiter erhöhen könnten. Überraschender  
Weise wurde hierbei gefunden, daß Lipidpartikel alleine genau so effizient  
sind wie die Kombination aus Lipidpartikeln und GMDP (Beispiel 9). Somit  
kann in der Erfindung auf das teure GMDP verzichtet werden und eine  
vergleichbar hohe humorale Immunstimulierung durch ein kostengünsti-  
15 ges Lipidpartikel alleine erzielt werden.

Die Stärke der immunstimulierenden Wirkung hängt hierbei von den  
Oberflächeneigenschaften der Partikel (verwendete Tenside, Partikella-  
dung) und von der Partikelgröße ab. Bei negativer Ladung des Lipidparti-  
20 kels beträgt die Wirkungseffizienz ca. 1/3 von FIA, bei Erzeugung eines  
positiv geladenen Lipidpartikels durch Zusatz von EQ1 ist die Wirkungsef-  
fizienz vergleichbar FIA (kein signifikanter Unterschied, t-Test) (Beispiel 9).  
Über die Zusammensetzung der verwendeten Lipidpartikel kann somit die  
gewünschte Wirkungsstärke gezielt eingestellt werden. Dies vermeidet  
25 Überreaktionen des Organismus.

Aus der bisherigen Adjuvans-Forschung an anorganischen und Polymer-  
Suspensionen ist bekannt, daß es für jedes Antigen eine Partikelgröße mit  
maximaler Wirkungseffizienz gibt, ebenso ist eine Speziesabhängigkeit be-

- kannt. So wird die am besten geeignete Partikelgröße von Aluminiumhydroxid-Suspensionen für einen Impfstoff empirisch ermittelt, Polymerpartikel als Adjuvans zur Immunisierung hatten einen unterschiedlichen Effekt als Funktion ihrer Größe [Kreuter J, et al. Vaccine. 1986, 4, 125-9]. Das gleiche wurde trotz des sehr unterschiedlichen Matrixmaterials überraschenderweise für die Lipidpartikel gefunden, so daß die Wirkungsstärke über Veränderung der Partikelgröße antigenspezifisch und speziesspezifisch moduliert werden kann.
- 10 Die Lipidpartikel-Dispersionen des stabilen biokompatiblen Adjuvans (SBA) bestehen aus in Wasser oder wäßrigen Flüssigkeiten oder nichtwäßrigen, z.B. öligen Flüssigkeiten dispergierten Lipidpartikeln, wobei diese durch Tenside oder Polymere stabilisiert werden können, aber nicht müssen. Bei ausreichend hoher Viskosität der äußeren Phase oder Feinheit
- 15 der Partikel wird eine physikalisch stabile Dispersion erhalten. Gleiches gilt auch bei niedrig viskosen äußeren Phasen, wenn die Partikel eine ausreichend hohe gleichsinnige Ladung tragen und somit gebildete Sedimente leicht redispergiert werden können.
- 20 Die Herstellung der SBA erfolgt durch Dispergierung oder Präzipitation, wobei in Lehrbüchern der Pharmazie und Verfahrenstechnik beschriebene allgemein bekannte Methoden eingesetzt werden. Bei der Dispergierung zerteilt man grobdisperse Lipide durch mechanische Verfahren. Die Lipide können sich hierbei im festen Aggregatzustand (z. B. Mörsermühle) oder
- 25 im flüssigen Aggregatzustand befinden (z.B. Emulgierung geschmolzener Lipide durch Rührer). Zur Herstellung der SBA-Dispersion können die Lipide zuerst zerkleinert und anschließend in der äußeren (z.B. wäßrigen) Phase dispergiert werden oder alternativ direkt in der äußeren Phase zerkleinert werden. Zur Herstellung von SBA-Dispersionen durch Dispergie-

5      rung können z. B. u. a. eingesetzt werden: Kolben-Spalt-Homogenisatoren (z. B. APV Homogenisatoren, French Press), Jet Stream Homogenisatoren (z. B. Microfluidizer), Rotor-Stator-Rührer (z. B. Ultraturax, Silverson Homogenisatoren), statische Mischer im Mikromaßstab und Makromaßstab (z. B. Mischer der Firma Sulzer), Gasstrahlmühle, Rotor-Stator-Kolloidmühle und Mörsermühle (Beispiel 15).

10     SBA-Dispersionen zeigen eine ausreichende physikalische Langzeitstabilität. Bestimmung der Partikelgröße mit Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Laserdiffraktometrie (LD) zeigten kein oder vernachlässigbares Partikelwachstum über Zeiträume von 1 – 3 Jahren (Beispiel 3). Die Stabilität von SBA-Dispersionen ist der von Freunds unvollständigem Adjuvant (FIA) weit überlegen (Beispiel 1), auch gegenüber neueren Adjuvans-Emulsionen zeigt sich eine höhere Stabilität (Beispiel 2).

15     Stabilität: SBA-Dispersionen stellen ein einfaches System dar. Im Gegensatz zu Glykopeptiden sind die eingesetzten Hilfsstoffe chemisch einfach strukturiert und robust. Anwendung von Hitze bei Sterilisationsprozessen führt zu keiner chemischen Zersetzung, die Dispersion bleibt physikalisch  
20     stabil und Partikelaggregation tritt nicht ein. Ein Beispiel für die Sterilisation von SBA-Dispersionen durch Autoklavieren (121°C, 15 Minuten, 2 bar) zeigt Beispiel 4. FIA zeigt unter gleichen Bedingungen Phasenseparation.

25     Viele Impfstoffe werden bei niedriger Temperatur gelagert (4 – 6°C). Bei optimierten SBA-Dispersionen ist auch Lagerung bei Raumtemperatur und auch noch höheren Temperaturen möglich, ohne daß physikalische Destabilisierung auftritt (Beispiel 11). Dies vereinfacht die Handhabung der Produkte auf der Basis von SBA, insbesondere für heißere Klimazonen

(z.B. Einsatz als Adjuvans bei Massenimpfungen in Ländern der Dritten Welt).

Biokompatibilität: Essentiell für ein breit einsetzbares Adjuvans ist geringe  
5 Toxizität und gute Biokompatibilität. In einer Schaf-Studie wurden nach  
Applikation von SBA-Dispersion keine Auffälligkeiten am Applikationsort  
beobachtet (Beispiel 6). Die gute Verträglichkeit wird erklärt mit der in vi-  
tro in Zellkulturen beobachteten extrem geringen Toxizität von Lipiden. Im  
Vergleich zu von den deutschen Zulassungsbehörden und von der FDA  
10 zur parenteralen Applikation zugelassenen Polymeren zeigen sie eine um  
mindestens ca. Faktor 20 höhere Viabilität bei hohen Partikelkonzentra-  
tionen (Beispiel 5). Die gute Biokompatibilität wird darauf zurückgeführt,  
daß allgemein Körperproteine nur zu einem geringen Ausmaß auf die Par-  
tikeloberfläche adsorbieren – im Gegensatz zu anderen Partikeln (Beispiel  
15 7). Hinzu kommt, daß auf der Oberfläche keine Proteine nachgewiesen  
wurden, die Unverträglichkeitsreaktionen fördern.

Für einen breiten Einsatz eines Adjuvans bietet es sich aus Kostengrün-  
den an, ein Adjuvans-Präparat herzustellen, das vor der Anwendung der  
20 Antigenlösung zugemischt wird. Idealerweise sollte dabei das Adjuvans in  
seinen Eigenschaften so hergestellt sein, daß es bei einer Reihe unter-  
schiedlicher Antigene zugemischt werden kann. Zur Verringerung des In-  
jektionsschmerzes sollte die Mischung in physiologischer Kochsalzlösung  
oder anderweitig isotonisierter Lösung appliziert werden. Physiologische  
25 Kochsalzlösung führt aufgrund der Reduktion des Zetapotentials zu einer  
Destabilisierung in Dispersionen und nachfolgender Aggregation [Lucks,  
J. S. et al., Int. J. Pharm 1990 58, 229 - 235]. Das SBA-Adjuvans sollte  
nach Zumischung zum Antigen in isotonischer Lösung ausreichend lange  
physikalisch stabil sein. Beispiel 8 zeigt, daß die Lipidpartikel nach Zumi-

schung zu physiologischer Kochsalzlösung sogar über 6 Stunden stabil sind, meßbare Aggregation tritt nicht auf.

Neben der Partikelgröße können auch Oberflächeneigenschaften wie La-  
5 dung gezielt eingestellt und so das SBA-Adjuvanz in Wirkungsstärke spe-  
ziesspezifisch hergestellt werden. Positive und negative Ladungen können  
durch Zumischung entsprechend geladener Tenside oder Stabilisatoren  
erzeugt werden. Über die Konzentration des Zusatzes kann die Stärke der  
Ladung eingestellt werden. Idealer Zusatz sind dabei geladene Substan-  
10 zen, die wie Cetylpyridiniumchlorid als Konservierungsmittel für die pa-  
renterale Applikation zugelassen sind (Beispiel 12).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Lipide kann zur Herstellung von SBA-  
Dispersionen eingesetzt werden. Dies sind sowohl chemisch einheitliche  
15 Lipide als auch ihre Mischungen. Charakterisiert sind die Lipide dadurch,  
daß sie im Endprodukt SBA-Dispersion im kristallinen Zustand (z.B.  $\beta$ -,  
 $\beta$ i-Modifikation) oder im flüssig-kristallinen Zustand ( $\alpha$ -Modifikation) vor-  
liegen bzw. in deren Mischung. Bei eingesetzten Lipidmischungen können  
auch flüssige Lipide (z.B. Öle, lipophile Kohlenwasserstoffe, lipophile orga-  
20 nische Flüssigkeiten wie Oleylalkohol) den festen Lipiden (z. B. Glyceride,  
lipophile Kohlenwasserstoffe wie Hartparaffin) zugemischt werden (sog.  
"lipid blends").

Einsatz finden z. B. folgende Lipide als dispergierte Phase und können als  
25 individuelle Komponente oder als Mischung angewendet werden: Natürli-  
che oder synthetische Triglyceride bzw. Mischungen derselben, Monogly-  
ceride und Diglyceride, alleine oder Mischungen derselben oder mit z.B.  
Triglyceriden, selbst-emulgierende modifizierte Lipide, natürliche und  
synthetische Wachse, Fettalkohole, einschliesslich ihrer Ester und Ether

sowie in Form von Lipidpeptiden, oder irgendwelche Mischungen derselben. Besonders geeignet sind synthetische Monoglyceride, Diglyceride und Triglyceride als individuelle Substanzen oder als Mischung (z.B. Hartfett), Imwitor 900, Triglyceride (z.B. Glyceroltrilaurat, Glycerolmyristat, Glycerolpalmitat, Glycerolstearat und Glycerolbehenat) und Wachse wie z.B. Cetylpalmitat und weisses Wachs (DAB). Außerdem Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Hartparaffin.

Der Anteil der inneren oder Lipidphase bezogen auf die Gesamtformulierung ist 0,1% bis 80% (m/m) und liegt vorzugsweise im Bereich von 1% bis 40% (m/m). Sollte der Zusatz von dispersionsstabilisierenden Additiven notwendig oder gewünscht sein, z.B. Emulgatoren, um stabile Dispersion zu produzieren zu können, so können diese in Form von reinen Substanzen oder in Form von Mischungen eingearbeitet sein, um die Partikel zu stabilisieren.

Die Menge an solchen Additiven, die im Verhältnis zu der gesamten Einwaage der wässrigen Dispersion zugesetzt werden können, liegt im Bereich von 0,01% bis 30% und vorzugsweise im Bereich von 0,5% bis 20%.

Zur Stabilisierung der SBA-Dispersionen oder zu ihrer gezielten Oberflächenmodifikation können die Tenside, Stabilisatoren und Polymere eingesetzt werden, die allgemein aus der Herstellung von Dispersionen bekannt sind. Beispiele dafür sind:

1. sterisch stabilisierende Substanzen wie Poloxamere und Poloxamine (Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Block-Copolymere), ethoxylierte Sorbitanfettsäure-Ester, besonders Polysorbate (z.B. Polysorbat 80 bzw. Tween 80®), ethoxylierte Mono- und Diglyceride, ethoxylierte Lipide, ethoxylierte Fettalkohole oder Fettsäuren, und Ester und Ether von Zuckern oder von

Zuckeralkoholen mit Fettsäuren oder Fettalkoholen (z.B. Sucrose Monostearat, Sucrose Distearat, Sucrose Cocoat, Sucrose Stearat, Sucrose Dipalmitat, Sucrose Palmitat, Sucrose Laurat, Sucrose Octanoat, Sucrose Oleat).

5

2.geladene ionische Stabilisatoren so wie Diacetylphosphate, Phosphatidylglycerin, Lecithine unterschiedlicher Herkunft (z.B. Eilecithin oder Sojalecithin), chemisch modifizierte Lecithine (z.B. hydrierte Lecithine), genauso wie Phospholipide und Sphingolipide, Mischung von Lecithinen mit  
10 Phospholipiden, Sterolen (z.B. Cholesterol und Cholesterol-Derivate, genauso wie Stigmasterin) und ebenfalls gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Natriumcholat, Natriumglycocholat, Natriumtaurocholat, Natriumdeoxycholat oder ihrer Mischungen, Aminosäuren oder Anti-Flokkulantien, wie z.B. Natriumcitrat, Natriumpyrophosphat, Natriumsorbitat [Lucks, J.S. et al. Int. J. Pharm., 1990, 58, 229 – 235]. Zwitterionische  
15 Tenside wie z.B. (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) [CHAPSO], (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) [CHAPS] und N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1propansulfonat. Kationische Tenside, insbesondere als Konservierungsmittel eingesetzte Verbindungen, wie z.B. Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid.  
20

3.Viskositätserhöhende Substanzen wie z.B. Cellulose-Ether und Cellulose-Ester (z.B. Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose), Polyvinylderivate sowie Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylacetat, Alginate, Polyacrylate (z.B. Carbopol), Xanthane und Pektine.  
25

Die geladenen Stabilisatoren sind, wenn notwendig oder gewünscht, vorzugsweise mit 0,01% bis 20% (m/m) und insbesondere in einer Menge von 0,05% bis zu 10% in der SBA-Dispersion enthalten. Viskositätserhöhende  
5 Substanzen sind, wenn notwendig oder erwünscht, im ähnlichen Verhältnis in der Formulierung eingearbeitet, vorzugsweise in einer Menge von 0,01-20% und insbesondere in einer Menge von 0,1% bis 10% (m/m) und vorzugsweise im Bereich zwischen 0,5% und 5%.

10 Als äußere Phase (Dispersionsmedium, kontinuierliche Phase) können Wasser, wässrige Lösungen oder Flüssigkeiten mischbar mit Wasser, sowie Glycerin oder Polyethylenglykol und ölige Flüssigkeiten wie Miglyole (medium chain triglycerides - MCT) und andere Öle (Rizinus-, Erdnuß-, Soja-, Baumwollsamens-, Raps-, Leinsamens-, Oliven-, Sonnenblumen-, Distelöl eingesetzt werden.  
15

Tensidfreie SBA werden hergestellt durch Dispergierung der Lipidphase in einer wässrigen Lösung, die eine oder mehrere viskositätserhöhende Substanzen enthält, entweder allein oder in Kombination mit anderen Substanzen, sowie Zucker, Zuckeralkohole, besonders Glukose, Mannose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol sowie andere. Desweiteren ist es möglich, eine Kombination der viskositätserhöhenden Stoffe oder die Kombination dieser mit Zuckern oder Zuckeralkoholen, oder in einer weiteren Kombination mit Ladungsstabilisatoren oder Anti-Flokkulantien zu gebrauchen.  
20

25 SBA-Dispersionen können als Adjuvans zu vielen unterschiedlichen Antigenen zur Impfung gegen unterschiedliche Erkrankungen eingesetzt werden. Beispiele dafür sind:

Glykoproteine wie z.B. Gonococcal Protein I, Brucella abortus Antigen,  
Tetanus toxoid, Diphtheria toxoid, Listeria monocytogenes,  
Virusantigene wie Z.B. Semliki Forest Virus, Encephalomyocarditis virus,  
Porcine parvovirus, Pseudorabiesvirus, Newcastle disease virus, Bovine vi-  
5 ral diarrhea, HIV, Influenza, Cytomegalievirus, Herpes Simplex, Hepatitis-  
C, Masern,  
Parasiten, wie z.B. Malaria, Eimeria Spp.,

Zusammenfassend ist zu sagen, daß mit den SBA-Dispersionen ein Adju-  
10 vans zur Verfügung steht, das:

1. eine ausreichende physikalische Stabilität besitzt, um als Produkt und  
speziell als Arzneimittel hergestellt zu werden,
2. eine niedrige Toxizität und gute Biokompatibilität besitzt, insbesondere  
15 wenn biologisch abbaubare Lipide wie Glyceride eingesetzt werden,
3. eine vergleichbare Wirkung wie Freund's unvollständiges Adjuvans (FIA)  
besitzt und
4. kostengünstig aus niedrigpreisigen Hilfsstoffen mit kostengünstigen  
Herstellungsverfahren produziert werden kann.

20 SBA-Dispersionen können breite Anwendung finden, um mit toxikologisch  
akzeptablen Hilfsstoffen die Antigenosizität und damit die Kosten zu redu-  
zieren, da durch Zusatz von SBA bei niedriger Antigenosizität die gleiche  
immunstimulierende Wirkung erzielt wird.

25 Antigene mit bisher unzureichender Antigenität für einen Impfstoff kön-  
nen durch Zusatz von Immunantwort stimulierendem SBA in einen effzi-  
enten Impfstoff überführt werden.

Aufgrund der kostengünstigen Herstellung bei vorhandener vergleichbarer Effizienz zu FIA eignen sich SBA-Dispersionen als Adjuvans für Impfungen im Veterinärbereich, wo aus Rentabilitätsgründen nur sehr niedrigpreisige Impfstoffe eingesetzt werden können.

5 Bisher eingesetzte Adjuvantien haben sich fokussiert auf die Steigerung der humoralen Immunantwort. Angesichts der Wirkungseffizienz von SBA-Dispersionen ist es nicht mehr notwendig, ein weiteres Adjuvans den SBA-Lipidpartikeln zuzusetzen bzw. Zusatz von Adjuvantien wie GMDP bringen  
10 keine weitere Steigerung der humoralen Immunantwort. Offensichtlich ist das Immunsystem an seiner maximalen Kapazität der Antwort, zusätzliches Adjuvans kann keinen zusätzlichen Effekt mehr bringen. Somit bringen Zusätze zu SBA für die humorale Antwort keinen Vorteil, Zusätze wie in dem Patent der Firma Gerbu (Patentschrift DE 19611235 C1) beschrieben, werden durch die überraschend gefundene Wirkstärke der in der Er-  
15 findung beschriebenen SBA überflüssig.

Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß es nach Applikation von GMDP in Kombination mit SBA-Dispersionen bei einer erneuten spä-  
20 teren Impfung zu einer deutlich gesteigerten zellulären Immunantwort kam als wenn vorher nur SBA-Dispersion alleine als Adjuvans eingesetzt wurde. Somit wurde neu gefunden, daß eine Kombination von SBA-Dispersion spezifisch zur Steigerung der zellulären Immunantwort bei erneuter Impfung geeignet ist. Es kommt zu einer erhöhten Immunantwort  
25 bei späterer Zweitimpfung, wenn vorher ein zusätzliches Adjuvans wie GMDP in Mischung mit SBA Dispersion verwendet wurde (Beispiel 13).

Zur Herstellung eines Adjuvans mit Ziel einer Erhöhung der zellulären Immunantwort ist es somit vorteilhaft, die SBA-Dispersion mit einem

weiteren Adjuvans zu kombinieren. Mögliche Adjuvantien für eine Kombination sind: N-Acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin [GMDP], Dimethyldioctadecylammoniumbromid [DDA], N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin [MDP], N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)-

5 N,N-dimethylammoniumchlorid [EQ1], Glykopeptide, Bestandteile der Zellwand von Mycobakterien, Saponine, quaternäre Amine, wie z.B. Cetylpyridiniumchlorid und Benzalkoniumchlorid, zwitterionische Amine wie CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate),

10 Dextransulfat, Dextran, 3-Odesacyl-4'-monophosphoryl lipid A [MPL®], N-Acetyl-L-Alanyl-Disoglutaminyl-L-Alanin- 82) - 1,2 dipalmitoyl - sn glycerol - 3-(hydroxy-phosphoryloxy)ethylamid, Mononatriumsalz [MTP-PE], Granulocyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor [GM-CSF], Blockcopolymer, z.B. P1205, Poloxamer 401 (Pluronic L121), Dimyristoylphosphatidylcholin [DMPC], Dehydroepiandrosterone-3 $\beta$ -01-17-on [DHEA],

15 Dimyristoylphosphatidylglycerol [DMPG], Deoxycholsäure- Natriumsalz, Cytokine, Imiquimod, DTP-GDP, Saponine, 7-Allyl-8-Oxoguanosin, Montanide ISA 51, Montanide ISA 720, MPL, Murametid, Murapalmitin, D-Murapalmitin, 1-Monopalmitoyl-rac-glycerol, Dicetylphosphat, Polymethylmethacrylat [PMMA], PEG-Sorbitanfettsäureester wie Polysorbat 80

20 (TWEEN® 80), Quil A Saponin, Sorbitanfettsäureester wie Sorbitantrioleat (SPAN®85, Arlacel85), DTP-DPP, Stearyl-Tyrosin, N,N dioctadecyl-N',N'-bis(2hydroxyethyl) Propandiamin, Calcitriol.

Neben der Steigerung der humoralen Immunantwort durch SBA-

25 Dispersionen eröffnet sich durch die Erfindung die Möglichkeit zur Steigerung der zellulären Immunantwort bei Zweitimpfung durch Kombination von SBA-Dispersionen mit anderen Adjuvantien.

Anstelle einer Zumischung von Adjuvantien zur Erhöhung der zellulären Immunantwort können die Adjuvantien auch in die Lipidpartikel inkorporiert werden. Inkorporation ist möglich durch Einlagerung in die feste Partikelmatrix, Anreicherung in der Grenzfläche im Falle von amphiphilen Adjuvantien oder durch einfache Adsorption auf die Partikeloberfläche. Die Inkorporation von Adjuvantien kann während der Partikelherstellung oder nachträglich erfolgen (z. B. im Falle der Inkorporation, Beispiel 16). Zur Inkorporation während der Herstellung werden Adjuvantien in der geschmolzenen Lipidphase gelöst, solubilisiert oder dispergiert und die Adjuvans beinhaltende Lipidphase dann weiterverarbeitet. Im Falle von amphiphilen Adjuvantien können diese auch in der äußeren Phase der SBA-Dispersion gelöst werden und reichern sich dann in der Partikelgrenzfläche oder durch Adsorption auf der Oberfläche an. Durch Inkorporation von Adjuvantien kommt es zu einer verlängerten Freisetzung durch die Diffusion oder im Zuge des Partikelabbaus durch Enzyme. Eine verzögerte Freisetzung über einen längeren Zeitraum erhöht die Immunantwort.

Ein weiteres attraktives Anwendungsgebiet ist die Antikörperproduktion im Tier. Durch Zusatz des Adjuvans kann die Antikörperausbeute deutlich erhöht werden.

### **Beispiele**

**Beispiel 1:** Bestimmung der physikalischen Stabilität von SBA versus Freund's Incomplete Adjuvant (FIA): Eine wässrige SBA-Dispersion wurde durch Hochdruckhomogenisation bei 95°C aus 20 % Bienenwachs, 2 % Tween 80 hergestellt (PCS-Durchmesser 289 nm Polydispersitätsindex 0,101). FIA wurde nach der von Freund beschriebenen Methode hergestellt [Freund, J. J. Immunology 1948, 60, 383-398]. SBA und FIA wurden

bei den Temperaturen der Klimazonen gelagert, die bei der Stabilitätsprüfung von Arzneimitteln eingesetzt werden [EMEA Richtlinie CPMP/QWP/159/96, Januar 1998)]. Die Lagertemperaturen waren: 5°C, 25°C, 40°C. Bestimmung der physikalischen Stabilität erfolgte über Messung der Partikelgröße mit Laserdiffraktometrie, Charakterisierungsparameter waren der Durchmesser 50 % und der Durchmesser 95 % (50 % bzw. 95 % der Partikel sind unter der angegebenen Größe, sensitiver Parameter für Partikelaggregation). FIA zeigte bereits nach wenigen Minuten Lagerung – sogar bei Raumtemperatur – ein deutliches Partikelwachstum, FIA ist somit kein lagerstabiles Adjuvans. Demgegenüber bleiben die Partikelgrößen von SBA unter den 3 Lagerbedingungen über einen Zeitraum von 1 Jahr unverändert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Untersuchung der Stabilität von SBA (20% Bienenwachs, 2 % Tween 80) im Vergleich mit Freund's unvollständigem Adjuvans (FIA)

		<b>LD 50%</b> <b>[µm]</b>	<b>LD 95%</b> <b>[µm]</b>
<b>SBA</b> <b>5°C</b>	Tag 0	0,32	0,75
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 30	0,33	0,78
	Tag 365	0,33	0,79
<b>SBA</b> <b>25°C</b>	Tag 0	0,31	0,73
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 30	0,32	0,79
	Tag 365	0,33	0,83

<b>SBA</b> <b>40°C</b>	Tag 0	0,32	0,73
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 10	0,32	0,78
	Tag 30	0,34	0,78
<b>FIA</b> <b>25°C</b>	5 Minu- ten	29,54	63,05
	30 Mi- nuten	30,29	67,39
	60 Mi- nuten	38,34	75,89
	120 Mi- nuten	38,85	75,91

Beispiel 2: Bestimmung der physikalischen Stabilität von SBA versus Squalen-Adjuvans: SBA wurde hergestellt wie unter 1 beschrieben, es  
5 enthielt 10% Cetylpalmitat und 1,2% Miranol (PCS-Durchmesser 210 nm, PCS-Polydispersitätsindex 0,189). Squalen-Adjuvans wurde hergestellt nach der Beschreibung in der europäischen Patentanmeldung 0 399 843 mit Anmeldedatum 25. Mai 1990 (Adjuvans MF59). Partikelgrößenmes-  
10 sung erfolgte mit Laserdiffraktometrie, Lagerung wurde wie in Beispiel 1 bei 3 Temperaturen durchgeführt (Tabelle 2). Zusätzlich wurde ein beschleunigter Stabilitätstest durchgeführt, SBA und MF59 Dispersionen wurden bei 40° mit einer Frequenz von 50 Hz geschüttelt (Tabelle 3). Sowohl bei normaler Lagerung, als auch im Streßtest zeigt SBA eine erhöhte Stabilität.

Tabelle 2: Untersuchung der Stabilität von SBA (10% Cetylpalmitat, 1,2 % Miranol) im Vergleich mit MF59

		<b>LD 50%</b> [µm]	<b>LD 95%</b> [µm]
<b>SBA 5°C</b>	Tag 0	0,32	0,75
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 30	0,33	0,78
	Tag 365	0,33	0,79
<b>SBA 25°C</b>	Tag 0	0,31	0,73
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 30	0,32	0,79
	Tag 365	0,33	0,83
<b>SBA 40°C</b>	Tag 0	0,32	0,73
	Tag 1	0,32	0,77
	Tag 30	0,32	0,78
	Tag 365	0,34	0,78
<b>MF59 5°C</b>	Tag 0	0,119	0,223
	Tag 1	0,113	0,228
	Tag 2	0,111	0,231
	Tag 5	0,115	0,226
<b>MF59 25°C</b>	Tag 0	0,119	0,223

	Tag 1	0,128	0,329
	Tag 2	0,130	0,480
	Tag 5	0,158	0,859
<b>MF59</b>	Tag 0	0,119	0,223
<b>40°C</b>			
	Tag 1	0,347	2,809
	Tag 2	0,463	3,563
	Tag 5	0,741	5,638

Tabelle 3: Stabilität von MF 59 gegen SBA bei 40°C und einer Schüttelfrequenz von 50 Hz

5

		<b>LD 50% [µm]</b>	<b>LD 95% [µm]</b>
<b>SBA</b>	Tag 0	0,32	0,75
	Tag 1	0,33	0,76
	Tag 2	0,3	0,81
	Tag 5	0,32	0,83
<b>MF59</b>	Tag 0	0,119	0,223
	Tag 1	0,597	3,848
	Tag 2	0,302	7,721
	Tag 5	0,451	8,784

Beispiel 3. Langzeitstabilität von SBA: SBA-Dispersion bestehend aus 20% Bienenwachs, 2% Tween 80 wurde bei 4 – 6°C ein Jahr gelagert. Die PCS-Daten und Laserdiffraktometer-Durchmesser zeigten wenig oder keine Veränderung (Tabelle 4).

5

Tabelle 4: Langzeitstabilität von SBA: SBA-Dispersion bestehend aus 20% Bienenwachs, 2% Tween 80 wurde bei 4-6 °C ein Jahr gelagert.

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 10</b>	<b>Tag 30</b>	<b>Tag 60</b>	<b>Tag 90</b>	<b>Tag 365</b>
<b>LD 50% [µm]</b>	0,35	0,36	0,35	0,35	0,35	0,39
<b>LD 95% [µm]</b>	0,85	0,93	0,92	0,92	0,91	1,12
<b>mittlerer PCS Durchmesser [µm]</b>	0,31 6	0,327	0,337	0,336	0,346	0,365
<b>P.I.</b>	0,13 8	0,192	0,172	0,16	0,159	0,25

10

Beispiel 4. Hitzestabilität von SBA bei Autoklavierung (Hitze, Druck) versus FIA und MF59: Die SBA-Dispersion war zusammengesetzt aus 18% Hartparaffin, 4% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser. Sterilisation von jeweils 20 mL erfolgte in Injektionsfläschchen nach den Standardbedingungen des europäischen Arzneibuches (121°C, 2 bar, 15 Minuten). Partikelgrößenbestimmung erfolgte mit PCS und Laserdiffraktometrie (LD 95%) (P.I. :Polydispersitätsindex, Maß für die Breite der Partikelverteilung, MW: Mittelwert aus 3 Messungen, Stabw.: Standardabweichung, P.I. Polydispersitätsindex) (Tabelle 5). Die FIA-Emulsion zeigte nach Autoklavieren

15

Phasentrennung, MF59 ein deutliches Partikelwachstum. SBA ist physikalisch stabil und kann durch Autoklavieren sterilisiert werden.

Tabelle 5: Hitzestabilität von SBA bei Autoklavierung (Hitze, Druck) versus FIA und MF59: Die SBA-Dispersion war zusammengesetzt aus 18% Hartparaffin, 4% Tween 89/Span 85, 7/3 und Wasser. Sterilisation von jeweils 20 mL in Injektionsfläschchen bei 121°C, 2 bar, 15 Minuten. Partikelgrößenbestimmung erfolgte mit PCS und Laserdiffraktometrie.

	<b>PCS Durch- messer [nm] vor Sterili- sation</b>	<b>P.I. vor Sterili- sation</b>	<b>LD 95% [µm] vor Sterili- sation</b>	<b>PCS Durch- messer [nm] nach Sterili- sation</b>	<b>P.I. nach Sterili- sation</b>	<b>LD 95% [µm] nach Sterili- sation</b>
<b>SBA</b>	101	0,101	0,15	103	0,109	0,154
	100	0,11	0,15	101	0,111	0,155
	104	0,112	0,152	101	0,12	0,154
<b>MW</b>	102	0,108	0,151	102	0,113	0,154
<b>Stabw</b>	2,042	0,006	0,001	1,436	0,006	0,001
<b>MF59</b>	246	0,121	0,223	859	0,321	5,052
	234	0,103	0,223	912	0,305	5,056
	254	0,114	0,222	899	0,389	5,055
<b>MW</b>	244,67	0,11	0,22	890,00	0,34	5,05
<b>Stabw</b>	10,07	0,01	0,00	27,62	0,04	0,00

Beispiel 5. Physiologische Verträglichkeit: Zur Abschätzung der Verträglichkeit wurde die Zytotoxizität von SBA in Zellkulturen bestimmt (humane Granulozyten, HL60 Zellen). Zur Quantifizierung der Toxizität wurde die Viabilität der Zellen mit dem MTT-Test [Mosmann, T., J. Immunol. Meth. 1993, 65, 55-63] bestimmt. Die SBA-Dispersion war zusammengesetzt aus 10% Cetylpalmitat, 0,5% Poloxamer 188 und Wasser. Die Zellzahl pro well betrug 200.000 bei Humangranulozyten und 200.000 bei HL60 Zellen. Inkubation erfolgte für 12 Stunden. Bei SBA betrug die Viabilität 80 % bei den Granulozyten und 85 % bei den HL60 Zellen. Bei Nanopartikeln aus PLA betrug die Viabilität lediglich 5 %, bei Nanopartikeln aus PLA/GA sank sie auf 0 %. Die Verträglichkeit von SBA ist in den Zellkulturen um mindestens Faktor ca. 20 besser als die der FDA zugelassenen Polymere zur parenteralen Applikation.

Beispiel 6: Verträglichkeit nach parenteraler Applikation: Eingesetzt wurde wässrige SBA-Dispersion mit der Zusammensetzung 5% Hartparaffin, 5% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser. Es erfolgte parenterale Injektion in Schafe (n = 30), Injektionsort war die seitliche Brustwand, das Injektionsvolumen betrug 5 mL verteilt auf 4 Injektionsorte. Die Schafe zeigten keine Auffälligkeiten, weder am Injektionsort, noch in Ihrem Verhalten.

Beispiel 7: Biokompatibilität - Interaktion mit Körperproteinen: Die SBA-Dispersion war zusammengesetzt aus 10 Compritol, 2,5% Poloxamer 407 und Wasser. Herstellung erfolgte mit Hochdruckhomogenisation. Die Partikel wurden 5 Minuten inkubiert mit humanem Plasma, anschließend vom Plasma abgetrennt und die auf der Partikeloberfläche adsorbierten Körperproteine mit zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese [Blunk, T et al. Electrophoresis 14, 1382-1387 (1993)] bestimmt. Bei ver-

gleichbaren Partikeloberflächen adsorbierte auf SBA mit 96,41 cpm (counts per minute) im Vergleich zu Emulsionen eine sehr geringe Proteinmenge (Vergleichswerte: 472cpm auf Emulsion, 390 cpm auf Polystyrolpartikeln [Harnisch, S. et al. Elektrophoresis 1998, 19, 349-354, Blunk, T., Elektrophoresis 1993, 14, 1382-1387]. Komplementfaktoren, die eine Unverträglichkeit fördern, wurden auf der SBA-Oberfläche nicht detektiert.

- 10 Beispiel 8: Stabilität in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS): SBA zusammengesetzt aus 20% Hartparaffin, 5% Tween 80/ Span85 (7/3) und Wasser wurden mit PBS gemischt (2 mL SBA + 2 mL Salzlösung). Die physikalische Stabilität in der physiologischen Kochsalzlösung wurde mit Laserdiffraktometrie als Funktion der Zeit bestimmt.
- 15 Über 6 Stunden kam es zu keinem Anstieg der Partikelgröße (Durchmesser 90% und 95%, Tabelle 6) (Stabw.: Standardabweichung).

Tabelle 6: Stabilität in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) SBA (20% Hartparaffin, 5% Tween 80/Span85 (7/3)) wurden mit PBS gemischt (2 mL SBA + 2 mL Salzlösung). Bestimmung der physikalischen Stabilität in der physiologischen Kochsalzlösung mit Laserdiffraktometrie als Funktion der Zeit.

	<b>LD90%</b> [µm]	<b>Stab</b> <b>w</b>	<b>LD95% %</b> [µm]	<b>Stab</b> <b>w</b>
<b>SBA</b>	0,233	0,01	0,304	0,01 2
<b>SBA /PBS</b> <b>1+1</b> <b>10 Minu-</b> <b>ten</b>	0,189	0,01 1	0,224	0,01
<b>SBA /PBS</b> <b>1+1</b> <b>6 Stunden</b>	0,202	0,00 9	0,24	0,00 7

Beispiel 9: Adjuvans-Effekt im Vergleich zu molekularem Adjuvant (GMDP - N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-dipeptide) und FIA: Schafe wurden geimpft mit dem Stamm Mycoplasma Bovis PG 45 R9. Die Kultivierung des Impfantigens erfolgte in Standkultur über 72 Stunden unter mikroaerophilen Bedingungen in Hayflick-Medium. Inaktivierung erfolgte durch Zugabe von 0,1 %  $\beta$ -Propiolacton. Die Zellen wurden separiert, mit Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und auf einen Gehalt von  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL eingestellt. Die Sterilität der Präparation wurde gemäß Deutschem Arzneibuch Ausgabe 10 geprüft. Die Trockenmassebestimmung ergab einen Gehalt 1 mg/mL Mycoplasma Bovis-Antigen. Das Adjuvans SBA, GMDP und FIA wurde zu gleichen Teilen mit dem Antigen in Puffer gemischt. Injektionsvolumen war 5mL, verteilt auf 4 Injektionsorte.

15

Zusammensetzung von SBA war 4% Hartparaffin, 1% EQ1 (N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)- N,N-dimethylammoniumchlorid) und 4% Tween 80/Span

85 (7/3). Zusammensetzung des GMDP-Adjuvans war 5% Lipid und 0,5%Tensid. FIA wurde wie in Beispiel 1 hergestellt.

Blutentnahme erfolgte am Tag 0 vor Impfung, am Tag 35 und am Tag 63.

5 Bestimmung der Antikörper erfolgte mit ELISA. Für den ELISA-Test wurde ein handelsüblicher markierter Anti-IgG-Sheep der Firma Sigma eingesetzt.

10 SBA zeigte dabei eine vergleichbare Wirkintensität wie die Kombination von Lipidpartikeln mit GMDP. Weiterhin war SBA von vergleichbarer Effektivität wie FIA (Figur 1). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Wirkintensität zwischen den drei Adjuvantien.

15 Figur 1: Adjuvans-Effekt im Vergleich zu molekularem Adjuvant (GMDP - N-acetylglucosaminyln-N-acetylmuramyl-dipeptide) und FIA. Zusammensetzung von SBA war 4% Hartparaffin, 1% EQ1 (N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)-N,N-dimethylammoniumchlorid) und 4% Tween 80/Span 85 (7/3). Zusammensetzung des GMDP-Adjuvans war 5% EQ1 und 0,5% Montanide 888. FIA lt. Beispiel 1.

20

Beispiel 10: Effekt von SBA-Zusammensetzung auf Immuntiter: SBA-Dispersionen wurden mit identischem Lipid, aber unterschiedlichen Tensiden auf der Oberfläche hergestellt, d. h. sie unterscheiden sich in ihren Oberflächeneigenschaften. Die Formulierung SBA-1 besteht aus 4% Hartparaffin, 4% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser, die Formulierung SBA-2 enthält 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser. Die Effizienz zur Steigerung des Immuntiters wurde analog Beispiel 9 getestet, als Vergleich diente FIA. In Abhängigkeit von den Oberflächeneigenschaften ergeben sich unterschiedlich hohe Immunantworten

für die beiden SBA-Dispersionen (Figur 2). Die Stärke der gewünschten Immunantwort kann somit durch Variation der Oberflächeneigenschaften (Tenside, Stabilisatoren, Ladung etc.) eingestellt werden.

- 5 Figur 2: Effekt der SBA-Zusammensetzung auf Immuntiter: Formulierung SBA-1 besteht aus 4% Hartparaffin, 4% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser, Formulierung SBA-2 enthält 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/Span 85 (7/3) und Wasser.

10

Beispiel 11: Lagerstabilität von SBA-2: Die SBA-Dispersion SBA-2 aus Beispiel 11 wurde bei verschiedenen Temperaturen gelagert und die physikalische Stabilität über Messung der Partikelgröße mit PCS bestimmt. Ein Partikelwachstum trat nicht auf (Figur 3).

15

Figur 3: Lagerstabilität von SBA-2: Die SBA-Dispersion SBA-2 aus Beispiel 11 wurde bei verschiedenen Temperaturen gelagert und die physikalische Stabilität über Messung der Partikelgröße mit PCS bestimmt.

- 20 Beispiel 12: Oberflächenmodifikation von SBA-Dispersionen: Zur Modifikation der Oberflächenladung wurden SBA-Dispersionen mit grenzflächenaktiven positiv geladenen Stabilisatoren (EQ1 – Distearoylethyldiamoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid) und negativ geladenen Stabilisatoren (Natriumlaurylsulfat, (SDS)) hergestellt. Die Zusammensetzung der  
25 SBA-Dispersionen war: SBA-EQ1 (20% Cetylpalmitat, 4% Tween 80/Span 85 (7/3), 1% EQ1), SBA-CPC (18% Lipid, 10 % Tensid, 0,1% Cetylpyridiniumchlorid) und SBA-SDS (20% Cetylpalmitat, 1% SDS 80. Als Maß für die Ladung wurde das Zetapotential in Millivolt (mV) gemessen

(Elektrophorese-Messung), Zetasizer4 (Malvern Instruments, UK). Umwandlung der elektrophoretischen Mobilität in das Zetapotential erfolgte mit der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung. Die Zetapotentiale betragen +40 mV, +28 mV und -35 mV für die 3 SBA-Dispersionen.

5

Beispiel 13: Erhöhte zelluläre Immunantwort bei Hühnern bei Auffrischungsimpfung, die bei der Erstimmunisierung mit GMDP enthaltendem Adjuvans (SBA) behandelt worden waren. SBA (5% EQ1, 0,5% Montanide 10 888 wurde 1:1 mit dem Antigen (IgG vom Kanninchen) gemischt und subcutan injiziert. SBA enthielt 5µg GMDP und das Immunisierungsschema war wie folgt: Erstimmunisierung und zwei Auffrischungsimpfungen an Tag 14 und Tag 28. Die Antikörperbestimmung fand am Tag 42 15 statt und gemessen wurde der IgY Titer im Eigelb. Zur Untersuchung auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort fand an Tag 100 ein erneuter Antigenkontakt statt (erneute Auffrischungsimpfung) und am Tag 120 die Antikörperbestimmung. Die Ergebnisse zeigen, daß im Falle der Erstimmunisierung (Tag 14 und 28) mit GMDP enthaltendem SBA bei erneutem Antigenkontakt eine deutlich verstärkte Antikörperproduktion stattfindet. 20 Säulen 2,3 und 4, Figur 4.

Figur 4: Antikörperproduktion in Hühnern nach erfolgter Grundimmunisierung und erneutem Antigenkontakt an Tag 100. Die letzte Antikörperbestimmung der Grundimmunisierung fand am Tag 42 statt, die der Auffrischungsimpfung (Tag 100) an Tag 120. Die Zusammensetzung der 25 Impfstoffe der Beispiele 1-5 ist wie folgt:

1. Tag 42: Antigen in PBS, Tag 100: Antigen in PBS (k.A.: kein Adjuvant, Antigen in PBS)
  2. Tag 42: Antigen in SBA mit GMDP, Tag 100: Antigen in SBA
  3. Tag 42: Antigen in SBA mit GMDP, Tag 100: Antigen in FCA  
5 (FCA=Freunds komplettes Adjuvans)
  4. Tag 42: Antigen in SBA mit GMDP, Tag 100: Antigen in PBS
  5. Tag 42: Antigen in FCA, Tag 100: Antigen in PBS
- 10 Beispiel 14: Die Adsorption von GMDP auf SBA Partikel wurde mittels PCS untersucht. GMDP wurde mit SBA gemischt (4% Hartparaffin, 4% Tween 80/ Span 85 (7/3) und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Adsorption des GMDP an die Partikel zu ermöglichen. Die Endkonzentration betrug 1,435 mg/ml. Der Größenzuwachs beträgt 3,9 nm.
- 15 (PCS Durchmesser ohne GMDP: 99,4 nm, Standardabweichung: 0,764, Durchmesser mit GMDP: 103,3 nm, Standardabweichung: 0,755).
- Beispiel 15: Modifikation der Partikelgröße: Die SBA-Dispersion mit EQ1  
20 aus Beispiel 12 (SBA-EQ1) wurde mit verschiedenen Herstellungsverfahren produziert, um die Partikelgröße zu variieren. Die Messung der Partikelgröße erfolgte mit Laserdiffraktometrie (Laserdiffraktometer LS 230, Firma Coulter Electronics-Germany, Meßbereich: 40 nm – 2000 µm). Als Charakterisierungsparameter ist der Durchmesser 50% der Partikel ange-  
25 geben. Folgende Herstellungsmethoden wurden eingesetzt:
- a) Hochdruckhomogenisation: Das Lipid wurde geschmolzen, in die wäßrige Tensidlösung gegeben, mit einem Rührer dispergiert und

- die erhaltene Rohemulsion bei 80°C mit einem Hochdruckhomogenisator homogenisiert (Micron LAB 40, APV Gaulin Homogeniser GmbH, Germany). Homogenisationsparameter waren 500 bar Druck, 3 Homogenisationszyklen. Der Partikeldurchmesser 50 % betrug 0,15 µm.
- 5
- b) Die Rohemulsion wurde wie unter a) beschrieben hergestellt und mit einem Microfluidizer homogenisiert (Gerättyp 110-Y, Microfluidix Inc., USA).
- 10 Homogenisationsparameter waren 700 bar, 10 Minuten Zirkulationszeit. Der mittlere Partikeldurchmesser betrug 0,452 µm.
- c) Rotor-Stator-Dispergierung: Die Rohemulsion wurde wie unter a) beschrieben hergestellt und anschließend mit einem Ultraturrax (Typ T25, Firma Jahnke und Kunkel, Staufen, Germany) bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 10000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute und 10 Minuten dispergiert, Dispergiertemperatur 80° C. Die Partikeldurchmesser betragen 7,5 und 1,2 µm
- 15
- 20 d) Statischer Mischer: Lipid und wäßrige Tensidlösung aus a) wurden auf 80° C erhitzt und in einem statischen Mischer (Firma Sulzer, Germany) gemischt. Die Partikelgröße betrug 15,8 µm.
- a) Gasstrahlmühle: Behensäure Triglycerid wurde luftstrahlgemahlen (Jetmill, Mosokawa Alpine AG) und anschließend unter Rühren in der wäßrigen Tensidlösung bei Raumtemperatur dispergiert. Der Partikeldurchmesser 50 % betrug 37,03 µm.
- 25

- e) Mörsermühle: Das grob gepulverte Lipid wurde in einer Mörsermühle unter Zusatz von flüssigem Stickstoff für 3 Minuten und 15 Minuten gemahlen (Retsch Mörsermühle, Firma Reetsch, Germany). Das Lipid wurde wie in e) in Wasser dispergiert. Die mittlere Partikelgröße betrug 40  $\mu\text{m}$ .

Beispiel 16: Molekulares Adjuvans zur Erhöhung der zellulären Immunantwort inkorporiert in SBA: GMDP wurde in Span 85 (W/O) Emulgator gelöst und Cetylpalmitat dazugegeben. Die Mischung wurde bei 70 °C geschmolzen und nach dem Wiederererkalten in der Mörsermühle unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemahlen. Die gemahlene Lipid-GMDP-Mischung wurde in einer 2,5 prozentigen Tween 80 Lösung dispergiert und mit dem Ultraturrax 1 Minute bei 8000 U/min vordispergiert. Diese Dispersion wurde bei 4°C mittels Hochdruckhomogenisation in 3 Zyklen bei 1000 bar homogenisiert. Der PCS Durchmesser beträgt 260 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,430.

Beispiel 17: Molekulares Adjuvans zur Erhöhung der zellulären Immunantwort inkorporiert in die Grenzfläche: Saponine sind allgemein bekannt zur Erhöhung der zellulären Immunantwort. Die Herstellung der Partikel erfolgte mit einem Rotor-Stator analog zu Beispiel 15. Die Zusammensetzung der SBA-Dispersion ist 5% Cetylpalmitat, 0,5% Saponin (Quil A Saponin) und Wasser. Das Saponin wurde in der wässrigen Phase gelöst, diese auf 80° erhitzt und das geschmolzene Lipid zugegeben. Herstellung erfolgte mit einem Ultraturrax, rühren mit 10000 RPM für 5 Minuten. Der mit dem Laserdiffraktometer bestimmte Durchmesser 50 % betrug 2,28  $\mu\text{m}$ .

Beispiel 18: Produktion von SBA in Gegenwart eines amphiphilen Adjuvant. Das amphiphile Tensid CHAPS ist in der Literatur beschrieben als Mittel zur Erhöhung der Immunantwort. Die Partikel bestehen aus 5% Cetylpalmitat und 0,5% CHAPS. Die Herstellung der Partikel erfolgte analog Beispiel 20. Der Durchmesser 50% mittels Laserdiffraktometrie bestimmt beträgt 1,897  $\mu\text{m}$ .

Beispiel 19: Vergleich SBA versus reines molekulares Adjuvant: Die SBA-Dispersion Nr. 2 aus Beispiel 10 (SBA-2) wurde in Schafen getestet (Bedingungen wie in Beispiel 9) gegen molekulares Adjuvant, d. h. reines GMDP (N-acetylglucosaminy-N-acetylmuramyl-dipeptid). Die Konzentration an GMDP (0,1mg/ml) war analog zu Beispiel 9. Die in-vivo Testung erfolgte wie in Beispiel 9 beschrieben. SBA 2 zeigt eine höhere Wirkintensität als reines GMDP (Abb. 5).

15 Zusammensetzung von SBA-2: 4% Hartparaffin, 1% EQ1 (N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)-N,N-dimethylammoniumchlorid) und 4% Tween 80/ Span 85 (7/3).

20

Beispiel 20: Effekt der Ladung (Oberflächeneigenschaft) auf die Immunantwort (Schaf-Studie analog Beispiel 9): Zwischen den positiv geladenen Partikeln SBA 4 und SBA 2 ist kein Unterschied in der Wirkstärke feststellbar. EQ1 aus SBA 2 kann ohne Wirkungsverlust durch das toxi-  
kologisch untersuchte und als pharmazeutisches Konservierungsmittel  
25 zugelassene Cetylpyridiniumchlorid ersetzt werden (SBA 4). Gegenüber den negativ geladenen Partikeln der Formulierung SBA 5 beobachtet man

eine stärkere Wirkung der positiv geladenen Partikelformulierungen (Abb. 6).

Die SBA Formulierungen haben die folgende Zusammensetzung: SBA 4: 4% Hartparaffin, 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), 0,5% Cetylpyridiniumchlorid. SBA 5: 4% Hartparaffin, Natriumdeoxycholat 0,2%, Natriumcholat 0,2%, Natriumoleat 1%, Lipoid E80 2%. SBA 2: 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/Span 85 (7/3). Die Oberflächenladungen (Zetapotential) wurde in Leitfähigkeitswasser mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu$ S/cm bestimmt: SBA 4: +41,2 mV, SBA 2: +40,5 mV, SBA 5: -36,4 mV. Die Größen (PCS Durchmesser und Polydispersitätsindex (P.I.)) waren: SBA 4: 103 nm (P.I. 0,110), SBA 5: 107 nm (P.I. 0,115), SBA 2: 101nm (P.I. 0,101).

Beispiel 21: Speziesunabhängigkeit des Effektes (Hühner): Das Antigen aus Beispiel 9 wurde mit SBA 1 und SBA 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und 0,5 ml je Huhn injiziert. Die Antikörpertiter wurden aus den Hühneriern bestimmt. Zur Quantifizierung diente ein ELISA Test. Im Gegensatz zur Beschreibung in Beispiel 9 wurde im ELISA-Test ein markierter Anti-IgG-chicken verwendet. Die Erste Immunisierung fand am Tag 0 statt. Eine Boosterung mit den gleichen Zubereitungen erfolgte an Tag 31. Analog zu den Ergebnissen in Beispiel 10 zeigt sich eine stärkere Wirkung der Formulierung SBA 2 (Abb. 7).

Zusammensetzung SBA 1: 4% Hartparaffin und 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 107 nm ( P.I. 0,112) und SBA 2: 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 101nm (P.I. 0,101).

Beispiel 22: Einfluß der Lipidmatrix auf die Adjuvanswirkung: Bei der Formulierung SBA 2 wurde das nicht bioabbaubare Hartparaffin gegen das bioabbaubare Glyceroltribehenat ausgetauscht (SBA 3). Die Intensität der Wirkung unterscheidet sich nicht; Hartparaffin kann durch Glyceroltribehenat ersetzt werden (Abb. 8)

Zusammensetzung SBA 2: 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 101nm (P.I. 0,101) SBA 3: 4% Glyceroltribehenat, 1% EQ1 und 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 105nm (P.I. 0,112).

10

Beispiel 23: Die Formulierungen SBA 1 und SBA 2 wurden im Vergleich zu Aluminiumhydroxid getestet (Durchführung analog Beispiel 9). Die Wirkung von SBA 1 und von SBA 2 ist gleich der Wirkung von Aluminiumhydroxid (Kontrolle: Antigen in PBS). Analog Beispiel 9 ist SBA 2 stärker wirksam als SBA 1 (Abb. 9).

Zusammensetzung SBA 2: 4% Hartparaffin, 1% EQ1 und 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 101nm (P.I. 0,101) SBA 1: 4% Hartparaffin, 4% Tween 80/ Span 85 (7/3), PCS Durchmesser: 107 nm (P.I. 0,112).

20

Liste der Figuren:

- Figur 1: Adjuvans-Effekt im Vergleich zu molekularem Adjuvant (GMDP -  
5 N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-dipeptide) und FIA.
- Figur 2: Effekt der SBA-Zusammensetzung auf Immuntiter.
- Figur 3: Lagerstabilität von SBA-2.  
10
- Figur 4: Antikörperproduktion in Hühnern nach erfolgter Grundimmuni-  
sierung und erneutem Antigenkontakt an Tag 100, die letzte Antikörper-  
bestimmung der Grundimmunisierung fand am Tag 42 statt, die der Auf-  
frischungsimpfung (Tag 100) an Tag 120.  
15
- Figur 5: Adjuvans-Effekt von SBA im Vergleich zu molekularem Adjuvans  
GMDP (Beispiel 19)
- 20 Figur 6: Wirkung unterschiedlicher Partikelladung (Beispiel 20)
- Figur 7: Adjuvanswirkung in Hühnern (Beispiel 21)
- Figur 8: Einfluß der Lipidmatrix auf die Adjuvanswirkung (Beispiel 22)  
25
- Figur 9: Vergleich der Wirkung von SBA 1 und SBA 2 mit Aluminium-  
hydroxid (Beispiel 23)

### Patentansprüche

1. Mittel zur Steigerung der Immunantwort bei Impfungen von Men-  
5 schen und Tieren sowie zur Steigerung der Ausbeute von Antikörpern  
in der Immunologie und Antikörperproduktion, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß es sich um bei Raumtemperatur (= 20°C) feste Li-  
pidpartikel handelt, welche in einer für das jeweilige zu immunisie-  
rende Subjekt charakteristischen Optimaldosis, sowie optimaler Par-  
10 tikelgröße, Partikelladung sowie Oberflächeneigenschaften  
(stabilisierende Tensidschicht) appliziert werden, wobei sie der Lö-  
sung des Antigens einfach zugemischt werden.
2. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich um Partikel im Bereich von  
15 10-1000 nm handelt.
3. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich um Partikel im Bereich von 1-  
10 µm handelt.
- 20 4. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich um Partikel im Bereich von  
10-200 µm, insbesondere um Partikel im Bereich von 10-100 µm  
handelt.
5. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich um Partikel im Bereich von  
25 200-1000 µm, insbesondere um Partikel im Bereich von 200-500 µm  
handelt.
6. Mittel nach den Ansprüchen 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die  
zur Herstellung der Lipidpartikel eingesetzten Lipide bei Raumtempe-  
30 ratur fest sind, beispielsweise Ethylstearat, Octadecan, DDA, Natürli-

- che oder synthetische Triglyceride bzw. Mischungen derselben, Monoglyceride und Diglyceride, alleine oder Mischungen derselben oder mit z.B. Triglyceriden, selbst-emulgierende modifizierte Lipide, natürliche und synthetische Wachse, Fettalkohole, einschliesslich ihrer Ester und Ether sowie in Form von Lipidpeptiden, oder irgendwelche Mischungen derselben. Besonders geeignet sind synthetische Monoglyceride, Diglyceride und Triglyceride als individuelle Substanzen oder als Mischung (z.B. Hartfett), Imwitor 900, Triglyceride (z.B. Glyceroltrilaurat, Glycerolmyristat, Glycerolpalmitat, Glycerolstearat und Glycerolbehenat) und Wachse wie z.B. Cetylpalmitat und weisses Wachs (DAB) , wobei sie einzeln oder in Mischungen verwendet werden können, außerdem Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Hartparaffin.
- 5
7. Mittel nach dem Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß den zur Herstellung der Lipidpartikel eingesetzten festen Lipiden flüssige Lipide wie flüssige Glyceride (Miglyole), Erdnußöl, Rizinusöl, Sojaöl, Baumwollsamensöl, Rapsöl, Leinsamensöl, Olivenöl, Sonnenblumensöl, Distelöl zugemischt werden, wobei die daraus hergestellten Partikel bei Raumtemperatur (20° C) fest sind.
- 10
- 15
- 20
8. Mittel nach den Ansprüchen 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß sie positiv geladen sind.
9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung der positiven Ladung bei der Herstellung der Lipidpartikel die Substanzen Benzoldimethyl-hexadecylammoniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid, N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)-N,N-dimethylammoniumchlorid, Dimethyldiocta-
- 25

decylammoniumbromid einzeln oder in Mischung miteinander zugesetzt werden.

- 5 10. Mittel nach den Ansprüchen 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß sie negativ geladen sind
- 10 11. Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung der negativen Ladung bei der Herstellung der Lipidpartikel die folgenden Verbindungen: Diacetylphosphate, Phosphatidylglycerin, Lecithine unterschiedlicher Herkunft (z.B. Eilecithin oder Sojalecithin), chemisch modifizierte Lecithine (z.B. hydrierte Lecithine), genauso wie Phospholipide und Sphingolipide, Mischung von Lecithinen mit Phospholipiden, Sterolen (z.B. Cholesterol und Cholesterol-Derivate, genauso wie Stigmasterin) und ebenfalls gesättigte und un-
- 15 gesättigte Fettsäuren, Natriumcholat, Natriumglycocholat, Natriumtaurocholat, Natriumdeoxycholat, einzeln oder in Mischung miteinander zugesetzt werden.
- 20 12. Mittel nach den Ansprüchen 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß sie ungeladen oder nur gering geladen sind
- 25 13. Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur ihrer Erzeugung bei der Herstellung der Lipidpartikel ungeladene Substanzen wie Polyethylenglykol-Sorbitanfetsäureester (insbesondere die Tween Reihe wie Tween 80), Polyoxyethylenpolyoxypropylenkopolymere (insbesondere die Poloxamer-Reihe und die Poloxamine-Reihe), ethoxylierte Mono- und Diglyceride, ethoxylierte Lipide, ethoxylierte Fettalkohole oder Fettsäuren, und Ester und Ether von Zuckern oder von Zuckeralkoholen mit Fettsäuren oder Fettalkoholen (z.B. Saccha-

rose-Monostearat) einzeln oder in Mischung miteinander zugesetzt werden.

14. Mittel nach den Ansprüchen 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß ih-  
5 nen ein oder mehrere Adjuvantien zugesetzt sind.
15. Mittel nach dem Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es mo-  
lekulare Adjuvantien wie N-Acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-N-  
acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin [GMDP], Dimethyldioctadecy-  
10 lammoniumbromid [DDA], N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin  
[MDP], N,N Di-( $\beta$ -Stearoylethyl)- N,N-dimethylammoniumchlorid  
[EQ1], Glykopeptide, Bestandteile der Zellwand von Mycobakterien,  
Saponine, quaternäre Amine, wie z.B. Cetylpyridiniumchlorid und  
Benzalkoniumchlorid, zwitterionische Amine wie CHAPS (3-[(3-  
15 cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), Dextran-  
sulfat, Dextran, 3-Odesacyl-4'-monophosphoryl lipid A [MPL®], N-  
Acetyl-L-Alanyl-Disoglutaminyll-L-Alanin- 82) - 1,2 dipalmitoyl - sn  
glycero - 3-(hydroxy-phosphoryloxy))ethylamid, Mononatriumsalz  
[MTP-PE], Granulocyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Fak-  
20 tor [GM-CSF], Blockcopolymere, z.B. P1205, Poloxamer 401 (Pluronic  
L121), Dimyristoylphosphatidylcholin [DMPC], Dehydroepiandro-  
sterone-3 $\beta$ -01-17-on [DHEA], Dimyristoylphosphatidylglycerol  
[DMPG], Deoxycholsäure- Natriumsalz, Cytokine, Imiquimod, DTP-  
GDP, Saponine, 7-Allyl-8-Oxoguanosin, Montanide ISA 51, Montani-  
25 de ISA 720, MPL, Murametid, Murapalmitin, D-Murapalmitin, 1-  
Monopalmitoyl-rac-glycerol, Dicytylphosphat, Polymethylmethacrylat  
[PMMA], PEG-Sorbitanfettsäureester wie Polysorbat 80 (TWEEN® 80),  
Quil A Saponin, Sorbitanfettsäureester wie Sorbitantrioleat

(SPAN®85, Arlacel85), DTP-DPP, Stearyl-Tyrosin, N,N dioctadecyl-N',N'-bis(2hydroxyethyl) Propandiamin, Calcitriol, enthält.

- 5 16. Mittel nach dem Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es partikuläre Adjuvantien wie z.B. Aluminiumhydroxid, Polymerpartikel, Liposomen, sind.
- 10 17. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß ihnen die Wirksamkeit von Adjuvantien steigernde Substanzen aus der Gruppe der zweiwertigen Übergangsmetallionen, quaternären Aminen, Dextran, Dextransulfat, Vitamin-E-Derivate wie Vitamin-E-Phosphat und Vitamin-E-Hemisuccinat, und Isoprinosin zugestzt wurden.
- 15 18. Mittel nach den Ansprüchen 1-17 dadurch hergestellt, daß die Lipidpartikel durch Zerkleinerung von Lipiden im festen Aggregatzustand hergestellt wurden, z.B. Mörsermühle, Gasstrahlmühle, Elektrosputtering, Hochdruckhomogenisation, Mikrofluidisation.
- 20 19. Mittel nach den Ansprüchen 1-17 dadurch hergestellt, daß die Lipidpartikel durch Zerkleinerung von Lipiden im geschmolzenen Zustand unter Dispergierung in einer äußeren Phase (z.B. hoctourige Rührer, statische Mischer im Mikromaßstab und Makromaßstab, Rotor-Stator-Mühlen, Kolloidmühlen, Hochdruckhomogenisation, Mikrofluidisation, Sprühverfahren wie Sprühtrocknung und Elektrosprayverfahren) hergestellt werden, wobei die äußere Phase flüssig (Wasser, organische Flüssigkeiten, Öle oder deren Mischungen) oder
- 25 gasförmig (Luft, Stickstoff, Edelgas) sein kann.

20. Mittel nach den Ansprüchen 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidpartikel und ggf. das zusätzliche Adjuvants in einer äußeren Phase dispergiert sind, z.B. wäßrige Flüssigkeiten wie Wasser, isotonische Zuckerlösungen und isotonischer Natriumchloridlösung,
- 5 nichtwäßrige Flüssigkeiten wie PEG 400 oder 600, organische Flüssigkeiten wie Öle (Miglyole, Erdnußöl, Rizinusöl, Sojaöl, Baumwollsaamenöl, Rapsöl, Leinsamenöl, Olivenöl, Sonnenblumenöl, Distelöl und andere Öle oder deren Mischungen.
- 10 21. Mittel nach dem Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der äußeren Phase viskositätserhöhende Substanzen zugestezt wurden, z.B.
22. Mittel nach den Ansprüchen 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidpartikel und ggf. das zusätzliche Adjuvants in einer trockenen
- 15 Form vorliegen, z.B. als Lyophilisat, sprühgetrocknetes Produkt, feste Dispersion, Pellet oder Tablette.

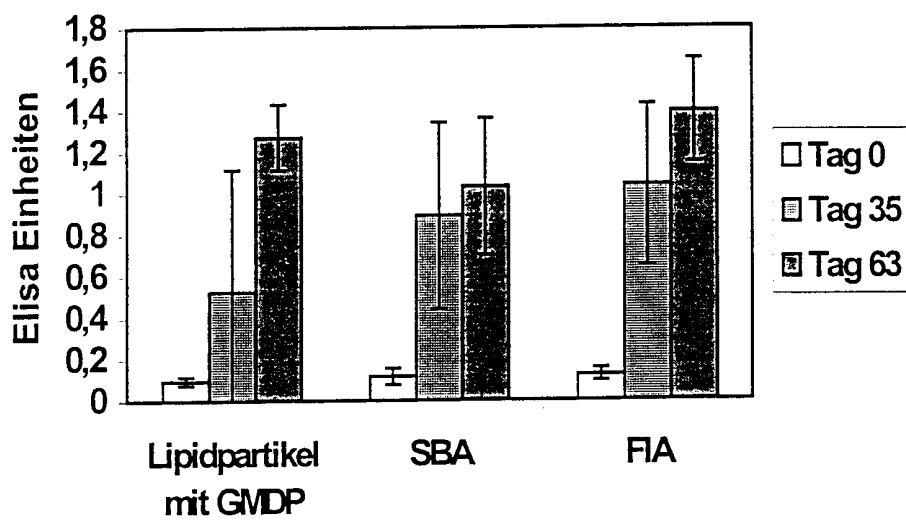


Fig. 1

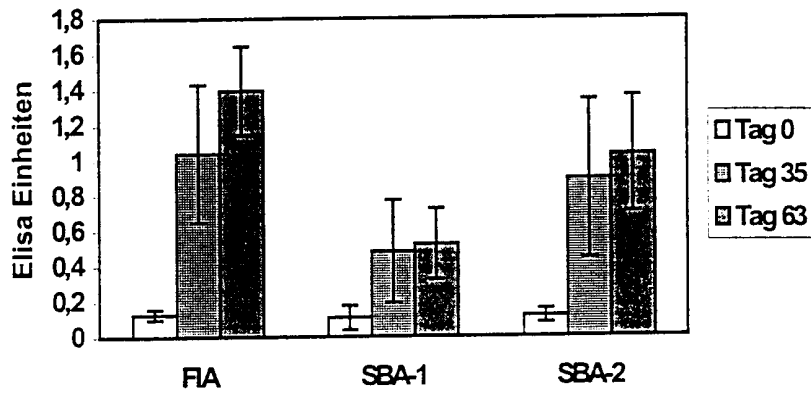


Fig. 2

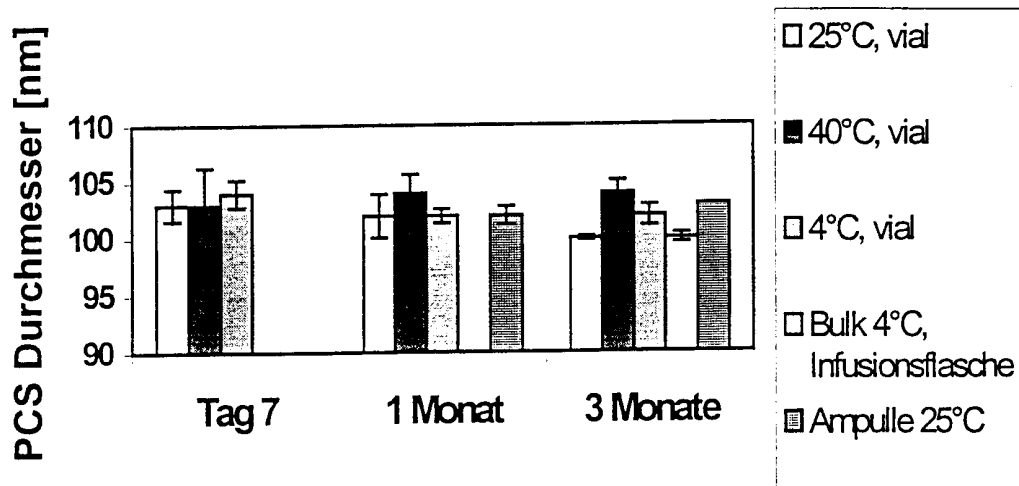


Fig. 3

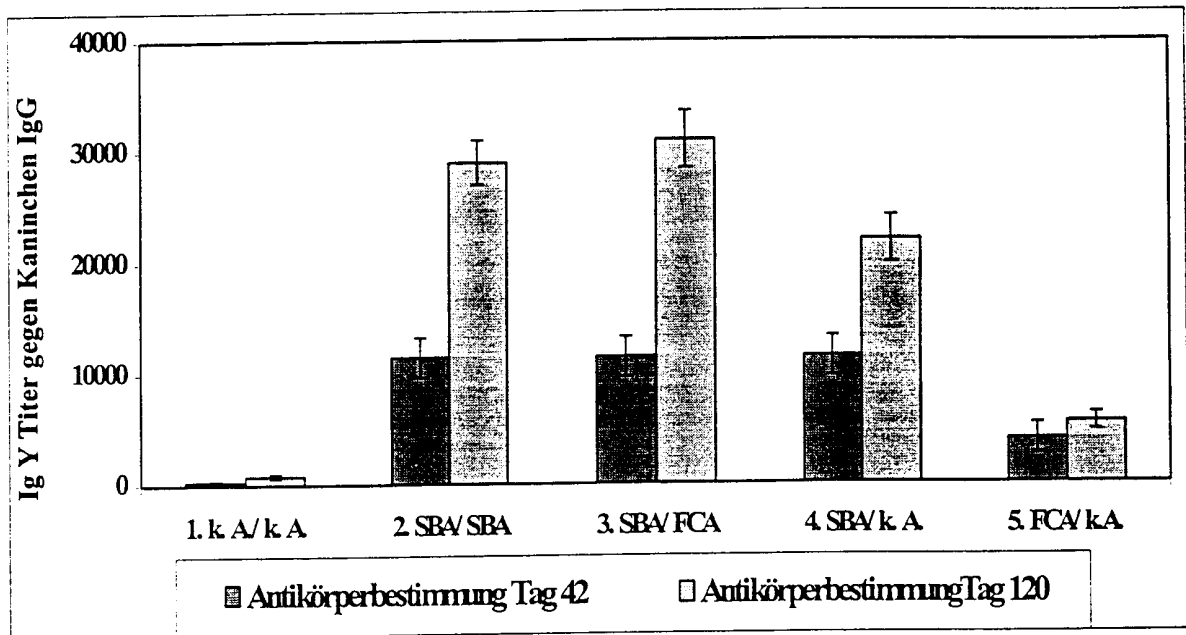


Fig. 4

5/9

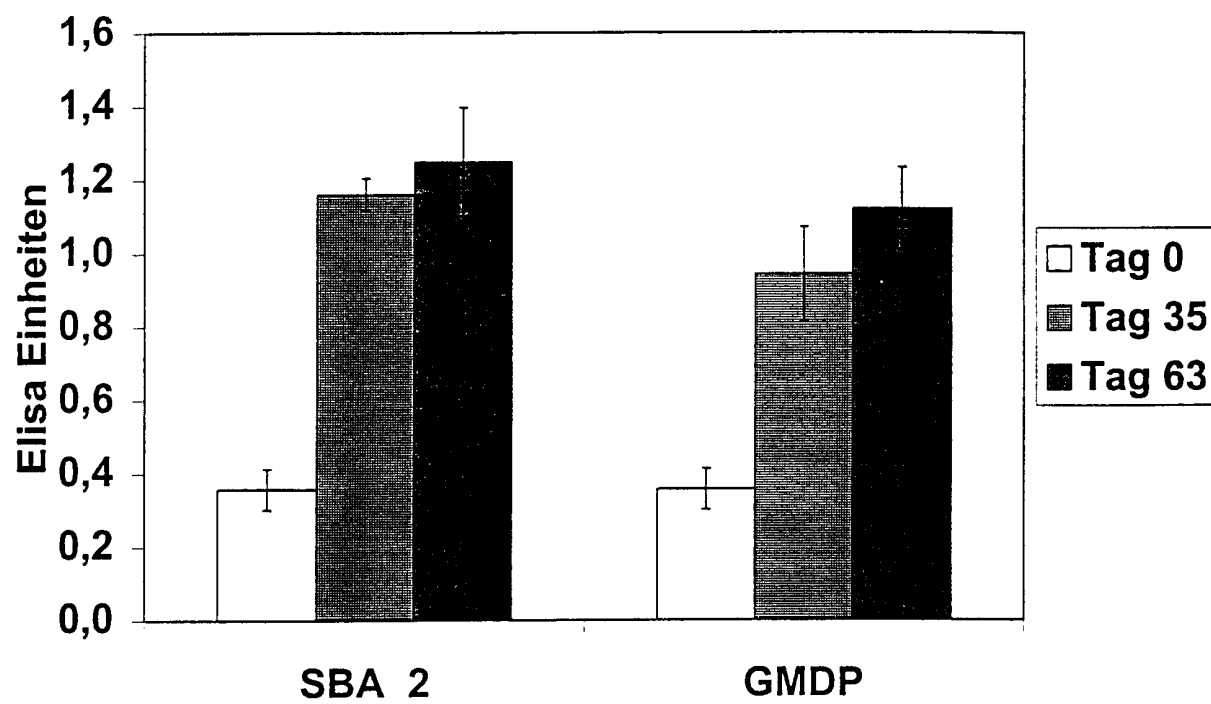


Fig. 5

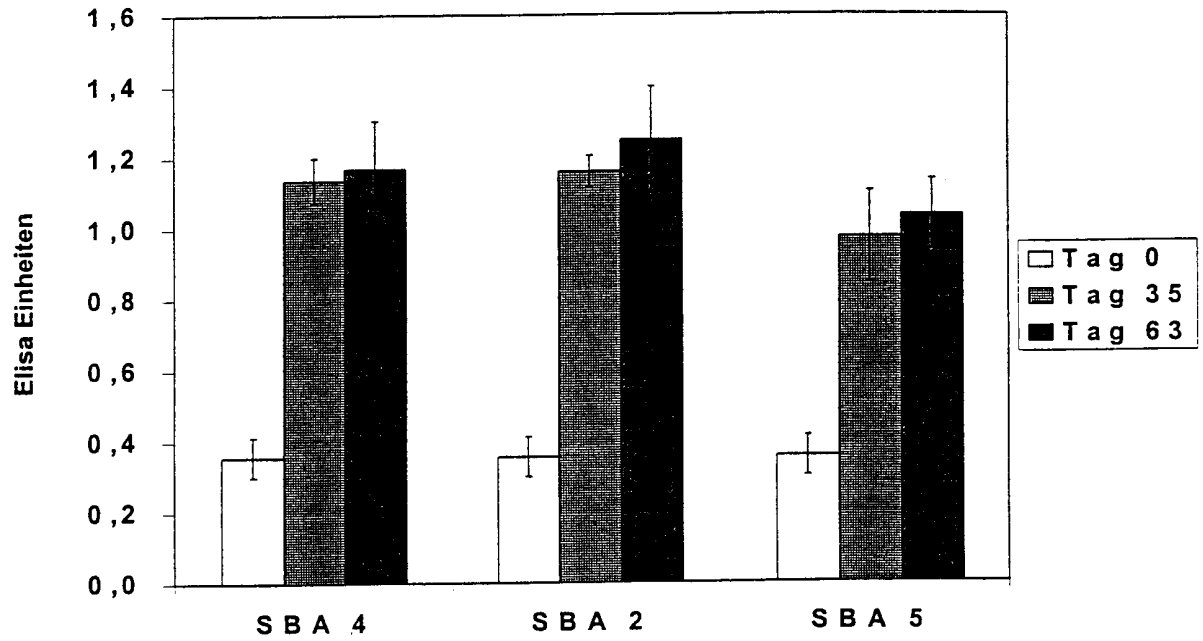


Fig. 6

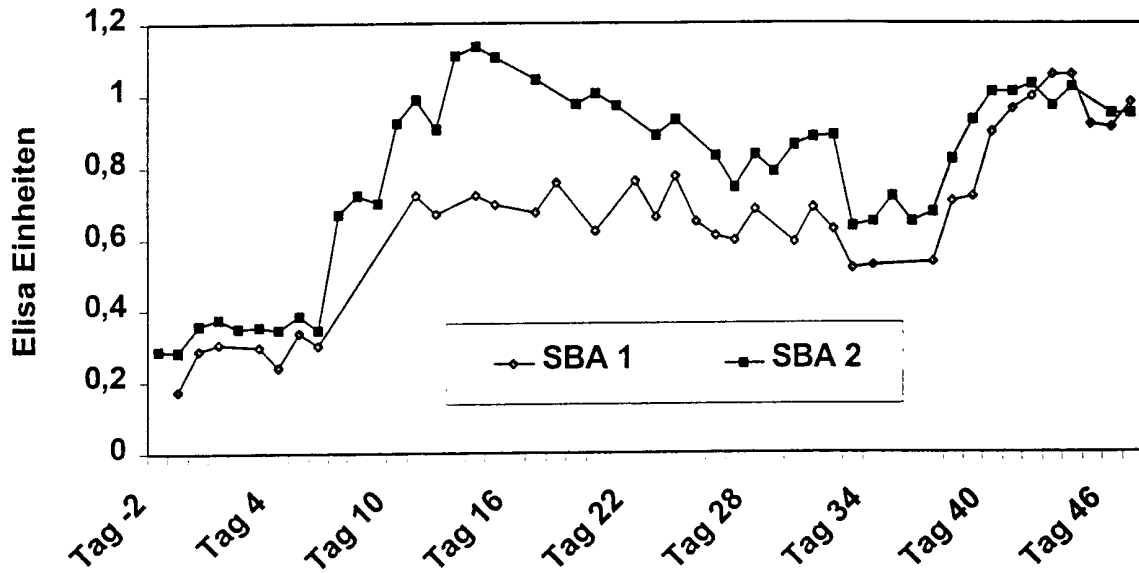


Fig. 7

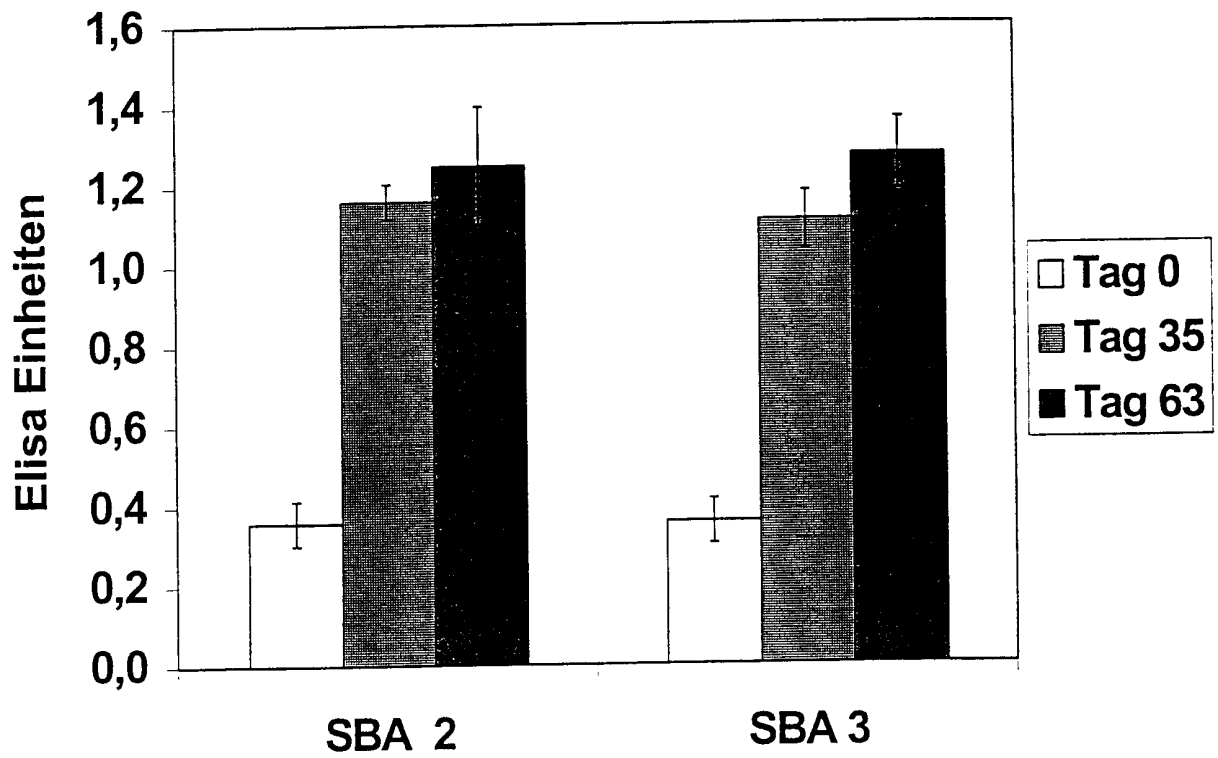


Fig. 8

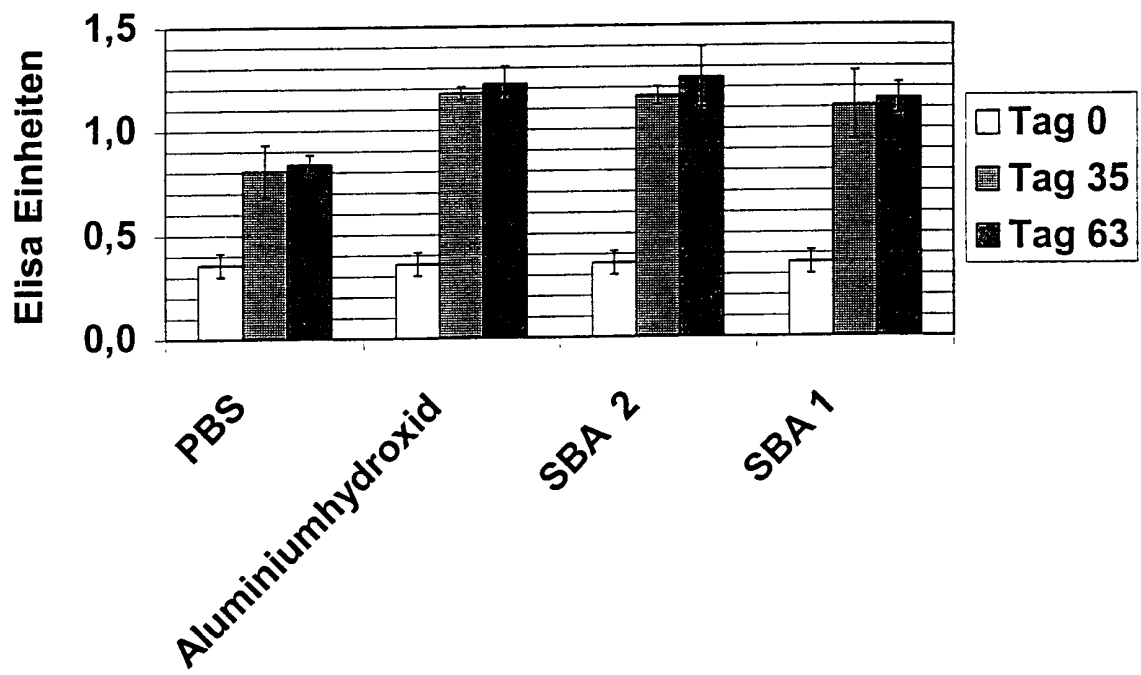


Fig. 9