

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 294 633 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 9/113
A 61 K 37/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 K / 341 001 8	(22)	25.05.90	(44)	10.10.91
(31)	357,035	(32)	25.05.89	(33)	US

(71) siehe (73)
(72) van Nest, Gary; Ott, Gary; Barchfeld, Gail, US
(73) Chiron Corporation, Emeryville, Cal. 94608-2916, 4560 Horton Street, US
(74) Patentanwälte Glawe, Delfs, Moll + Partner, Rothenbaumchaussee 58, W - 2000 Hamburg 13, DE

(54) Adjuvans-Formulierung, enthaltend eine Öltröpfchenemulsion

(55) Adjuvans-Formulierung; Adjuvans-Zusammensetzung; metabolisierbares Öl; Emulgator; Detergens; Öl-in-Wasser-Emulsion; Immunostimulans; lipophiles Muramylpeptid

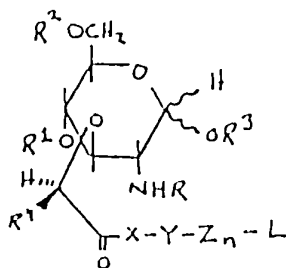
(57) Die Erfindung betrifft eine Adjuvans-Formulierung, enthaltend eine Öltröpfchenemulsion. In der Adjuvans-Zusammensetzung, die ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator enthält, liegen das Öl und das Detergens in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, von denen im wesentlichen alle einen Durchmesser kleiner als ein Mikron haben, vor. In bevorzugten Ausführungsformen stellt der Emulgator ein Immunostimulans, z. B. ein lipophiles Muramylpeptid, dar. Alternativ kann ein Immunostimulans getrennt von dem Emulgator verwendet werden.

ISSN 0433-6461

21 Seiten

Patentansprüche:

1. Adjuvans-Zusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie
 - (1) ein metabolisiertes Öl und
 - (2) einen Emulgator,
 enthält, wobei das Öl und der Emulgator in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, von denen im wesentlichen alle einen Durchmesser von <1 Mikron aufweisen, vorliegen und die Zusammensetzung kein Polyoxypropylen-Polyoxyethylen-Blockcopolymeres enthält.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Öl ein Öl tierischer Herkunft ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Öl ein ungesättigter Kohlenwasserstoff ist.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Öl ein Terpenoid ist.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Öl ein Öl pflanzlicher Herkunft ist.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung 0,5 bis 20 Vol.-% des Öls in einem wäßrigen Medium umfaßt.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Emulgator ein nichtionisches Detergens umfaßt.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Emulgator einen Polyoxyethylensorbitanmono-, -di- oder -triester oder einen Sorbitanmono-, -di- oder -triester umfaßt.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung 0,01 bis 0,5 Gew.-% des Emulgators umfaßt.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung zusätzlich ein getrenntes Immunostimulans umfaßt.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans Alum oder eine Bakterienzellwand-Komponente umfaßt.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung 0,0001 bis 1,0 Gew.-% des Immunostimulans umfaßt.
13. Zusammensetzung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans ein Muramylpeptid umfaßt.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Emulgator zusätzlich als ein Immunostimulans wirkt.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zusammensetzung 0,01 bis 0,5 Gew.-% des Immunostimulans umfaßt.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans ein lipophiles Muramylpeptid umfaßt.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Peptid ein Muramyl-dipeptid oder ein Muramyl-tripeptid umfaßt.
18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Peptid weiterhin ein Phospholipid umfaßt.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Phospholipid ein Phosphoglycerid umfaßt.
20. Zusammensetzung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Peptid eine Verbindung mit der Formel



(II)

ist,

wobei R Wasserstoff oder COCH₃;

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen Lipidrest;

R⁴ Wasserstoff oder eine Alkylgruppe;

X und Z unabhängig voneinander einen Aminoacyl-Rest, ausgewählt aus der von Alanyl, Valyl, Leucyl, Isoleucyl, α-Aminobutyryl, Threonyl, Methionyl, Cysteinyl, Glutamyl, Isoglutamyl, Glutaminyl, Isoglutaminyl, Aspartyl, Phenylalanyl, Tyrosyl, Tryptophanyl, Lysyl, Ornithinyl, Arginyl, Histidyl, Asparginyl, Prolyl, Hydroxypropyl, Seryl und Glycyl gebildeten Gruppe;

n 0 oder 1;

Y-NHCHR⁵CH₂CH₂CO-, wobei R⁵ eine gegebenenfalls veresterte oder amidierte Carboxyl-Gruppe darstellt; und

L OH, NR⁶R⁷, wobei R⁶ und R⁷ unabhängig voneinander H oder eine niedere Alkyl-Gruppe darstellen, oder ein Lipidrest bedeuten.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß R⁴ Methyl, X Alanyl und Y Isoglutaminyl bedeuten.
22. Zusammensetzung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß n = 1, Z Alanyl, R Acetyl sowie R¹, R² und R³ Wasserstoffatome bedeuten.
23. Zusammensetzung nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß L einen Phospholipidrest umfaßt.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Phospholipidrest ein Diacylphosphoglycerid umfaßt.
25. Zusammensetzung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Peptid N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2[1,2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-(hydroxyphosphoryloxy)]ethylamid ist.
26. Zusammensetzung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine der Gruppen R¹ und R² eine Acyl-Gruppe mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen darstellt.
27. Zusammensetzung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine der Gruppen R¹, R² und R³ eine Acyl-Gruppe mit 14 bis 22 Kohlenstoffatomen darstellt.
28. Impfzusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie
 - (1) eine immunostimulierende Menge einer Antigen-Substanz und
 - (2) eine immunostimulierende Menge des Adjuvans nach Anspruch 1 enthält.
29. Verfahren zur Stimulierung einer Immunreaktion in einem Wirtstier, **gekennzeichnet durch** eine Verabreichung eines Schutzantigens in Anwesenheit einer immunostimulierenden Menge von metabolisierbaren Submikron-Öltröpfchen in einer kontinuierlichen wäßrigen Phase.
30. Verfahren nach Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Öltröpfchen zusätzlich einen Emulgator enthalten.
31. Verfahren nach Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Öltröpfchen zusätzlich ein Immunostimulans getrennt von dem Öl und dem Emulgator enthalten.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans Alum oder eine bakterielle Zellwandkomponente umfaßt.
33. Verfahren nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans ein Muramylpeptid umfaßt.
34. Verfahren nach Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Emulgator ebenfalls als Immunostimulans wirkt.
35. Verfahren nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Immunostimulans ein lipophiles Muramylpeptid umfaßt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich allgemein auf Adjuvans-Formulierungen zur Verwendung bei der Steigerung der Wirksamkeit von Impfstoffen, insbesondere auf Adjuvantien, die Öl-in-Wasser-Emulsionen enthalten.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Das Erscheinen neuer, mit der Technologie der rekombinanten DNA hergestellter Untereinheit-Impfstoffe hat den Bedarf an sicheren und wirksamen Adjuvantien gesteigert. Herkömmliche antivirale Lebend-Impfstoffe erfordern keine Adjuvantien. Virus-Totimpfstoffe sind im allgemeinen viel immunogener als Untereinheit-Impfstoffe und können ohne Adjuvans oder mit

Adjuvantien, die eine begrenzte Fähigkeit zur Stimulierung von Immunreaktionen besitzen, wirksam sein. Die neuen, von rekombinanter DNA abgeleiteten Untereinheit-Impfstoffe stellen im allgemeinen isolierte Proteine oder Protein-Gemische dar, die, verglichen mit ganzen Viren, eine begrenzte Immunogenität besitzen, wenn sie auch in bezug auf Sicherheit und Herstellungskosten wesentliche Vorteile gegenüber den herkömmlichen Impfstoffen bieten. Diese Stoffe werden in dieser Beschreibung zur Unterscheidung von ganzen Organismen (und Teilen davon), die früher in Impfstoffen verwendet wurden, als molekulare Antigene bezeichnet. Diese Impfstoffe erfordern zum Erreichen ihres vollen Potentials bei der Verhütung von Krankheiten Adjuvantien mit signifikanten immunostimulatorischen Eigenschaften.

Zur Zeit sind in den Vereinigten Staaten die einzigen für die Anwendung beim Menschen zugelassenen Adjuvantien pharmazeutisch verträgliche Aluminiumsalze (Alum; im folgenden so bezeichnet). Die Adjuvantien sind für einige Impfstoffe, wie Hepatitis B, Diphtherie, Polio, Tollwut und Grippe, eingesetzt worden, können aber für andere nicht verwendbar sein, insbesondere wenn für den Schutz die Anregung der zell-vermittelten Immunität erforderlich ist. Berichte zeigen, daß Alum bei der Steigerung der Wirksamkeit von Keuchhusten- und Typhus-Impfstoffen versagt und bei Adenovirus-Impfstoffen nur eine kleine Wirkung ergibt. Probleme mit Aluminiumsalz umfassen die Entstehung von Granulomen am Injektionsort und partielle Schwankungen der Alum-Präparate.

Das vollständige Freund-Adjuvans (CFA) ist ein starkes Immunostimulans, das mit vielen Antigenen auf experimenteller Basis erfolgreich verwendet worden ist. CFA enthält drei Bestandteile: ein Mineralöl, einen Emulgator wie Arlacel A und abgetötete Mykobakterien wie *Mycobacterium tuberculosis*. Zur Herstellung einer Wasser-in-Öl-Emulsion werden wäßrige Antigenlösungen mit diesen Bestandteilen gemischt. CFA verursacht jedoch starke Nebenwirkungen wie Schmerzen, Abszeßbildungen und Fieber, was seine Verwendung sowohl in menschlichen als auch in tierärztlichen Impfstoffen verhindert. Die Nebeneffekte werden im wesentlichen von den Reaktionen des Wirts auf die mykobakteriellen Bestandteile von CFA verursacht. Das unvollständige Freund-Adjuvans (IFA) ist ähnlich dem CFA, jedoch ohne den bakteriellen Bestandteil. Während es für die Verwendung in den Vereinigten Staaten nicht zugelassen ist, ist IFA in anderen Ländern bei verschiedenen Arten von Impfstoffen eingesetzt worden. IFA ist erfolgreich bei Menschen mit Grippe- und Polio-Impfstoffen und mit verschiedenen Tierimpfstoffen, wie Tollwut, Hundestaupe und Maul- und Klauenseuche, eingesetzt worden. Versuche haben gezeigt, daß sowohl das in IFA verwendete Öl als auch der Emulgator bei Mäusen Tumore verursachen; dies zeigt, daß ein anderes Adjuvans für die Verwendung beim Menschen besser wäre.

Muramyl-dipeptid (MDP) stellt die kleinste Einheit des mykobakteriellen Zellwandkomplexes dar, die die mit CFA beobachtete Adjuvans-Wirksamkeit erzeugt; siehe Ellouz et al. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59: 1317. Es wurden viele synthetische Analoga von MDP entwickelt, die eine weite Spanne der Adjuvans-Wirksamkeit und der Nebeneffekte zeigen (einen Überblick gibt Chedid et al. [1978] *Prog. Allergy*, 25: 63). Drei Analoga, die besonders nützlich als Impfstoff-Adjuvantien sein können, sind Threonyl-Derivate von MDP, siehe Byars et al. (1987) *Vaccine*, 5: 223; N-Butyl-Derivate von MDP, siehe Chedid et al. (1982) *Infect. and Immun.*, 35: 417; und lipophile Derivate von Muramyltripeptid, siehe Gisler et al. (1981) in *Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds*, Herausgeber Y. Yamamura und S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, S. 167. Diese Verbindungen stimulieren wirksam die humorale und zell-vermittelte Immunität und zeigen niedrige Toxizitäten. Ein vielversprechendes lipophiles Derivat von MDP ist N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-[1,2-di-palmitoyl-sn-glycero-3-3(hydroxyphosphoryloxy)]ethylamid (MTP-PE). Dieses Muramyltripeptid hat Phospholipidenden, die die Assoziation des hydrophoben Teils des Moleküls mit einer Lipid-Umgebung ermöglichen, während der Muramylpeptid-Teil mit der wäßrigen Umgebung assoziiert. Daher kann das MTP-PE selbst als Emulgator zur Bildung stabiler Öl-in-Wasser-Emulsionen wirken.

Ursprüngliche Versuche mit Mäusen in den Laboratorien der in der vorliegenden Erfindung genannten Erfinder mit MTP-PE zeigten, daß dieses Adjuvans bei der Stimulierung von Anti-HSV-gD-Antikörpertitern gegen Herpes Simplex-Virus-gD-Antigene wirksam ist und daß die Wirksamkeit erheblich gesteigert wurde, wenn das MTP-PE und das gD in Öl verabreicht wurden (IFA) und nicht in wäßriger Lösung. Weil IFA für die Verwendung beim Menschen nicht zugelassen ist, wurden für MTP-PE und das Antigen andere Öl-Verabreichungssysteme untersucht. Eine Emulsion von 4% Squalen mit 0,008% Tween 80 und HSV-gD ergab bei Meerschweinchen eine sehr gute Immunität. Diese Formulierung, MTP-PE-LO (wenig Öl), wurde durch Passieren durch eine subkutane Nadel emulgiert, und war ziemlich instabil. Dennoch ergab diese Formulierung hohe Antikörpertiter beim Meerschweinchen und guten Schutz bei einer HSV-Exposition von immunisierten Meerschweinchen. Die Formulierung war am wirksamsten, wenn sie in die Pfote verabreicht wurde, ergab aber ebenfalls annehmbare Antikörpertiter und Schutz, wenn sie intramuskulär verabreicht wurde. Diese Daten erschienen in zwei Veröffentlichungen (Sanchez-Pescador et al., *J. Immunology*, 141, 1720-1727, 1988, und *Technological Advances in Vaccine Development*, Lasky et al., Herausgeber, Alan R. Liss, Inc., S. 445 bis 469, 1988). Die MTP-PE-LO-Formulierung war ebenso bei der Stimulierung der Immunreaktion von Meerschweinchen auf das in Hefe hergestellte HIV-Hüllprotein wirksam. Sowohl ELISA-Antikörpertiter als auch virusneutralisierende Antikörpertiter wurden mit der MTP-PE-Formulierung auf einen hohen Gehalt stimuliert. Wenn jedoch die gleiche Formulierung bei großen Tieren wie Ziegen und Pavianen getestet wurde, waren die Zusammensetzungen nicht so wirksam.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Wirksamkeit von Impfstoffen beim Menschen und bei großen Tieren zu erhöhen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Adjuvans-Formulierung bereitzustellen, die geeignet ist, Immunreaktionen auf molekulare Antigene beim Menschen und bei großen Säugetieren zu stimulieren.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß eine Adjuvans-Formulierung durch eine Zusammensetzung bereitgestellt wird, die ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator enthält, wobei das Öl und der Emulgator in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, von denen im wesentlichen alle einen Durchmesser von <1 Mikron aufweisen, vorliegt

und die Zusammensetzung keine Polyoxypropylen-polyoxyethylen-blockcopolymeren enthält, die früher als für Herstellung von Submikron-Öl-in-Wasser-Emulsionen erforderlich angesehen wurden. Die Zusammensetzung kann weiterhin ein Immunostimulans (das mit dem Emulgator übereinstimmen kann, wenn ein amphipathisches Immunostimulans ausgewählt wurde) enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Adjuvans-Zusammensetzung, die ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator enthält, wobei das Öl und der Emulgator in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, von denen im wesentlichen alle einen Durchmesser von <1 Mikron aufweisen, vorliegt. Untersuchungen in den Laboratorien der in der vorliegenden Erfindung genannten Erfinder, die detailliert in den folgenden Beispielen dargestellt werden, zeigen eine überraschende Überlegenheit gegenüber Adjuvanzusammensetzungen, die Öl und Emulgatoren enthalten, in denen die Öltröpfchen wesentlich größer als die bei der vorliegenden Erfindung erhaltenen sind.

Die einzelnen Bestandteile der Adjuvans-Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung sind bekannt, wenn auch solche Zusammensetzungen noch nicht auf dieselbe Weise kombiniert und keine Öltröpfchen mit so kleinem Durchmesser erhalten wurden. Demgemäß sind die einzelnen Bestandteile, obwohl unten sowohl im allgemeinen als auch in einigen Einzelheiten für bevorzugte Ausführungsformen beschrieben, im Fachgebiet allgemein bekannt, und die hierin verwendeten Begriffe, wie metabolisierbares Öl, Emulgator, Immunostimulans, Muramylpeptid und lipophiles Muramylpeptid, sind ausreichend bekannt, um diese Verbindungen dem Fachmann ohne weitere Beschreibung zu bezeichnen.

Eine Komponente dieser Formulierungen ist ein metabolisierbares nicht-toxisches Öl, vorzugsweise eines, das 6 bis 30 Kohlenstoffatome enthält, umfassend, aber nicht beschränkt auf Alkane, Alkene, Alkine und ihre entsprechenden Säuren und Alkohole, die Ether und Ester derselben, und Gemische derselben. Das Öl kann ein beliebiges Öl pflanzlicher Herkunft, ein Öl von Fischen, ein Öl tierischer Herkunft oder ein synthetisch hergestelltes Öl sein, das von dem Körper des Empfängers, dem das Adjuvans verabreicht wird, metabolisiert werden kann, und das für den Empfänger nicht toxisch ist. Der Empfänger ist ein Tier, typischerweise ein Säugetier, und vorzugsweise ein Mensch. Mineralöle und ähnliche toxische Petroleumdestillatöle sind ausdrücklich bei der vorliegenden Erfindung ausgeschlossen.

Die Ölkomponente dieser Erfindung kann jedes langkettige Alkan, Alken oder Alkin oder eine Säure oder ein Alkoholderivat derselben sein, und zwar sowohl die freien Säuren oder Salze derselben oder Ester wie Mono-, Di- oder Triester, z. B. Triglyceride und Ester mit 1,2-Propandiol oder ähnlichen Polyhydroxyalkoholen. Alkohole können unter Verwendung einer mono- oder polyfunktionellen Säure, z. B. Essigsäure, Propionsäure, Zitronensäure oder ähnlichem, acyliert sein. Von langkettigen Alkoholen abgeleitete Ether, die Öle sind und die anderen hierin festgelegten Kriterien erfüllen, können ebenfalls verwendet werden. Der jeweilige Alkan-, Alken- oder Alkinrest und seine Säure- oder Alkoholderivate weisen 6 bis 30 Kohlenstoffatome auf. Der Rest kann eine geradkettige oder verzweigte Struktur haben. Er kann vollständig gesättigt sein oder eine Doppel- oder Dreifachbindung oder mehrere enthalten. Wenn Öle auf Basis von Mono- oder Polyestern oder Öle auf Basis von Ethern eingesetzt werden, bezieht sich die Beschränkung auf 6 bis 30 Kohlenstoffatome auf die jeweiligen Fettsäure- oder Fettalkoholreste, und nicht auf die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome.

Es kann jedes metabolisierbare Öl, insbesondere aus einer tierischen oder pflanzlichen Quelle, oder vom Fisch stammend, verwendet werden. Es ist wichtig, daß das Öl von dem Wirt, dem es verabreicht wurde, metabolisiert wird; anderenfalls kann der Ölbestandteil Abszesse, Granulome oder sogar Carcinome verursachen oder kann (bei Gebrauch in der tierärztlichen Praxis) das Fleisch von geimpften Vögeln oder Tieren gemäß der schädlichen Wirkung, die das unmetabolisierte Öl auf den Verbraucher haben kann, für den menschlichen Verzehr ungeeignet machen.

Quellen für Öle pflanzlicher Herkunft umfassen Nüsse bzw. Früchte, Samen und Getreide. Erdnußöl, Sojaöl, Kokosnußöl und das überall erhältliche Olivenöl sind Beispiele für Nuß- bzw. Fruchtfleischöle. Samenöle umfassen Saffloröl, Baumwollsaatöl, Sonnenblumenöl, Sesamöl oder dergleichen. In der Getreideölgruppe ist das Maisöl das häufigste; das Öl von anderen Getreidearten wie Weizen, Hafer, Roggen, Reis, abessinisches Liebesgras (*Eragrostis abessinica*), Triticale oder dergleichen, kann ebenso verwendet werden.

Die Technologie zum Erhalt von Ölen pflanzlicher Herkunft ist weit entwickelt und wohlbekannt. Die Zusammensetzungen dieser und ähnlicher Öle können z. B. im Merck-Index und in der Literatur über Nahrungsmittel, Ernährung und die Lebensmitteltechnologie gefunden werden.

Die Fettsäureester des Glycerins und 1,2-Propandiols mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, die nicht in natürlichem Samenöl vorkommen, können ausgehend von den Nuß- und Samenölen durch Hydrolyse, Trennung und Veresterung der geeigneten Materialien hergestellt werden. Diese Produkte sind unter dem Namen NEOBEE® der PVO International Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boonton, NJ und von anderen Firmen im Handel erhältlich.

Bei den Adjuvantien und Impfstoffen dieser Erfindung können Öle aus beliebiger tierischer Quelle eingesetzt werden. Tierische Öle und Fette sind üblicherweise bei physiologischen Temperaturen Feststoffe, da sie als Triglyceride vorkommen und einen höheren Sättigungsgrad als Öle von Fischen oder Pflanzen aufweisen. Dennoch sind Fettsäuren aus tierischen Fetten durch teilweise oder vollständige Triglyceridverseifung, die die freien Fettsäuren ergibt, gewinnbar. Fette und Öle aus der Milch von Säugetieren sind metabolisierbar und können deshalb im Rahmen der Erfindung verwendet werden. Die Verfahren zur Trennung, Reinigung und Verseifung u. a. zum Erhalt reiner Öle aus tierischen Quellen benötigten Methoden sind im Fachgebiet allgemein bekannt.

Die meisten Fische enthalten metabolisierbare Öle, die auf leichte Weise erhalten werden können. Typische Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Öle sind Lebertran, Haileberöl und Walöl wie Walrat. Eine Anzahl von Ölen mit verzweigter Kette wird biochemisch in 5 Kohlenstoff-Isopreneinheiten hergestellt und wird im allgemeinen als Terpene bezeichnet. Haileberöl enthält ein verzweigtes, ungesättigtes Terpenoid, das als Squalen, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6-10,14,18,22-tetracosahexaen bezeichnet wird und hier besonders bevorzugt ist. Squalen, das gesättigte Analogon zu Squalen, ist ebenso ein besonders bevorzugtes Öl. Fischöle, einschließlich Squalen und Squalen, sind im Handel erhältlich oder können durch bekannte Methoden erhalten werden.

Der Ölbestandteil der Adjuvantien und Impfstoff-Formulierungen liegt in einer Menge von 0,5 bis 20 Vol.-%, vorzugsweise nicht mehr als 15%, insbesondere in einer Menge von 1 bis 12%, vor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von 1 bis 4% Öl. Der wäßrige Anteil der Adjuvans-Zusammensetzungen ist gepufferte Kochsalzlösung oder, in bevorzugten Ausführungsformen, pharmazeutisch reines Wasser. Weil die Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung vorgesehen sind, ist es bevorzugt, am Ende gepufferte Lösungen, die als Impfstoffe verwendet werden, herzustellen, so daß die Tonizität, d. h. Osmolalität, zur Vermeidung von Schwellungen nach der Verabreichung oder schneller Absorption der Zusammensetzung wegen differentieller Ionenkonzentrationen zwischen der Zusammensetzung und den physiologischen Flüssigkeiten, im wesentlichen dieselbe wie bei normalen physiologischen Flüssigkeiten ist. Ebenso ist es bevorzugt, zur Aufrechterhaltung eines mit normalen physiologischen Gegebenheiten verträglichen pH die Kochsalzlösung zu puffern. Ebenso kann es in bestimmten Fällen zur Sicherung der Stabilität bestimmter Bestandteile der Zusammensetzung, wie Glycopeptide, erforderlich sein, den pH auf einem bestimmten Wert zu halten.

Jeder physiologisch verträgliche Puffer kann hier verwendet werden, wobei Phosphatpuffer bevorzugt sind. Andere verträgliche Puffer wie Acetat, Tris, Bicarbonat, Carbonat oder dergleichen können anstelle von Phosphatpuffern verwendet werden. Der pH des wäßrigen Bestandteils liegt vorzugsweise zwischen 6,0 und 8,0.

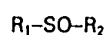
Wenn jedoch zunächst das Adjuvans hergestellt wird, wird reines Wasser als wäßriger Bestandteil der Emulsion bevorzugt. Die Steigerung der Salzkonzentration erschwert den Erhalt der gewünschten kleinen Tröpfchengröße. Wenn die endgültige Impfstoff-Formulierung aus dem Adjuvans hergestellt wird, kann zum Erhalt der gewünschten Impfstoffzusammensetzung das antigene Material in einem Puffer mit einer geeigneten Osmolalität zugegeben werden.

Die Menge des in der Zusammensetzung eingesetzten wäßrigen Bestandteils ist diejenige Menge, die zum Erhalt einer Einheits-Zusammensetzung erforderlich ist. Das bedeutet, daß eine Menge des wäßrigen Bestandteils zugemischt wird, der dazu ausreicht, mit den anderen o. g. Bestandteilen 100% zu ergeben, um die Zusammensetzungen auf Standard-Volumen zu bringen. In der pharmazeutischen Wissenschaft wird im allgemeinen eine beträchtliche Anzahl von Emulgatoren und Suspensiermitteln verwendet. Diese umfassen aus der Natur gewonnene Materialien wie Gummen von Bäumen, pflanzliche Proteine, Polymere auf Zuckerbasis, wie Alginate und Cellulose, oder dergleichen.

Bestimmte Oxypolymere oder Polymere, die eine Hydroxylgruppe oder einen anderen hydrophilen Substituenten an der Kohlenstoff-Hauptkette tragen, besitzen Oberflächenaktivität, z. B. Povidon, Polyvinylalkohol, und mono- und polyfunktionelle Verbindungen auf Glykoetherbasis. Verbindungen, die von langkettigen Fettsäuren abgeleitet sind, bilden eine dritte wichtige Gruppe von Emulgatoren in Suspensiermitteln, die in der Erfindung verwendet werden können. Jedes der vorgenannten Tenside sind verwendbar, soweit sie nicht-toxisch sind.

Spezielle Beispiele für geeignete Emulgatoren (auch als Detergentien oder Tenside bezeichnet), die gemäß der Erfindung verwendet werden können, sind:

1. wasserlösliche Seifen, z. B. Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Alkanolammoniumsalze der höheren Fettsäuren (C₁₀-C₂₂), insbesondere Natrium- und Kalium-Talg- und Kokosnußseifen.
2. anionische, synthetische Detergentien, die keine Seifen sind, z. B. wasserlöslichen Salze von organischen Schwefelsäure-Reaktionsprodukten, die in ihrer molekularen Struktur einen Alkylrest mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen und einen Rest aus der von Sulfonsäure- und Schwefelsäureesterresten gebildeten Gruppe aufweisen. Beispiele hierfür sind die Natrium- oder Kaliumalkylsulfate aus Talg oder Kokosnußöl, Natrium- oder Kaliumalkylbenzolsulfonate; Natriumalkylglycerylethersulfonate; Natriumkokosölfettsäure-monoglycerid-sulfonate und -sulfate; Natrium- oder Kaliumsalze von Schwefelsäureestern der Umsetzungsprodukte von einem Mol eines höheren Fettalkohols mit etwa 1 bis 6 mol Ethylenoxid, Natrium- oder Kaliumalkylphenol-ethylenoxidether-sulfonate mit 1 bis 10 Ethylenoxid-Einheiten pro Molekül, in denen die Alkylreste 8 bis 12 Kohlenstoffatome enthalten, Reaktionsprodukte von Fettsäuren, die mit Isethiosäure verestert und mit Natriumhydroxid neutralisiert sind, Natrium- oder Kaliumsalze von Fettsäureamiden eines Methyltaurids und Natrium- und Kaliumsalze von SO₃-sulfonierten C₁₀-C₂₄ α-Olefinen.
3. nichtionische synthetische Detergentien, hergestellt durch die Kondensation von Alkylenoxidgruppen mit einer organischen, hydrophoben Verbindung. Typische hydrophobe Gruppen umfassen Kondensationsprodukte von Propylenoxid, Propylenglykol, Alkylphenole, Kondensationsprodukte von Propylenoxid und Ethylendiamin, aliphatische Alkohole mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen und Fettsäureamide.
4. nichtionische Detergentien wie Aminoxide, Phosphinoxide und Sulfoxide, die semipolare Eigenschaften aufweisen. Besondere Beispiele für langkettige tertiäre Aminoxide umfassen Dimethyldodecylaminoxid und bis-(2-Hydroxyethyl)dodecylamin. Besondere Beispiele für Phosphinoxide sind in der US-PS 3,304,263, veröffentlicht am 14. Februar 1967, beschrieben und umfassen Dimethyldodecylphosphinoxid und Dimethyl-(2-hydroxydodecyl)phosphinoxid.
5. langkettige Sulfoxide, z. B. diejenigen, die der Formel



entsprechen, wobei R₁ und R₂ substituierte oder unsubstituierte Alkylreste darstellen, wobei der erste ca. 10 bis 28 Kohlenstoffatome enthält, wogegen R₂ 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält. Spezielle Beispiele für diese Sulfoxide umfassen Dodecyl-methyl-sulfoxid und 3-Hydroxytridecyl-methyl-sulfoxid.

6. ampholytische synthetische Detergentien wie Natrium-3-dodecylaminopropionat und Natrium-3-dodecylaminopropansulfonat.
7. zwitterionische synthetische Detergentien wie 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)propan-1-sulfonat und 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)-2-hydroxypropan-1-sulfonat.

Zusätzlich können sämtliche der folgenden Typen von Emulgatoren in einer Zusammensetzung der Erfindung verwendet werden:

(a) Seifen (d. h. Alkalisalze) von Fettsäuren, Harzsäuren und Tallöl; (b) Alkylarylsulfonate; (c) Alkylsulfate, einschließlich Tenside mit verzweigt-kettigen oder geradkettigen hydrophoben Gruppen als auch primären und sekundären Sulfatgruppen; (d) Sulfate und Sulfonate, die eine Brücke zwischen den hydrophoben und den hydrophilen Gruppen enthalten, wie die fettsäureacylierten

Methyltauride und die sulfierten Fettsäuremonoglyceride; (e) langkettige Säurerester des Polyethylenglykols, insbesondere die Tallölester; (f) Polyethylenglykolether von Alkylphenolen; (g) Polyethylenglykolether von langkettigen Alkoholen und Mercaptanen; (h) Fettsäure-diethanolamide; und (i) Blockcopolymere des Ethylenoxids und Propylenoxids. Weil Tenside auf mehr als eine Weise eingeteilt werden können, überlappen eine Anzahl von Klassen der Tenside, die in diesem Absatz aufgeführt sind, mit vorher beschriebenen Tensidklassen.

Es gibt eine Anzahl von Emulgatoren, die speziell für biologische Systeme entwickelt und häufig in diesen verwendet werden. Eine Anzahl von biologischen Detergentien (Tenside) ist z. B. der auf den Seiten 310–316 des 1987er Catalog of Biochemical and Organic Compounds der Sigma Chemical Company aufgeführt. Derartige Tenside sind in vier grundlegende Arten unterteilt: anionische, kationische, zwitterionische und nichtionische.

Beispiele für anionische Detergentien sind Alginsäure, Caprylsäure, Cholsäure, 1-Decansulfonsäure, Desoxycholsäure, 1-Dodecansulfonsäure, N-Lauroylsarcosin und Taurocholsäure.

Kationische Detergentien umfassen Dodecyltrimethylammoniumbromid, Benzalkoniumchlorid, Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid und 4-Picolindodecylsulfat. Beispiele für zwitterionische Detergentien schließen ein 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (im allgemeinen mit CHAPS abgekürzt), 3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat (häufig mit CHAPSO abgekürzt), N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat und Lyso- α -phosphatidylcholin. Beispiele für nichtionische Detergentien umfassen Decanoyl-N-methylglucamid, Diethylenglykolmonopentylether, n-Dodecyl- β -D-glucopyranosid, Ethylenoxid-Kondensate von Fettalkoholen (z. B. unter dem Handelsnamen Lubrol erhältlich), Polyoxyethylenether von Fettsäuren (insbesondere C₁₂-C₂₂-Fettsäuren), Polyoxyethylensorbitanfettsäureether (z. B. unter dem Namen Tween im Handel erhältlich) und Sorbitanfettsäureether (z. B. unter dem Namen Span im Handel erhältlich).

Eine besonders geeignete Gruppe von Tensiden sind die nichtionischen Tenside auf Sorbitanbasis. Diese Tenside werden durch Dehydratisierung von Sorbit zum 1,4-Sorbitan, das man dann mit einem oder mehr Äquivalenten einer Fettsäure reagieren läßt, hergestellt. Den Fettsäure-substituierten Rest kann man dann zum Erhalt einer zweiten Gruppe von Tensiden mit Ethylenoxid reagieren lassen.

Die Fettsäure-substituierten Tenside auf Sorbitanbasis werden durch Reaktion von 1,4-Sorbitan mit einer Fettsäure wie Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure oder einer ähnlichen langkettigen Fettsäure hergestellt; man erhält die 1,4-Sorbitanmonoester, 1,4-Sorbitansesquiester oder 1,4-Sorbitantriester. Die üblichen Bezeichnungen für diese Tenside sind z. B. Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonopalmitat, Sorbitanmonostearat, Sorbitanmonooleat, Sorbitansesquiöleat und Sorbitantrioleat. Diese Tenside sind im Handel erhältlich unter dem Namen SPAN[®] oder ARLACEL[®], üblicherweise mit einer Buchstaben- oder Zahlenkennzeichnung, die zwischen den verschiedenen Mono-, Di- und Triester-substituierten Sorbitanen unterscheiden.

Die Tenside SPAN[®] und ARLACEL[®] sind hydrophil und sind im allgemeinen in Öl löslich oder dispergierbar. Sie sind ebenso in den meisten organischen Lösemitteln löslich. In Wasser sind sie im allgemeinen unlöslich, aber dispergierbar. Im allgemeinen weisen diese Tenside einen HLB-Wert zwischen 1,8 und 8,6 auf. Derartige Tenside können leicht mit bekannten Methoden hergestellt werden oder sind im Handel erhältlich, z. B. von ICI America's Inc., Wilmington, DE, unter dem Warenzeichen ATLAS[®].

Eine verwandte Gruppe von Tensiden umfaßt Polyoxyethylensorbitanmonoester und Polyoxyethylensorbitantriester. Diese Substanzen werden durch Addition von Ethylenoxid an einen 1,4-Sorbitanmonoester oder -triester hergestellt. Die Addition von Polyoxyethylen verwandelt das lipophile Sorbitan-Mono- oder Triester-Tensid in ein hydrophiles Tensid, das im allgemeinen in Wasser löslich oder dispergierbar und in verschiedenem Maße in organischen Flüssigkeiten löslich ist.

Diese Substanzen, im Handel erhältlich unter dem Namen TWEEN[®], sind zur Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen und -Dispersionen oder für die Solubilisierung von Ölen verwendbar, weiterhin auch, um wasserfreie Salben wasserlöslich oder abwaschbar zu machen. Die TWEEN[®]-Tenside können zur Verbesserung der Emulsionsstabilität mit einem verwandten Sorbitanmonoester- oder -triester-Tensid kombiniert werden.

TWEEN[®]-Tenside haben im allgemeinen einen HLB-Wert zwischen 9,6 und 16,7. TWEEN[®]-Tenside sind im Handel erhältlich von einer Anzahl von Herstellern, z. B. ICI America's Inc., Wilmington, DE, unter dem Warenzeichen ATLAS[®].

Eine dritte Gruppe nichtionischer Tenside, die allein oder in Verbindung mit SPAN[®]-, ARLACEL[®]- und TWEEN[®]-Tensiden verwendet werden kann, sind die Polyoxyethylenfettsäuren, die durch die Umsetzung von Ethylenoxid mit einer langkettigen Fettsäure hergestellt werden. Das am häufigsten im Handel erhältliche Tensid dieser Art wird unter dem Namen MYRJ[®] vertrieben und ist ein Polyoxyethylen-Derivat der Stearinsäure. MYRJ[®]-Tenside sind hydrophil und wie TWEEN[®]-Tenside in Wasser löslich oder dispergierbar. Die MYRJ[®]-Tenside können zur Verwendung bei der Bildung von Emulsionen mit TWEEN[®]-Tensiden oder mit TWEEN[®]/SPAN[®] oder ARLACEL[®]-Tensidgemischen vermischt werden.

MYRJ[®]-Tenside können mit bekannten Methoden hergestellt werden oder sind im Handel von der ICI America's Inc. erhältlich.

Eine vierte Gruppe von nichtionischen Detergentien auf Polyoxyethylen-Basis sind die Polyoxyethylenfettsäureether, die von Lauryl-, Acetyl-, Stearyl- und Oleylalkohol abgeleitet sind. Diese Substanzen werden wie oben beschrieben durch die Addition von Ethylenoxid an einen Fettalkohol hergestellt. Der Handelsname für diese Tenside ist BRIJ[®]. BRIJ[®]-Tenside können abhängig von der Größe des Polyoxyethylenrests in dem Tensid hydrophil oder lipophil sein. Wenngleich die Herstellung dieser Verbindungen bekannt ist, sind sie ebenso im Handel erhältlich, z. B. von ICI America's Inc.

Andere nichtionische Tenside, die gegebenenfalls im Rahmen der Erfindung verwendet werden können, sind z. B.: Polyoxyethylen, Polyolfettsäureester, Polyoxyethylenether, Polyoxypropylenfettether, Bienenwachs-Derivate, enthaltend Polyoxyethylen, Polyoxyethylen-Lanolinesterivate, Polyoxyethylenfettglyceride, Glycerinfettsäureester oder andere Polyoxyethylen-Säure-Alkohol- oder -etherderivate von langkettigen Fettsäuren mit 12–22 Kohlenstoffatomen.

Daß die Adjuvans- und die Impfstoff-Formulierungen der Erfindung Mehrphasensysteme sind, wird bevorzugt, ein emulsionsbildendes nichtionisches Tensid auszuwählen, das einen HLB-Wert im Bereich von ca. 7–16 aufweist. Dieser Wert kann erhalten werden durch die Verwendung eines einzelnen nichtionischen Tensids, z. B. ein TWEEN[®]-Tensid, oder kann erreicht werden durch die Verwendung eines Gemisches von Tensiden, z. B. solchen mit einem Tensid auf der Basis von Sorbitanmono-, -di- oder -triester; Sorbitanester-Polyoxyethylen-Fettsäure, Sorbitanestern in Verbindung mit einem von Polyoxyethylenlanolin

abgeleiteten Tensid; ein Sorbitanester-Tensid in Verbindung mit einem Polyoxyethylenfettether-Tensid mit hohem HLB oder ein Polyoxyethylenfettether-Tensid oder eine Polyoxyethylensorbitanfettsäure.

Im Rahmen der Erfindung ist die Verwendung eines einzelnen nichtionischen Tensids als emulsionsstabilisierendes nichtionisches Tensid besonders bevorzugt, insbesondere die Verwendung eines TWEEN®-Tensids. Das Tensid mit der Bezeichnung TWEEN® 80, auch bekannt als Polysorbitat 80 für Polyoxyäthyl-20-Sorbitanmonooleat, ist das vorteilhafteste der o. g. Tenside.

Eine ausreichende Verkleinerung der Tröpfchengröße kann üblicherweise bewirkt werden, wenn das Tensid in einer Menge von 0,02 bis 2,5 Gew.-% vorliegt, vorzugsweise in einer Menge von 0,05 bis 1 %, und besonders bevorzugt in einer Menge von 0,01 bis 0,5%.

Die Art und Weise, wie die Tröpfchengröße der Erfindung erreicht wird, ist für die Praxis der vorliegenden Erfindung nicht wichtig. Eine Art, auf die Submikron-Öltröpfchen erhalten werden können, ist die Verwendung eines handelsüblichen Emulgierers, z. B. das Modell Nr. 110 Y, erhältlich bei Microfluidics, Newton, MA. Beispiele für andere handelsübliche Emulgierer umfassen das Gaulin-Modell 30 CD (Gaulin, Inc., Everett, MA) und den Rainnie Minlab-Typ 8.30 H (Niro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, WI). Diese Emulgierer arbeiten mit dem Prinzip der großen Scherkräfte, erzeugt durch Pressen der Flüssigkeiten durch kleine Öffnungen unter hohem Druck.

Wenn das Modell 110 Y bei 34,5–270 MPa (5000–30000 psi) arbeitet, werden Öltröpfchen mit Durchmessern von 100–750 nm erhalten.

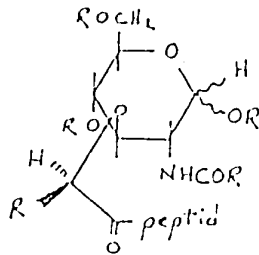
Die Größe der Öltröpfchen kann durch Wechseln des Verhältnisses zwischen Detergens und Öl (Steigern des Verhältnisses verkleinert die Tröpfchengröße), des Arbeitsdrucks (steigender Arbeitsdruck verringert die Tröpfchengröße), der Temperatur (steigende Temperatur verringert die Tröpfchengröße) und Zugabe eines amphipatischen Immunostimulans (Zugabe derartiger Agentien verringert die Tröpfchengröße) verändert werden. Die tatsächliche Tröpfchengröße ändert sich mit dem einzelnen Detergens, dem Öl und dem Immunostimulans (wenn vorhanden) sowie mit den im einzelnen ausgewählten Arbeitsbedingungen. Die Tröpfchengröße kann durch Verwendung von Größenbestimmungsinstrumenten, wie der im Handel erhältliche, von der Coulter Corporation hergestellte Sub-Mikron-Teilchen-Analysator (Modell N4MD), überprüft werden, und die Parameter können unter Verwendung der oben offenbarten Richtlinien verändert werden, bis im wesentlichen alle Tröpfchen einen Durchmesser < 1 Mikron, vorzugsweise < 0,8 Mikron, und insbesondere < 0,5 Mikron haben. Im wesentlichen alle bedeutet mindestens 80% (gemessen an der Zahl), vorzugsweise mindestens 90%, insbesondere mindestens 95% und am meisten bevorzugt mindestens 98%. Die Teilchengrößenverteilung ist typischerweise eine Gaussche Verteilung, so daß der mittlere Durchmesser kleiner als die angegebenen Grenzwerte ist.

Die vorliegende Erfindung wird ausgeführt, indem eine Ölemulsion in Abwesenheit anderer Komponenten, deren Verwendung in Submikronemulsionen für eine befriedigende Immunogenizität bereits im Stand der Technik gelehrt wird, nämlich Polyoxypropylen-Polyoxyäthyl-Blockcopolymeren, wie die zur Verwendung in Adjuvantien in den US-PS 4772466 und 4770874 und in EP 0315153A2 beschriebenen, hergestellt wird.

Eine Adjuvans-Zusammensetzung der Erfindung besteht im wesentlichen aus einem metabolisierbaren Öl in Wasser und einem von Polyoxypropylen-Polyoxyäthyl-Copolymeren (POP-POE-Copolymeren) verschiedenen Emulgator. Der Emulgator braucht keine besondere immunostimulierende Aktivität zu besitzen, weil die Ölzusammensetzung selbst als Adjuvans dienen kann, wenn die Öltröpfchen im Submikronbereich liegen. Indes kann eine geeignete immunostimulierende Aktivität durch Einschluß jeder der bekannten Immunostimulantien in die Zusammensetzung erreicht werden. Die Immunostimulantien können entweder getrennt von dem Emulgator und dem Öl sein, oder das Immunostimulans und der Emulgator können ein und dasselbe Molekül sein. Beispiele für die erstgenannte Situation umfassen mit getöteten Mykobakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und subzellulären Bestandteilen davon gemischte metabolisierbare Öle. Zusätzliche immunostimulierende Verbindungen umfassen die Muramylpeptide, die Bestandteile der Zellwände dieser Bakterien sind. Eine Anzahl von bevorzugten Muramylpeptiden wird unten aufgeführt. Beispiele für vereinte Emulgatoren/Immunostimulantien sind die lipophilen Muramylpeptide, die in den zwei oben zitierten Veröffentlichungen von Sanchez-Pescador et al. beschrieben wurden. Diese Verbindungen enthalten das basische N-Acetylmuramylpeptid (ein hydrophiler Rest), das als immunostimulierende Gruppe wirkt, enthalten jedoch ebenso einen lipophilen Rest, der der resultierenden Verbindung oberflächenaktive Eigenschaften verleiht. Derartige Verbindungen, ebenso andere Arten von amphipatischen immunostimulierenden Substanzen, wirken sowohl als Immunostimulantien als auch als Emulgatoren und werden in der Praxis der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Zusätzlich ist es ebenso möglich, die vorliegende Erfindung unter Verwendung einer amphipatischen immunostimulierenden Substanz in Verbindung mit einer zweiten immunostimulierenden Substanz, die nicht amphipatisch ist, auszuführen. Ein Beispiel ist die Verwendung eines lipophilen Muramylpeptids in Verbindung mit einem im wesentlichen unsubstituierten (d. h. im wesentlichen hydrophilen) Muramylpeptid.

Die bevorzugten, die Immunreaktion stimulierenden Muramylpeptide (oder genauer: Glycopeptide) der Erfindung sind eine Gruppe von Verbindungen, die verwandt sind mit und im allgemeinen abgeleitet sind von N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, das von Ellouz et al. (1974) *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 59 (4): 1317 als die kleinste wirksame Einheit, die eine immunologische Adjuvans-Wirksamkeit in *M. tuberculosis*, dem mykobakteriellen Bestandteil von Freund's vollständigem Adjuvans, aufweist, bestimmt wurde. Eine Anzahl von Dipeptid- und Polypeptid-substituierten Muraminsäurederivaten wurde nachfolgend ermittelt, und es wurde gefunden, daß sie immunostimulierende Aktivität besitzen.

Obwohl diese Glycopeptide eine Gruppe verschiedener Verbindungen darstellen, können sie im allgemeinen durch die folgende Formel I wiedergegeben werden:



(I)

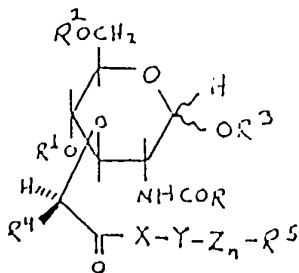
wobei die Sauerstoffatome des Pyranringes mit Wasserstoff, Alkyl, Acyl oder dergleichen substituiert sind oder durch Stickstoff enthaltende Substituenten ersetzt werden können, insbesondere der Sauerstoff in 6-Stellung; die 2-Aminogruppe eine Acylgruppe oder ein anderes Amid ist; die Lactylseitenkette modifiziert ist, d. h. ein Ethylrest oder ein anderer 2-Alkylrest ist, und die Peptidfunktion ein Dipeptid oder Polypeptid, das weiter derivatisiert sein kann, ist. Furanosylanaloge der Pyranosylverbindungen haben ebenso immunpotenzierende Aktivität und können bei der Erfindung verwendet werden. Unter den Glycopeptiden der Erfindung sind die mit Mesoalpha, epsilon-diaminopimelinsäure verbundenen Disaccharide und Tetrasaccharide, die in US-PS 4,235,771 und 4,186,194 beschrieben sind.

Die die Immunreaktion anregenden Glycopeptide, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden können, sind in US-PS 4,094,971, 4,101,536, 4,152,684, 4,235,771, 4,323,559, 4,327,085, 4,185,089, 4,082,736, 4,369,178, 4,314,998, 4,082,735 und 4,186,194 offenbart. Auf die in diesen Patentschriften beschriebenen Glycopeptide wird hier Bezug genommen. Sie stellen einen Teil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung dar. Die Verbindungen der japanischen Patentanmeldungen J54079-2227, J54079-228 und J541206-696 sind ebenso im Rahmen der Erfindung verwendbar.

Methoden zur Herstellung dieser Verbindungen sind bekannt.

Beispielhafte Darstellungen des Herstellungsverfahrens sind in den US-PS 4,082,736 und 4,082,735 enthalten. Zusätzlich sind ähnliche Herstellungsverfahren in den im vorhergehenden Absatz zitierten US-Patentschriften offenbart.

Bevorzugte Glycopeptide haben die Formel II



(II)

in der

R einen unsubstituierten oder substituierten Alkylrest, der 1 bis 22 Kohlenstoffatome enthält, oder einen unsubstituierten oder substituierten Arylrest, der 6 bis 10 Kohlenstoffatome enthält; R¹ und R², die gleich oder verschieden sind, Wasserstoff oder einen Acylrest, der 1 bis 22 Kohlenstoffatome enthält; R³ Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen oder Aryl mit 7 bis 10 Kohlenstoffatomen; R⁴ Wasserstoff oder Alkyl; n 0 oder 1; X und Z unabhängig voneinander Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, α-Aminobutyryl, Threonin, Methionin, Cysteinin, Glutamin, Glutaminsäure, Isoglutamin, Isoglutaminsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyrosin, Lysin, Ornithin, Arginin, Histidin, Asparagin, Prolin, Hydroxyprolin, Seryl oder Glycin; R⁵ eine gegebenenfalls veresterte oder amidierte Carboxylgruppe der terminalen Aminosäure und Y-NHCHR⁶CH₂CH₂CO-, wobei R⁶ eine gegebenenfalls veresterte oder amidierte Carboxylgruppe ist, bedeuten.

Alkyl bedeutet einen geradkettigen oder verzweigten Rest, der, wenn nicht anders vermerkt, 1 bis 7 Kohlenstoffatome aufweist, z. B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl oder Heptyl oder ein Isomeres derselben. Niedrigalkyl bedeutet einen Rest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen.

Eine gegebenenfalls veresterte oder amidierte Carboxylgruppe ist die Carboxylgruppe selbst oder eine Carboxylgruppe, die mit einem niederen Alkanol, wie Methanol, Ethanol, Propanol oder Butanol verestert ist, oder die Carbamoylgruppe, die an dem Stickstoffatom unsubstituiert oder mit Alkyl, insbesondere Niedrigalkyl, Aryl, vorzugsweise Phenyl, oder Arylalkyl, vorzugsweise Benzyl, mono-substituiert oder di-substituiert ist. Die Carbamoylgruppe kann ebenso mit einem Alkylidenrest wie dem Butylidenrest oder dem Pentylidenrest substituiert sein. Zusätzlich kann die Carbamoylgruppe R⁵ mit einer Carbamylmethylgruppe an dem Stickstoffatom substituiert sein.

Besonders bevorzugte Verbindungen sind solche gemäß Formel II, wobei R und R¹ gleich oder verschieden sein können und Wasserstoff oder ein Acylrest, der 1 bis 22 Kohlenstoffatome enthält, R² Methyl, R³ Wasserstoff, X L-Alanin, Y D-Isoglutaminsäure und n = 0 bedeuten.

Eine andere bevorzugte Gruppe von Glycopeptiden sind Verbindungen gemäß der Formel II, wobei R und R¹ Wasserstoff oder Acyl mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen, R² Methyl, R³ Wasserstoff, R⁴ Methyl oder Butyl und X L-Valin, L-Seryl, L-Alanin, L-Threonin oder L-α-Aminobutyryl bedeuten.

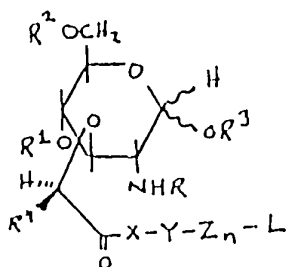
Spezielle Beispiele umfassen die folgenden Verbindungen:

N-Acetylmuramyl-L- α -aminobutyryl-D-isoglutamin;
 6-O-Stearoyl-N-acetylmuramyl-L- α -aminobutyryl-D-isoglutamin;
 N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin;
 N-Acetylmuramyl-L-valyl-D-isoglutamin;
 N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamin-n-butylester;
 N-Acetyl-desmethyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin;
 N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamin;
 N-Acetylmuramyl-L-seryl-D-isoglutamin;
 N-Acetyl(butylmuramyl)-L- α -aminobutyl-D-isoglutamin; und
 N-Acetyl(butylmuramyl)-L-alanyl-D-isoglutamin.

Eine wirksame Menge eines immunstimulierenden Glycopeptids ist die Menge, die bei Verabreichung in Verbindung mit einem Antigen eine Steigerung des Antikörpertiter-Spiegels über den Titer-Spiegel, der beobachtet wird, wenn das Glycopeptid nicht mit verabreicht worden ist (typischerweise im Bereich von 0,0001 bis 10% der Gesamtzusammensetzung), bewirkt. Man kann feststellen, daß jedes Glycopeptid einen Bereich der wirksamen Dosis haben kann, der von den anderen Glycopeptiden verschieden sein kann. Daher kann kein einheitlicher Dosis-Bereich angegeben werden, der genau für jedes mögliche Glycopeptid im Rahmen der Erfindung paßt. Dennoch liegt im allgemeinen das Glycopeptid in dem Impfstoff vorzugsweise in einer Menge zwischen 0,001 und 5% (w/v), insbesondere 0,01 bis 3% (w/v), vor.

Die meisten der oben diskutierten immunstimulierenden Glycopeptide sind im wesentlichen hydrophile Verbindungen. Demgemäß sind sie für den Einsatz mit einem getrennten Emulgator (der wie oben beschrieben ebenso ein Immunostimulans sein kann) vorgesehen. In einigen Fällen haben die oben beschriebenen Verbindungen einen lipophilen Charakter, z. B. die Verbindungen, die Fettsäuresubstituenten und/oder Arylsubstituenten an dem Zuckerrest enthalten, insbesondere diejenigen, die einen oder mehr Acylreste bei 14 bis 22 Kohlenstoffatomen enthalten, sind insbesondere die, die mehr als einen dieser Acylsubstituenten enthalten. Dennoch ist es durch Verbinden eines Lipidrestes mit der Carboxylgruppe oder Seitenketten des Peptidrestes auch möglich, bei einem Muramylpeptid lipophilen Charakter zu erreichen. Insbesondere stellen mit der terminalen Carboxylgruppe des Peptidrestes verbundene Lipidgruppen eine bevorzugte Gruppierung in den Verbindungen dar. Diese Verknüpfung kann leicht entweder direkt, wie durch Bildung einer Esterbindung zwischen dem terminalen Carboxylat und einem Fettalkohol mit 14 bis 22 Kohlenstoffatomen, oder durch Verwendung einer bifunktionellen brückenbildenden Gruppe, wie Ethanolamin, zur Verknüpfung des Carboxylats mit einem Lipid über entweder eine Ester- oder eine Amidbrücke erhalten werden. Insbesondere werden bei dieser Ausführungsform der Erfindung Phospholipide bevorzugt, weil die Phosphatgruppen leicht verknüpfbare funktionelle Gruppen sind. Phosphatidylethanolamin, eine leicht erhältliche, in der Natur vorkommende Verbindung, kann über eine Amidbindung leicht mit dem terminalen Carboxylat des Peptidrestes verbunden werden. Andere Lipide an der terminalen Carboxylgruppe umfassen Acylglycerine, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerin, Cardiolipin und Sphingomyelin.

Eine Anzahl von bevorzugten amphipatischen immunstimulierenden Peptiden haben die folgende Formel III:



(III)

in der R , R^1 - R^4 , X , Y , Z und n die oben genannte Bedeutung haben. L stellt einen Lipidrest dar, z. B. einen der oben beschriebenen.

Zusammenfassend gesagt, ergeben der Muraminsäurerest und der Peptidrest des Moleküls zusammen einen hydrophilen Rest. In dem Molekül ist auch ein lipophiler Rest vorhanden, wobei die Lipophilie im allgemeinen durch eine langkettige Kohlenwasserstoffgruppe, die typischerweise in Form einer Fettsäure vorliegt, erhalten wird. Die Fettsäure oder ein anderer kohlenwasserstoffhaltiger Rest kann an eine Hydroxylgruppe des Zuckers gebunden werden oder kann direkt, z. B. durch die Reaktion einer Fettsäure mit einer in dem Peptidrest vorhandenen freien Aminogruppe, oder über eine brückenbildende Gruppe, z. B. Hydroxyalkylamin, das über die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe des Peptids und einer funktionellen Gruppe in einem Lipid, z. B. einer Phosphatgruppe, eine Brücke bildet, mit dem Peptidteil des Moleküls verbunden werden. Phospholipidreste sind für die Verwendung bei der Bildung lipophiler Muramylpeptide besonders bevorzugt. Eine Gruppe von bevorzugten Verbindungen umfaßt Muramylpeptide und -tripeptide, die über einen Hydroxy alkylaminrest mit einem Phospholipidrest verbunden sind. Ein Beispiel und eine besonders bevorzugte Verbindung ist N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-(hydroxyphosphoryloxy)]ethylamid (abgekürzt MTP-PE). Die Adjuvans-Formulierungen werden im allgemeinen aus den oben beschriebenen Bestandteilen hergestellt, bevor das Adjuvans mit dem Antigen, das in dem Impfstoff verwendet werden soll, vereinigt wird. Das Wort „Antigen“ bezieht sich auf jede Substanz, einschließlich ein Protein oder Protein-Polysaccharid, ein Protein-Lipopolysaccharid, ein Polysaccharid, ein Lipopolysaccharid, Virus-Untereinheiten, vollständige Viren oder vollständige Bakterien, die, wenn sie dem Blutstrom eines Tieres fremd ist und in das Gewebe des Tieres Zugang findet, die Bildung spezifischer Antikörper stimuliert und in-vivo oder in-vitro spezifisch mit einem homologen Antikörper reagiert. Außerdem stimuliert es die Proliferation von T-Lymphocyten mit Rezeptoren für das Antigen und kann mit den Lymphocyten unter Einleitung der Reihe von Reaktionen reagieren, die als zellvermittelte Immunität bezeichnet wird.

Ein Hapten liegt im Bereich dieser Definition. Ein Hapten ist der Teil eines Antigenmoleküls oder Antigenkomplexes, der dessen immunologische Spezifität bestimmt. Üblicherweise ist ein Hapten ein Peptid oder Polysaccharid in natürlich vorkommenden Antigenen. In künstlichen Antigenen kann es eine niedermolekulare Substanz, z. B. ein Arsanilsäurederivat, sein. Ein Hapten reagiert in-vivo oder in-vitro spezifisch mit homologen Antikörpern oder T-Lymphocyten. Andere Bezeichnungen sind antigene Determinante, antigene strukturelle Gruppierung und Hapten-Gruppierung.

Die Formulierung eines Impfstoffs der Erfindung erfordert eine wirksame Menge eines Antigens. Das heißt, es wird eine Menge eines Antigens zugegeben, die in Kombination mit dem Adjuvans bewirkt, daß der Empfänger eine spezifische und ausreichende Immunreaktion entwickelt, die ihm Schutz vor der folgenden Exposition mit einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz, einem Mycoplasma oder einem Parasiten, gegen den oder das immunisiert wurde, verleiht.

Antigene können mit im Fachgebiet bekannten Methoden hergestellt oder im Handel bezogen werden. Zum Beispiel beschreiben die US-PS 4,434,157, 4,406,885, 4,264,587, 4,117,112, 4,034,081 und 3,996,907, auf die hier Bezug genommen wird, Verfahren zur Herstellung von Antigenen für Katzenleukämievirus-Impfstoffe. Andere Antigene können ähnlich hergestellt werden. Antigene im Rahmen der Erfindung umfassen ganze inaktivierte Virusteilchen, isolierte Virusproteine und Proteinuntereinheiten, ganze Zellen und Bakterien, Zellmembran- und Zellwandproteine, und dergleichen. Die Impfstoffe der Erfindung können zur Immunisierung von Vögeln und Säugetieren gegen Krankheiten und Infektionen, einschließlich, aber ohne Beschränkung auf, Cholera, Diphtherie, Wundstarrkrampf (Tetanus), Keuchhusten (Pertussis), Grippe (Influenza), Masern, Hirnhautentzündung (Meningitis), Mumps, Pest, spinale Kinderlähmung (Polomyelitis), Tollwut, amerikanisches Fleckfieber, Röteln, Blattern, Typhus, Fleckfieber (Flecktyphus), Katzenleukämievirus und Gelbfieber verwendet werden.

Es kann keine Einzeldosisbestimmung angeführt werden, die für jedes Antigen und alle Antigene eine bestimmte Anleitung ermöglicht, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden kann. Die wirksame Menge des Antigens hängt von seiner zugehörigen Wirksamkeit und Reinheit ab. Es kommt in Betracht, daß die Adjuvans-Zusammensetzungen der Erfindung zusammen mit Ganzzell- oder Virusimpfstoffen oder mit gereinigten Antigenen oder Proteinuntereinheiten oder Peptidimpfstoffen, die mit Techniken oder Synthesen mit rekombinanter DNA hergestellt wurden, verwendet werden. Weil die Adjuvans-Zusammensetzungen der Erfindung stabil sind, können das Antigen und die Emulsion durch einfaches Schütteln gemischt werden. Andere Techniken, wie das schnelle Pressen einer Mischung des Adjuvans und der Lösung oder Suspension des Antigens durch eine kleine Öffnung (z. B. eine Injektionsnadel), ergeben auf leichte Weise eine brauchbare Impfstoff-Zusammensetzung.

Ausführungsbeispiele

Nachdem die Erfindung jetzt allgemein beschrieben worden ist, wird sie im Zusammenhang mit den folgenden ausführlichen Beispielen, die der Erläuterung dienen und die, wenn nicht im einzelnen angegeben, die Erfindung nicht beschränken sollen, näher erläutert.

Beispiel 1

Allgemeine Methoden

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die folgenden allgemeinen Methoden überall in den folgenden Beispielen verwendet.

Materialien

MTP-PE wurde von CIBA-GEIGY (Basel, Schweiz) bezogen. Squalen und Tween 80 wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) bezogen. CFA und IFA wurden von Gibco (Grand Island, NY) erhalten. Aluminiumhydroxid (Rehsorptar) wurde von Reheis Chemical Co. (Berkeley Heights, NJ) bezogen.

Herstellung der Emulsionen

Verfahren 1 – Spritze und Nadel. Ein Gemisch von 4% Squalen, 0,008% Tween 80, 250 µg/ml MTP-PE und Antigen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wurde sechsmal durch eine 23 Gauge-Nadel gedrückt. Diese Emulsion besaß Tröpfchengrößen im Bereich von 10 Mikron und wird MTP-PE-LO genannt.

Verfahren 2 – Kirkland-Emulgierer. Das obige Gemisch wurde fünfmal durch einen Kirkland-Emulgierer gedrückt. Die Emulsion besteht im wesentlichen aus Öltröpfchen mit 1–2 Mikron und wird MTP-PE-LO-KE genannt. Der Kirkland-Emulgierer (Kirkland Products, Walnut Creek, CA) ist eine verkleinerte Version der handelsüblichen Messerschneide-Emulsionsmaschine (z. B. Gaulin Modell 30CD und Rainnie Minilab Typ 8,30H), die in der Arbeitskammer ungefähr 6,9 MPa (1000 Psi) erzeugt.

Verfahren 3 – Mikrofluidierer. Gemische, die 0,3–18% Squalen und 0,2–1,0 mg/ml MTP-PE mit oder ohne Tween 80 enthielten, wurden bei 34,5–207 MPa (5000–30000 psi) durch den Mikrofluidierer (Modell Nr. 110Y, Microfluidics Newton, MA) gedrückt. Typischerweise wurden 50 ml Emulsion 5 min oder 100 ml 10 min in dem Mikrofluidierer gemischt. Die erhaltenen Emulsionen bestanden, abhängig von der Squalen-, MTP-PE- und Detergentskonzentration, dem Arbeitsdruck des Mikrofluidierers und der Temperatur, aus Öltröpfchen mit 100–755 nm. Diese Formulierung wurde MTP-PE-LO-MF genannt.

Das Antigen wurde den o. g. Adjuvans-Formulierungen nach der Herstellung zugegeben. Das Antigen und die Emulsion wurden durch Schütteln gemischt. Bei Verwendung von CFA und IFA wurde das Antigen in PBS mit einem gleichen Volumen von entweder CFA oder IFA gemischt. Das Gemisch wurde emulgiert, indem es durch eine Injektionsnadel gedrückt wurde, bis eine dicke Emulsion erhalten wurde.

Antigene

Das Herpes Simplex-Virus (HSV) gD 2 stellt ein gentechnologisch mit Ovarialzellen des chinesischen Hamsters hergestelltes rekombinantes Protein dar. Bei diesem Protein ist die normale Ankerregion abgetrennt, was ein in ein Gewebekulturmedium ausgeschiedenes glycosyliertes Protein ergibt. Das gD2 wurde in dem CHO-Medium bis zu einer Reinheit von mehr als 90% gereinigt. Das menschliche Immundefekt-Virus (HIV)-env-2-3 ist eine rekombinante Form des HIV-Hüllproteins, die

gentechnologisch in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt wird. Dieses Protein stellt die vollständige Proteinregion von HIV gp 120 dar, ist aber nicht glycosyliert und denaturiert, wenn es von der Hefe gereinigt wird. HIV gp 120 stellt eine voll glycosylierte, ausgeschiedene Form von gp 120 dar, die in CHO-Zellen auf eine ähnliche Weise wie das o. g. gD2 gebildet wird.

Immunisierung von Tieren

Mäusen wurden die verschiedenen Adjuvans-Antigen-Formulierungen intraperitoneal, intramuskulär oder subkutan injiziert. Meerschweinchen wurden über die Pfote oder intramuskulär immunisiert. Kaninchen, Ziegen und Paviane wurden intramuskulär immunisiert.

Analyse der Immunreaktion

Antikörpertiter gegen das immunisierende Antigen wurden durch Enzym-Immunoassay (ELISA) bestimmt.

Beispiel 2

MTP-PE-LO-Formulierung bei großen Tieren (Vergleichsbeispiel)

Es wurden zuerst mit dem HIV-env-2-3-Antigen und danach mit dem HSV-gD-Protein eine Anzahl von Experimenten durchgeführt, in denen die MTP-PE-LO-Formulierung zur Stimulierung der Immunität in großen Tieren verwendet wurde. Diese Versuche werden unten dargestellt.

1. HIV env 2-3

a. Meerschweinchen

Meerschweinchen wurden monatlich entweder über die Pfote oder intramuskulär mit einer 50 µg/Dosis MTP-PE env 2-3 immunisiert. Der Impfstoff wurde entweder mit der MTP-PE-LO-Formulierung (4% Squalen, 0,008% Tween 80, 50 µg/Dosis MTP-PE) oder an Alum (0,7% Aluminiumhydroxid) adsorbiert verabreicht. Eine Woche nach jeder Immunisierung wurde Serum entnommen und mit ELISA auf Anti-env-2-3-Antikörper untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die MTP-PE-LO-Formulierung ergibt sowohl bei intramuskulärer Verabreichung als auch bei Verabreichung in die Pfote hohe Anti-env-2-3-Titer. Im Gegensatz dazu ergibt Alum auf beiden Wegen viel niedrigere Antikörper-Titer. Dieser Versuch veranschaulicht die Wirksamkeit der MTP-PE-LO-Formulierung bei Meerschweinchen.

Tabelle 1

Vergleich verschiedener Adjuvantien beim Erzeugen env 2-3-spezifischer Antikörper in Abhängigkeit vom Injektionsweg^a)

Adjuvans-gruppe	Tier #	Weg	Env 2-3 ELISA-Titer						
			Null	Zwei	Drei	Vier	Fünf	Sechs	Sieben
MTP-PE 4% Squalen 0,008 % Tween	839	FP	<< 100 ^c	135 500	382 100	343 100	401 800	338 000	282 700
	840	FP	<< 100	331 700	588 700	542 300	392 900	359 000	292 100
	841	FP	<< 100	247 800	330 900	301 100	285 800	334 400	383 700
	842	FP	<< 100	108 100	570 300	694 300	344 400	289 800	220 300
	843	FP	<< 100	65 000	- ^b	-	-	-	-
	844	FP	<< 100	25 000	-	-	-	-	-
	(Mittelwert)	(FP)	(<< 100)	(152 000)	(468 000)	(470 000)	(356 000)	(330 000)	(295 000)
MTP-PE 4% Squalen 0,008 % Tween	845	IM	<< 100	12 300	19 600	23 800	15 100	20 000	27 300
	846	IM	<< 100	10 400	20 500	43 600	44 600	121 100	42 000
	847	IM	<< 100	29 700	80 000	136 800	156 000	144 500	164 600
	848	IM	<< 100	447 000	640 000	400 000	71 000	674 000	533 000
	849	IM	350	10 600	78 700	311 000	533 000	nt	200 000
	850	IM	<< 100	340 000	-	-	-	-	-
	(Mittelwert)	(IM)	(<< 100)	(142 000)	(168 000)	(183 000)	(164 000)	(240 000)	(193 000)
Alum	863	FP	<< 100	<< 100	nt	nt	nt	nt	nt
	864	FP	<< 100	2 500	4 100	86 000	47 700	21 000	16 000
	865	FP	<< 100	2 400	26 400	80 400	83 500	39 200	4 500
	866	FP	<< 100	15 100	103 900	124 100	107 100	56 700	16 800
	867	FP	<< 100	2 200	8 800	14 500	11 900	11 400	12 300
	868	FP	<< 100	6 500	44 500	34 000	18 800	12 800	-
	(Mittelwert)	(EP)	(<< 100)	(5 700)	(38 000)	(68 000)	(54 000)	(28 000)	(12 000)
Alum	869	IM	<< 100	<< 100	300	2 600	2 000	1 600	2 300
	870	IM	<< 100	<< 100	130	220	330	270	300
	871	IM	<< 100	<< 100	1 200	4 300	4 900	3 000	1 600
	872	IM	<< 100	<< 100	300	900	920	770	1 700
	873	IM	<< 100	<< 100	990	41 100	79 800	27 900	15 500
	874	IM	<< 100	<< 100	940	17 300	13 200	10 600	8 600
	(Mittelwert)	(IM)	(<< 100)	(<< 100)	(640)	(11 000)	(17 000)	(7 000)	(5 000)

a. Meerschweinchen wurden entweder über den Weg durch die Pfote (FP) oder über den intramuskulären (IM) Weg monatlich mit 50 µg/Dosis env 2-3 plus den verschiedenen Adjuvantien immunisiert. Seren wurden eine Woche nach jeder Immunisierung entnommen.

b. „-“; wegen des Todes des Tiers keine Daten erhalten.

c. << 100; kein nachweisbares ELISA-Signal bei Serum-Verdünnung 1:100.

d. nt = nicht getestet.

b. Ziegen

Ziegenpaare erhielten mit der MTP-PE-LO-Formulierung, die verschiedene Mengen MTP-PE zwischen 0 und 500 µg enthielten, bei den ersten Immunisierungen 1 mg env 2-3 und bei den zweiten Immunisierungen 500 µg. Positive Kontrolltiere erhielten die erste Immunisierung mit CFA und die zweite Immunisierung mit IFA. Eine Gruppe erhielt auch mit der 100 µg MTP-PE enthaltenden MTP-PE-LO-Formulierung bei der ersten Immunisierung 100 µg env 2-3, gefolgt von 50 µg bei der zweiten Immunisierung. Beide Ziegen, die Freund's Adjuvans erhielten, ergaben, wie in Tabelle 2 gezeigt, hohe Antikörpertiter von 2700 bis 62800. Im Gegensatz dazu waren die meisten der Ziegen, die die MTP-PE-LO-Formulierung erhielten, negativ für Anti-env-2-3-Antikörper. Die Tiere, die reagierten, ergaben nur Titer im Bereich 100-600. Diese Ergebnisse stehen in starkem Gegensatz zu den obigen Daten für Meerschweinchen.

Tabelle 2

Antikörperreaktionen von mit env 2-3 und verschiedenen Dosen MTP-PE immunisierten Ziegen

Adjuvans Formulierung	Nummer des Tiers	Env 2-3 ELISA-Titer Immunisierung		
		Keine	Eine	Zwei
Freund's	2 295	<< 100 ^b	43 200	62 800
	2 296	<< 100	2 700	7 500
ST ^a + 0 µg	2 297	<< 100	< 100 ^c	< 100
MTP-PE	2 298	<< 100	100	300
ST + 20 µg	2 290	<< 100	< 100	< 100
MTP-PE	2 300	<< 100	100	200
ST + 50 µg	2 301	<< 100	<< 100	< 100
MTP-PE	2 302	<< 100	<< 100	< 100
ST + 100 µg	2 303	<< 100	<< 100	100
MTP-PE	2 304	<< 100	<< 100	< 100
ST + 250 µg	2 305	<< 100	< 100	600
MTP-PE	2 306	<< 100	<< 100	< 100
St + 500 µg	2 307	<< 100	< 100	< 100
MTP-PE	2 308	<< 100	<< 100	<< 100
ST + 100 µg	2 309	200	500	200
MTP-PE	2 310	<< 100	< 100	<< 100

a. ST ist die Formulierung mit wenig Öl; 4 % Squalen, 0,008 % Tween 80.

b. << 100 zeigt einen Env 2-3 ELISA-Titer an, der sich bei einer Serum-Verdünnung 1/100 nicht aus dem Rauschen abhebt.

c. < 100 zeigt einen Env 2-3 ELISA-Titer an, der sich bei einer Serum-Verdünnung 1/100 aus dem Rauschen abhebt, aber kleiner als das halbe maximale Signal der Analyse ist.

c. Hunde

Beagle-Hund wurden in Abständen von drei Wochen entweder mit 250 µg env-2-3 in MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE) oder mit der MTP-PE-LO-Formulierung allein immunisiert. Zehn Tage nach jeder Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und mit ELISA Anti-env-2-3-Antikörpertiter bestimmt. Tabelle 3 zeigt, daß die zwei Hunde, die env 2-3 und Adjuvans erhielten, Anti-env-2-3-Titer zeigten, aber diese Titer erreichten nicht die bei den Meerschweinchen beobachteten Höhen (maximale Titer 1700 und 6300 für die zwei immunisierten Tiere). Zusätzlich bildeten diese Tiere keine Virusneutralisierenden Antikörper gegen entweder die homologen (SF2) oder heterologen (BRU oder Zr6) HIV-Stämme.

Tabelle 3

ELISA- und neutralisierende Antikörper-Titer für Seren von mit env 2-3 in MTP-PE-LO-Adjuvans immunisierten Beagle-Hunden^a

Tier #	immunisiert mit	#	Immunisier- Titer	Env 2-3	Neutralisier-Titer	
				ELISA HIV-SF 2	HIV- BRU	HIV- Zr 6
1375	env 2-3 MTP-PE-LO	Vorprobe	<< 100 ^b	< 20 ^c	< 20	< 20
		2	1 300	< 20	< 20	< 20
	100 µg MTP-PE	3	1 700	< 20	< 20	< 20
		4	900	< 20	< 20	< 20
		5	400	< 20	< 20	< 20
		6	300	< 20	< 20	< 20
		7	300	< 20	< 20	< 20
1376	env 2-3 MTP-PE-LO	Vorprobe	<< 100	< 20	< 20	< 20
		2	3 500	< 20	< 20	< 20
	100 µg MTP-PE	3	6 300	< 20	< 20	< 20
		4	5 100	< 20	< 20	< 20
		5	2 100	< 20	< 20	< 20
		6	2 200	< 20	< 20	< 20
		7	2 000	< 20	< 20	< 20

Fortsetzung zu Tabelle 3

Tier #	immunisiert mit	#	Immunisier-Titer	Env 2-3	Neutralisier-Titer	
				ELISA HIV-SF 2	HIV-BRU	HIV-Zr 6
1377	MTP-LO	Vorprobe	<<100	<20	<20	<20
	O-MTP-PE	2	<<100	<20	<20	<20
	Kontrolle	3	<<100	<20	<20	<20
		4	<<100	<20	<20	<20
		5	<<100	<20	<20	<20
		6	<<100	<20	<20	<20
		7	<<100	<20	<20	<20
1378	MTP-PE-LO	Vorprobe	<<100	<20	<20	<20
	O-MTP-PE	2	<<100	<20	<20	<20
	Kontrolle	3	<<100	<20	<20	<20
		4	<<100	<20	<20	<20
		5	<<100	<20	<20	<20
		6	<<100	<20	<20	<20
		7	<<100	<20	<20	<20

a. Die Hunde erhielten alle 21 Tage intramuskulär 250 µg env 2-3 in Biocin-Adjuvans (100 µg MTP-PE). 10 Tage nach jeder Injektion wurden Blutproben entnommen.

b. Es wurden ELISA-Titer <<100 angegeben, wenn bei Serum-Verdünnung 1/100 kein Signal nachgewiesen wurde.

c. Neutralisier-Titer <20 zeigen an, daß bei der Serum-Verdünnung mit der höchsten getesteten Konzentration (1/20) keine Neutralisierung beobachtet wurde.

d. Schweine

Schweine wurden alle 21 Tage mit 1 mg env 2-3 plus MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE) immunisiert. Kontrolltiere erhielten das Adjuvans allein. Zehn Tage nach jeder Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und mit ELISA Anti-env-2-3-Antikörpertiter bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, daß die zwei immunisierten Tiere nur geringe Anti-env-2 Titer (140 bzw. 100) entwickelten und keine nachweisbaren Virus-neutralisierenden Titer gegen entweder den homologen Stamm (SF 2) oder die heterologen Stämme (BRU oder Zr 6) entwickelten.

Tabelle 4

ELISA- und neutralisierende Antikörper-Titer von mit env 2-3 in MTP-PE-LO-Adjuvans immunisierten Schweinen^a

Nummer des Tieres	Antigen	Imunisie-rungs-nummer	env 2-3	Neutralisier-Titer bei:		
			ELISA-Titer	HIV-SF 2	HIV-BRU	HIV-Zr 6
1371	env 2-3	Vorprobe	<< 50 ^b	< 20 ^d	< 20	< 20
		2	< 50 ^c	< 20	< 20	< 20
		3	70	< 20	< 20	< 20
		4	70	< 20	< 20	< 20
		5	80	< 20	< 20	< 20
		6	70	< 20	< 20	< 20
		7	140	< 20	< 20	< 20
1372	env 2-3	Vorprobe	<< 50	< 20	< 20	< 20
		2	100	< 20	< 20	< 20
		3	70	< 20	< 20	< 20
		4	70	< 20	< 20	< 20
		5	60	< 20	< 20	< 20
		6	90	< 20	< 20	< 20
		7	90	< 20	< 20	< 20
1373	Adjuvans-Kontrolle	Vorprobe	<< 50	< 20	< 20	< 20
		2	<< 50	< 20	< 20	< 20
		3	<< 50	< 20	< 20	< 20
		4	<< 50	< 20	< 20	< 20
		5	<< 50	< 20	< 20	< 20
		6	<< 50	< 20	< 20	< 20
		7	<< 50	< 20	< 20	< 20
1374	Adjuvans-Kontrolle	Vorprobe	<< 50	< 20	< 20	< 20
		2	<< 50	< 20	< 20	< 20
		3	<< 50	< 20	< 20	< 20
		4	<< 50	< 20	< 20	< 20
		5	<< 50	< 20	< 20	< 20
		6	<< 50	< 20	< 20	< 20
		7	<< 50	< 20	< 20	< 20

a. Die Schweine erhielten alle 21 Tage intramuskulär 1 mg env 2-3 in Biocin-Adjuvans (100 µg MTP-PE). 10 Tage nach jeder Immunisierung wurden Seren entnommen.

b. Lag bei Serum-Verdünnung 1/50 kein Signal vor, wurden Titer << 50 angegeben.

c. Kleines, aber nachweisbares Signal bei Serum-Verdünnung 1/50.

d. Keine Neutralisierung bei Serum-Verdünnung 1/20, der höchsten getesteten Konzentration, gesehen.

e. Affen

Rhesusaffen wurden alle 20 Tage mit 250 µg env 2-3 plus MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE) immunisiert. Kontrolltiere erhielten die Adjuvans-Formulierung allein. Eine Woche nach jeder Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und mit ELISA Anti-env-2-3-Antikörpertiter ermittelt. Tabelle 5 zeigt, daß, ähnlich wie bei den Hunden, alle Tiere Antikörpertiter zu env 2-3 entwickelten, aber diese Titer nur im Bereich 300-3100 lagen, d. h. wesentlich niedriger als vorher bei den Meerschweinchen beobachtet wurden.

Tabelle 5

Titer von env 2-3 spezifischen Antikörpern in Seren von Rhesus Macaques, immunisiert mit env 2-3 in MTP-PE-LO Adjuvans^a

Tierisches Antigen	Nummer	Vorprobe	Immunisierung					
			1	2	3	4	5	6
Env 2-3	1 189	<< 100	<< 100	300	700	400	400	300
1 190	<< 100	<< 100	1 200	800	800	900	500	
1 191	<< 100	<< 100	500	2 000	1 300	1 900	3 100	
1 192	<< 100	<< 100	1 100	900	400	400	500	
(Mittelwert)	<< 100	<< 100	780	1 100	700	900	1 100	
Adjuvans-Kontrolle	1 197	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100
1 198	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	
1 199	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	
1 978	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	
(Mittelwert)	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	<< 100	

a. Die Tiere erhielten intramuskulär alle 30 Tage 250 µg des Antigens in einem Biocin-Adjuvans (100 µg MTP-PE). Die Seren wurden eine Woche nach jeder Immunisierung entnommen.

2. HSV gD

a. Ziegen

Eine Reihe von Adjuvans-Formulierungen wurden mit gD2 in Ziegen getestet. Die Tiere wurden alle 21 Tage mit 100 µg gD2 und den verschiedenen Adjuvantien immunisiert. Den Tieren wurden 10 Tage nach der zweiten und dritten Immunisierung Blut entnommen und mit ELISA wurden die anti-gD2-Titer bestimmt. Es wurden die folgenden Adjuvans-Formulierungen verwendet: CFA (1°) gefolgt von IFA (2° & 3°), wobei IFA 100 µg MTP-PE enthielt, 0,8 mg/ml Aluminiumhydroxid (Alum), MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE), MTP-PE-LO-KE (100 µg MTP-PE) und MTP-PE-LO-KE (12% Squalen, 5,0 mg MTP-PE). Die ELISA-Ergebnisse gibt Tabelle 6 wieder. Ein CFA/IFA-Tier, beide MTP-PE/IFA-Tiere und ein MTP-PE-LO-KE (5 mg MTP-PE)-Tier entwickelten hohe Antikörpertiter (2187-13172). Ein CFA/IFA-Tier, beide Alum-Tiere und ein MTP-PE-LO-KE (5 mg MTP-PE)-Tier entwickelten mäßige Antikörpertiter (569-1489). Die MTP-PE-LO-Tiere und die MTP-PE-LO-KE-Tiere entwickelten niedrige anti-gD2-Titer (46-323). Daher löste die MTP-PE-LO-Formulierung, wie bereits bei env 2 bemerkt, in Ziegen keine hohen Antikörpertiter aus. Abwandeln der Emulsion durch Verwendung des Kirkland-Emulgierers (Öltröpfchengröße 1-2 nm) verbesserte die Adjuvans-Wirksamkeit nicht. Beträchtliche Steigerung des MTP-PE-Dosis (auf 5,0 mg) schienen die Adjuvans-Wirksamkeit zu verbessern.

Tabelle 6

Adjuvans-Wirksamkeit mit gD2 bei den Ziegen

Gruppe	Tier	Adjuvans	ELISA-Titer nach	
			2 Immunisierungen	3 Immunisierungen
1	3 606	CFA/IFA	2 187	13 172
	3 609		738	770
2	3 610	Alum	1 489	781
	3 611		921	522
3	3 612	MTP-PE-LO (100 µg MTP-PE)	77	194
	3 613		145	323
4	3 614	MTP-PE-LO-KE (100 µg MTP-PE)	123	227
	3 615		56	46
5	3 624	MTP-PE-LO-KE (12% Squalen, 5,0 mg MTP-PE)	142	569
	3 625		615	2 291

b. Paviane

Junge Paviane wurden mit gD2, das mit Alum, MTP-PE-LO-KE, MTP/IFA und IFA allein formuliert wurde, immunisiert. Zusätzlich wurde eine Dosisbereich-Untersuchung für gD2, kombiniert mit Alum und MTP-PE-LO-KE, durchgeführt. 2–3 Jahre alte Paviane (3,4 bis 12 kg) wurden intramuskulär dreimal in Intervallen von 3 Wochen über den Schenkel immunisiert. Die Seren wurden 3 Wochen nach den ersten zwei Immunisierungen und zwei Wochen nach der letzten Impfstoffdosis zur Bestimmung von gD-spezifischen Antikörpern mit ELISA entnommen. Für vollständige Blutzellenanalysen (CBS) wurde zu jedem dieser Zeitpunkte Vollblut entnommen. Paviane, die mit 100 µg an Alum gebundenes gD2 immunisiert wurden, entwickelten mittlere Anti-gD2-Antikörpertiter von 3349 ± 550. In den Titern für die 3 getesteten Antigendosen 10, 25 und 100 µg Protein gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Antikörperreaktionen in 4 Tiergruppen, die 10 oder 100 µg gD2, emulgiert mit 250 µg MTP-PE-LO-KE, oder 25 µg gD2, emulgiert mit 50 µg oder 1000 µg MTP-PE-LO-KE, erhielten, ähnelten denen der Gruppen, die mit gD2/Alum (Mittelwert im Bereich 1300 bis 3900) immunisiert oder mit 25 µg gD2 und 250 µg MTP-PE-LO-KE geimpft wurden. In diesem Versuch wurde mit IFA emulgiertes MTP-PE als positive Kontrollgruppe verwendet. Die mit Alum immunisierten Tiere besaßen Titer, die 1 % der Werte mit MTP/IFA-Impfstoffen betragen, und die MTP-PE-LO-KE-immunisierten Tiere besaßen Titer im Bereich 0,5 bis 1,3 der von MTP/IFA. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

HSV-Impfstoff-Versuch bei Pavianen: Antikörpertiter^a

Gruppe	Adjuvans Zusammensetzung (µg)	gD 2		Erste Blut- entnahme	ELISA-Titer ^b		
		Dosis (µ)	Dosis (µ)		Zweite Blut- entnahme	Dritte Blut- entnahme	MTP-PE/IFA ^c in %
1	Alum	400	10	287 (±123)	1002 (±366)	1566 (±350)	0,6
2	Alum	400	25	1075 (±785)	800 (±343)	1993 (±1156)	0,8
3	Alum	400	100	720 (±184)	1882 (±489)	3349 (±550)	1,3
4	MTP-PE/LO	50	25	140 (±63)	788 (±331)	1320 (±430)	0,5
5	MTP-PE/LO	250	10	217 (±103)	2490 (±995)	3244 (±1582)	1,3
6	MTP-PE/LO	250	100	57 (±34)	925 (±254)	2439 (±510)	1,0
7	MTP-PE/LO	1000	25	91 (±70)	1097 (±565)	3883 (±2401)	1,6
8	MTP-PE/IFA	250	25	24101 (±5423)	62775 (±28634)	250382 (±64771)	100
9	IFA		25	2591 (±2280)	7631 (±6563)	66132 (±75095)	26,4

a. Alle Tiere mit gD2 durch IM-Verabreichung in den Schenkel immunisiert, 4 Tiere/Gruppe.

b. 50% Endpunkt-Antikörpertiter, geometrisches Mittel ± SE (Standardabweichung).

c. Anteil der Tiere mit einer positiven gD2-spezifischen, lymphoproliferativen Antwort, definiert als ein Anregungsindex > 3,0.

Bei keinem der Tiere wurden Reaktionen gegen die Impfstoffe bemerkt; CBC-Profile waren normal.

Beispiel 3

MT-PE-LO-Formulierung, wirksam bei der Stimulierung der Immunität bei großen Tieren.

Wie im Beispiel 2 gezeigt, ergaben MTP-PE-LO-Formulierungen, die mit Spritze und Nadel (Tröpfchengröße ca. 10 Mikron) und dem Kirkland-Emulgierer (Tröpfchengröße 1–2 Mikron) hergestellt wurden, keine gute Immunstimulierung für Impfstoff-Antigene in großen Tieren und Menschen (Daten für Menschen nicht gezeigt). Der Mikrofluidierer Modell 110Y wurde zur Erzeugung stabiler Emulsionen mit kleiner Tröpfchengröße verwendet.

Diese Maschine ist ein Hochdruck (34,5–207 mPa [5000–30000 PSI])-Emulgierer vom Tauchdüsen-Typ. Es wurde eine Reihe von Emulsionen hergestellt, die abhängig von den Squalen-, Tween 80- und MTP-PE-Konzentrationen und den physikalischen Parametern Temperatur und Arbeitsdruck in Größe und Stabilität variierten. Tabelle 8 zeigt Beispiele für verschiedene Emulsionen, die mit dem Mikrofluidierer hergestellt wurden. Durch Ändern der physikalischen Parameter der Emulsionszusammensetzung können Öl-Tröpfchengrößen von 1 Mikron bis weniger als 0,2 Mikron erreicht werden. Wie in Tabelle 8 gezeigt, wird die Tröpfchengröße der Emulsion durch die Parameter der gesteigerten Detergenzmenge, des gesteigerten Verhältnisses von MTP-PE zu Squalen, des gesteigerten Arbeitsdrucks und der gesteigerten Arbeitstemperatur verringert. Diese Emulsionen mit kleiner Tröpfchengröße wurden dann als Adjuvantien für Impfstoff-Antigene bei Ziegen und Pavianen getestet.

Tabelle 8

Zusammensetzung und physikalische Parameter von MTP-PE-Squalen-Emulsionen, hergestellt mit dem Microfluidierer.

Formulierung	MTP-PE (mg/ml)	Squalen %	Tween 80 %	Mannit %	Wäßrige Phase	Temp. (°C)	Druck (KPSI)	Größe (µ)
A	,01	2	,004	0	H ₂ O	40	5	,23
B	0,2	2	,004	0	H ₂ O	40	5	,17
C	1,0	2	0,16	5	H ₂ O	0	10	,19
D	0,5	2	0	5	H ₂ O	40	10	,16
E	0,5	2	0	0	H ₂ O	40	10	,17
F	1,0	4	0	0	H ₂ O	30	10	,19
G	1,0	4	0	0	H ₂ O	20	10	,20
H	1,0	4	0	0	H ₂ O	0	15	,20
I	1,0	4	0	0	H ₂ O	0	10	,29
J	1,0	4	0	0	H ₂ O	0	5	,39
K	1,0	4	,16	0	H ₂ O	0	10	,22
L	1,0	4	,016	0	H ₂ O	0	10	,27
M	1,0	6	0	0	H ₂ O	0	10	,29

1. HSV gD2 bei Ziegen

Der erste mit dem gD2-Antigen verwendete Microfluidierer war eine Emulsion mit 4% Squalen und 100 µg/ml MTP-PE ohne Tween 80 (MTP-PE-LO-MF # 13; Nummernbezeichnung der MTP-PE-LO-MF-Formulierungen sind willkürlich und sind nur zur Verwendung als Bezugsnummern gedacht). Dieses Material wurde bei geringem Druck in dem Microfluidierer hergestellt und besaß eine Öltröpfchengröße von ungefähr 0,8 Mikron. Die Ziegen wurden dreimal in Abständen von 21 Tagen intramuskulär mit 100 µg gD2 in dieser Formulierung immunisiert. Ziegen, die in CFA für erste und IFA für zweite und dritte Immunisierungen mit 100 µg gD2 immunisiert wurden, dienten als Kontrolle. 10 Tage nach der zweiten und dritten Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und mit ELISA anti-gD2-Antikörpertiter bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 9. Beide Tiere, die die MTP-PE-LO-MF erhielten, zeigten bedeutende anti-gD2-Titer. Diese Titer 1661–2966 lagen zwischen den Titern der zwei CFA/IFA-Kontrollziegen (140–24269). Die MTP-PE-LO-MF-Tiere zeigten Titer, die bedeutend höher als bei Ziegen, die in Spritze und Nadel oder in dem Kirkland-Emulgierer (siehe Tabelle 6) hergestellte MTP-PE-LO-Formulierungen enthielten, waren. In einem zweiten Versuch bei Ziegen wurden alle 21 Tage 100 µg gD2 mit MTP-PE-LO-MF # 16 verabreicht. Diese Formulierung enthielt 4% Squalen, 500 µg/ml MTP-PE und kein Tween 80. Die Öltröpfchengröße dieser Emulsion betrug 0,5–0,6 Mikron. Wie man aus Tabelle 10 ersieht, scheint diese Formulierung sogar höhere Antikörpertiter als die vorherige Formulierung zu ergeben. Daher verbessert die Verringerung der Öltröpfchengröße und/oder die Steigerung der MTP-PE-Menge die Adjuvans-Wirksamkeit dieser Emulsion.

Tabelle 9

Gruppe	Nummer des Tieres	Adjuvans	Antigen	ELISA-Titer nach:	
				2 Immunisierungen	3 Immunisierungen
1	4519	CFA/IFA	gD2 (100 µg)	9868	24269
	4520	CFA/IFA	gD2	140	980
2	4598	MTP-PE-LO-MF ^a	gD2 (100 µg)	2966	2207
	4599	MTP-PE-LO-MF ^a	gD2 (100 µg)	1661	N.T. ^b

a. 4% Squalen, 100 µg MTP-PE, 0 Tween 80, H₂O, ungefähre Öltröpfchengröße 0,8 Mikron.

b. N. T. – Nicht getestet. Tiere starben aus Gründen, die nicht mit der Immunisierung zusammenhängen.

Tabelle 10

Test von MTP-PE-LO-MF # 16 als ein Adjuvans für gD2 in Ziegen

Nummer des Tieres	Adjuvans	Antigen	ELISA Titer nach:	
			2 Immunisierungen	3 Immunisierungen
5013	MTP-PE-LO-MF # 16	gD2 (100 µg)	1299	386
5014	MTP-PE-LO-MF # 16	gD2 (100 µg)	6657	2806
5015	MTP-PE-LO-MF # 16	gD2 (100 µg)	8206	1943
5016	MTP-PE-LO-MF # 16	gD2 (100 µg)	7886	1514

a. MTP-PE-LO-MF # 16 – 4% Squalen, 500 µg/ml MTP-PE, 0 Tween 80, H₂O. Öltröpfchengröße von 0,5–0,6 Mikron.

2. HIV env 2-3 und gp 120 bei Ziegen.

Es wurden Mikrofluidierer-Zubereitungen mit CFA/IFA und MTP-PE-LO-KE als Adjuvantien unter Verwendung des HIV-Antigens env 2-3 und gp 120 verglichen. Die Tiere wurden dreimal in Abständen von 21 Tagen mit 100 µg des gp 120-Antigens in GFA(1°)/IFA(2° & 3°), MTP-PE-LO-MF # 14 (4% Squalen, 500 µml MTP-PE, kein Tween, phosphatgepufferte Kochsalzlösung) MTP-PE-LO-KE (4% Squalen, 100 µg MTP-PE, 0,008% Tween 80, phosphatgepufferte Kochsalzlösung emulgiert in dem Kirkland-Emulgierer) und MTP-PE-LO-MF # 15 (4% Squalen, 100 µg MTP-PE, 0,008% Tween 80, phosphatgepufferte Kochsalzlösung) immunisiert. Die Tiere wurden auch mit 100 µg des HIV-Antigens env 2-3 in CFA/IFA und in MTP-PE-LO-MF # 14 immunisiert. Den Tieren wurden 10 Tage nach der zweiten und dritten Immunisierung Blutproben entnommen und mit ELISA anti-env 2-3-Antikörpertiter ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 11. Bei env 2-3 zeigten die mit den MTP-PE-LO-MF # 14-Formulierung immunisierten Tiere nach zwei Immunisierungen den CFA/IFA-Tieren äquivalente Titer und nach drei Immunisierungen höhere Titer als die CFA/IFA-Tiere. Mit gp 120 waren die Ergebnisse nicht ganz so klar. Die MTP-PE-LO-MF # 14-Tiere zeigten wesentlich mehr Schwankungen als die CFA/IFA-Tiere. Daher sind die mittleren Titer der Mikrofluidierer-Gruppe niedriger als die der CFA-Gruppe, aber einzelne Tiere, die MTP-PE-LO-MF # 14 erhielten, zeigten Titer, die so hoch wie bei jedem Tier der CFA/IFA-Gruppe waren. Ein direkter Vergleich für gp 120 zwischen gleichen Adjuvans-Komponenten (4% Squalen, 100 µg MTP-PE, 0,008% Tween 80, phosphatgepufferte Kochsalzlösung), die mit zwei verschiedenen Verfahren (Kirkland-Emulgierer gegen Mikrofluidierer) emulgiert wurden, veranschaulicht die Wichtigkeit kleiner Tröpfchengrößen in der Emulsion. Die Kirkland-Emulgierer-Gruppe zeigte ein mittleren Titer von 632 nach den Immunisierungen, während die Mikrofluidierer-Gruppe einen mittleren Titer von 3277 zeigte.

Tabelle 11

Test von MTP-PE-LO-MF als ein Adjuvans mit den HIV-Antigens env 2 und gp 120

Gruppe	Nummer des Tieres	Adjuvans	Antigen	2 Immuni-sierungen	ELISA Titer nach:		Geometrischer Mittelwert ±SE
					Geometrischer Mittelwert ±SE	3 Immuni-sierungen	
1	5018	CFA/IFA	gp 120 (100 µg)	900		7300	
	5019	CFA/IFA	gp 120 (100 µg)	3700	1861 ± 539	5700	6630 ± 996
	5020	CFA/IFA	gp 120 (100 µg)	2000		7100	
2	5021	CFA/IFA	gp 120 (100 µg)	1800		3400	
	5022	CFA/IFA	env 2 (100 µg)	2400	2235 ± 680	3000	5074 ± 1378
	5023	CFA/IFA	env 2 (100 µg)	4600		3400	
3	5024	CFA/IFA	env 2 (100 µg)	2400		8900	
	5026	MTP-PE-LO-MF # 14 ^a	gp 120 (100 µg)	0		800	
	5028	MTP-PE-LO-MF # 14 ^a	gp 120 (100 µg)	300	101 ± 1089	500	1324 ± 994
4	5029	MTP-PE-LO-MF # 14 ^a	gp 120 (100 µg)	3407		5800	
	5030	MTP-PE-LO-MF # 14	env 2 (100 µg)	7900		19500	
	5031	MTP-PE-LO-MF # 14	env 2 (100 µg)	4600	2351 ± 1688	6600	9896 ± 2493
5	5032	MTP-PE-LO-MF # 14	env 2 (100 µg)	300		6900	
	5033	MTP-PE-LO-MF # 14	env 2 (100 µg)	2800		10800	
	5034	MTP-PE-LO-KE ^b	gp 120 (100 µg)	0		600	
6	5035	MTP-PE-LO-KE ^b	gp 120 (100 µg)	1400	721 ± 416	600	632 ± 32
	5037	MTP-PE-LO-KE ^b	gp 120 (100 µg)	400		700	
	5038	MTP-PE-LO-MF # 15 ^c	gp 120 (100 µg)	1000		5100	
	5040	MTP-PE-LO-MF # 15 ^c	gp 120 (100 µg)	0	10 ± 333	2300	3277 ± 767
	5041	MTP-PE-LO-MF # 15 ^c	gp 120 (100 µg)	0		3000	

a. MTP-PE-LO-MF # 14 - 4% Squalen, 500 µg/ml MTP, 0 Tween, phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

b. MTP-PE-LO-KE - 4% Squalen, 100 µg/ml MTP-PE, 0,0008% Tween 80, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, emulgiert in dem Kirkland-Emulgierer.

c. MTP-PE-LO-MF # 15 - 4% Squalen, 100100 µml MTP-PE, 0,008% Tween 80, phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

3. HIV env 2-3 und gp 120 bei Pavianen.

MTP-PE-LO-MF # 1 (2% Squalen, 500 µg/ml MTP-PE, kein Tween 80, H₂O, Öltröpfchengröße ca. 0,17 mikron) wurde mit den HIV-Antigenen env 2-3 und gp 120 bei Pavianen als Adjuvans getestet. MTP-PE in IFA und Alum wurden als Kontrolle verwendet. Die Tiere wurden in Abständen von einem Monat immunisiert. 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und es wurden anti-env 2-3-Antikörper-Virus neutralisierende Titer bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 12. Antikörpertiter gegen gp 120 waren mit MTP-PE-LO-MF # 1 höher als mit MTP-PE-IFA. Die anti-env 2-3-Titer waren in MTP-PE-IFA- und MTP-PE-LO-MF # 1-Gruppen ähnlich. Mit Alum erhaltene anti-gp 120-Titer lagen in demselben Bereich wie bei MTP-PE-LO-MF # 1, aber mit Alum erhaltene anti-env 2-3-Titer schienen größer als bei MTP-PE-Adjuvantien zu sein.

Tabelle 12

Test von MTP-PE-LO-MF # 1 als ein Adjuvans für die HIV-Proteine env2 und gp 120 in Pavianen

Gruppe	Nummer des Tieres	Adjuvans	Antigen	Virus ELISA-Titer nach 2 Immunisierungen	Titer zur Neutralisierung von Antikörpern
1	2947	MTP/IFA	gp 120 (55 µg)	< 100	< 10
	2948	(350 µg MTP-PE)	gp 120 (55 µg)	< 100	< 10
	2949	(350 µg MTP-PE)	gp 120 (55 µg)	3 000	< 10
2	2550	MTP-PE/IFA	env 2 (25 µg)	400	< 10
	2451	(250 µg MTP-PE)	env 2 (25 µg)	34 500	30
	2952	(250 µg MTP-PE)	env 2 (25 µg)	142 300	200
3	2953	MTP-PE-LO-MF # 1 ^a	gp 120 (55 µg)	51 000	200
	2954	MTP-PE-LO-MF # 1 ^a	gp 120 (55 µg)	43 000	35
	2595	MTP-PE-LO-MF # 1 ^a	gp 120 (55 µg)	800	50
4	2956	MTP-PE-LO-MF # 1 ^a	env 2 (25 µg)	600	< 10
	2957	MTP-PE-LO-MF # 1	env 2 (25 µg)	14 400	35
	2958	MTP-PE-LO-MF # 1	env 2 (25 µg)	87 400	> 250
5	2964	Alum ^b	gp 120 (55 µg)	56 600	150
	2965	Alum ^b	gp 120 (55 µg)	100	< 10
6	2966	Alum	env 2 (25 µg)	4 900	80
	2967	Alum	env 2 (25 µg)	700	< 10

a. MTP-PE-LO-MF # 1 – 2% Squalen, 500 µg/ml MTP-PE, 0 Tween 80, H₂O. Öltröpfchengröße ca. 0,17 Mikron.

b. Alum-Antigen gebunden an 0,8 mg/ml Aluminiumhydroxid.

Beispiel 5

Zusätzliche Adjuvans/Antigen-Formulierungen

Zusätzlich zu den oben dargestellten ausführlichen Beispielen wurde in Impfstoff-Formulierungen eine Anzahl anderer Antigene hergestellt, die Adjuvans-Zusammensetzungen der Erfindung enthielten. Diese umfassen sowohl Antigene von Pathogenen, die für Grippe und Malaria verantwortlich sind, als auch andere mit HIV und HSV assoziierte Antigene als die in den vorherigen Beispielen beschriebenen. Antigene des Cytomegalie-Virus (CMV) und des Hepatitis-C-Virus (HCV) werden ebenfalls beschrieben, da diese Antigene in den gleichen Adjuvans-Formulierungen, die für die anderen genannten Antigene beschrieben wurden, verwendet werden können.

Antigene

Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete Grippeantigene sind im Handel erhältlich. In den folgenden Beispielen verwendete Antigene sind Fluogen®, hergestellt von Parke-Davis; Duphar, hergestellt von Duphar B.V.; und der Grippeimpfstoff Charge A41, hergestellt von dem Instituto Vaccinogeno Pozzi.

Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete Malariaantigene sind in der US-Patentanmeldung Nr. 336288, eingereicht am 11. April 1989, und in der US-PS 4826957, herausgegeben am 2. Mai 1989, beschrieben.

Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete zusätzliche HIV-Antigene sind in der US-Patentanmeldung Nr. 490858, eingereicht am 9. März 1990, beschrieben. Siehe auch die EP-A 181 150 (14. Mai 1986) für zusätzliche HIV-Antigene. Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete zusätzliche HSV-Antigene sind in PCT WO85/04587, herausgegeben am 24. Oktober 1985, und in PCT WO88/02634, herausgegeben am 21. April 1988, beschrieben. Gemische von gB- und gD-Antigenen, die gestutzte Oberflächenantigene, denen die Ankerregionen fehlen, darstellen, sind besonders bevorzugt.

Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete Cytomegalie-Virus-Antigene sind in US-PS 4689225, herausgegeben am 25. August 1987, und in PCT/US89/00323, herausgegeben am 10. August 1989 unter der internationalen Veröffentlichungsnummer WO 89/07143, beschrieben. Siehe auch US-Patentanmeldung Nr. 367363, eingereicht am 16. Juni 1989.

Für die Verwendung bei der Impfstoffherstellung geeignete Hepatitis-C-Antigene sind in PCT/US 88/04125, in der veröffentlichten EP-A 318216 (31. Mai 1989), in der veröffentlichten JP-A 1-500565 (eingereicht 18. November 1988) und in der CA-Patentanmeldung Nr. 0583561 beschrieben. Ein anderer Satz von HCV-Antigenen ist in EP-A 90302866.0, eingereicht am 16. März 1990, beschrieben. Siehe auch US-Patentanmeldung Nr. 456637, eingereicht am 21. Dezember 1989, und PCT/US 90/01348.

Es wird angemerkt, daß sowohl die veröffentlichten Fassungen der verschiedenen oben aufgeführten unveröffentlichten Anmeldungen als auch eine Liste der entsprechenden Anmeldungen in anderen Ländern von einem Indexdienst wie dem World Patent Index erhalten werden können.

Adjuvans-Formulierungen und Herstellungsverfahren

Die folgenden Zusammenfassungen beschreiben sowohl Adjuvans-Formulierungen und wie sie hergestellt werden, als auch Impfstoff-Zusammensetzungen, die unter Verwendung der Adjuvantien und verschiedener antigenen Substanzen hergestellt werden. In einigen Fällen werden Zusammenfassungen von Impfstudien vorgestellt, aber ohne die Ausführlichkeit der obigen Beispiele, weil die oben dargestellten Impfstudien bereits eine ausreichende Anleitung für die Verwendung der Impfstoff-Zusammensetzungen erbringen.

Grippe

In einer Reihe von Versuchen wurden Hamster mit einem handelsüblichen Grippeimpfstoff des Instituto Vaccinogeno Pozzi immunisiert. Dieser Impfstoff enthält gereinigtes HA aus zwei A-Stämmen (A/Leningrad/360/86 und A/Singapur/6/86) und einem B-Stamm (B/Ann Arbor/1/86). Der Impfstoff wurde allein, mit einer mit einem Kirkland-Emulgierer (Fluoromed Pharmaceutical, Inc., La Mesa, CA) hergestellten MTP-PE/LO-Emulsion und mit einer in einem Mikrofluidierer (Modell 110Y, Microfluidics, Newton, MA) hergestellten MTP-PE/MF-Emulsion getestet. Die ersten zwei sind Vergleichszusammensetzungen, während die „MF“-Zusammensetzung eine Zusammensetzung der Erfindung darstellt. MTP-PE/MF steht für „MTP-PE-Mikrofluidierer“-Emulsion und enthält 4% Squalen und 1,0 mg/ml MTP-PE, emulgiert mit dem Mikrofluidierer. Die MTP-PE-Kirkland-Emulsion enthält 4% Squalen, 0,5 mg/ml MTP-PE und 0,008% Tween 80, emulgiert mit dem Kirkland-Emulgierer. Die Tiere erhielten drei Immunisierungen, die 8,3 µg von jedem HA-Antigen enthielten. MTP-PE wurde in beiden Formulierungen mit 50 µg pro Dosis verwendet. Nach jeder Immunisierung wurden die ELISA-Titer gegen die immunisierenden Antigene und nach der zweiten Immunisierung die HAI-Titer bestimmt. Die ELISA-Titer wurden durch beide getestete Adjuvans-Formulierungen wesentlich gesteigert.

In anderen Versuchen wurden Hamster entweder mit dem im Handel erhältlichen Parke-Davis-Fluogen-Impfstoff (HA A/Shanghai/11/87, A/Taiwan/1/86 und B/Yamagata/16/88) oder mit dem im Handel erhältlichen Duphar-Grippeimpfstoff (HA A/Sechuan/2/87, A/Singapur/6/86 und B/Beijing/1/87), allein oder mit der MF69-Adjuvans-Formulierung (MF69 ist 5% Squalen, 0,2% Tween 80, 0,8% Span 85 und 400 µg/ml MTP-PE, emulgiert in dem Mikrofluidierer) immunisiert. Es wurden gleiche Volumen des Impfstoffs mit MF69-Adjuvans vermischt. Die Tiere erhielten in Abständen von 3 Wochen drei Immunisierungen mit 11,25 µg des Parke-Davis-Impfstoffs oder 7,5 µg des Duphar-Impfstoffs. Tiere, die das MF69-Adjuvans erhielten, bekamen 50 µg-Dosen MTP-PE. Die Tiere, die Duphar und MF69 erhielten, zeigten nach einer und zwei Immunisierungen wesentlich höhere Anti-HA-Titer als bei Duphar allein (mittlere Titer nach einer Immunisierung 80mal höher als bei dem Impfstoff allein und nach zwei Immunisierungen 170mal höher). Das MF69-Adjuvans zeigte eine gute Stimulierung einer Immunantwort auf den Parke-Davis-Impfstoff und erzeugte nach einer, zwei bzw. drei Immunisierungen mittlere Titer von 2951, 14927 bzw. 12878. Dies stellt 82-, 29- bzw. 10mal höhere Titer als bei dem Impfstoff allein nach einer, zwei bzw. drei Immunisierungen dar. Bei beiden Impfstoffen wurden maximale Antikörpertiter mit MF69 nach zwei Immunisierungen beobachtet.

In weiteren Versuchen wurde bei Ziegen die Immunogenität zweier im Handel erhältlicher Impfstoffe, Parke-Davis-Fluogen und Duphar-Untereinheit-Grippe, ohne Adjuvans mit verschiedenen MTP-PE enthaltenden Adjuvans-Formulierungen verglichen. Die Tiere wurden intramuskulär mit 0,5 ml jedes Impfstoffs gemischt mit entweder 0,5 ml PBS oder 0,5 ml der MTP-PE-Adjuvans-Formulierungen immunisiert. Es wurden drei Adjuvans-Formulierungen verglichen: 200 µg MTP-PE, gelöst in PBS und 200 µg MTP-PE in zwei verschiedenen mikrofluidisierten Emulsionen, bezeichnet als Gaulin-1/4- und MF40/4-Emulsion. Gaulin-1/4 besteht aus 1,6% Squalen und 400 µg/ml MTP-PE, emulgiert in dem Gaulin-Homogenisierer (APV Gaulin, Everett, MA). MTP-PE/MF-40/4 besteht aus 1,6% Squalen, 400 µg/ml MTP-PE, 0,154% Tween 85 und 0,166% Span 85, emulgiert in dem Mikrofluidierer (Modell 110Y, Microfluidics, Newton, MA). Die Tiere erhielten 0,5 ml Impfstoff, der zum Erhalt eines Injektionsvolumens von 1,0 ml entweder mit 0,5 ml PBS oder 0,5 ml der angegebenen Adjuvans-Formulierung vermischt wurde. Wie bei den Hamstern zeigten die Ziegen, die die Grippeimpfstoffe zusammen mit den Adjuvans-Emulsionen erhielten, viel höhere Antikörpertiter als diejenigen Ziegen, die den Impfstoff allein erhielten. Das ist zu einem frühen Zeitpunkt des Immunisierungsplans besonders ausgeprägt. Nach einer Immunisierung erzeugte die Gaulin-1/4-Emulsion mehr als 30mal höhere Anti-HA-Titer als der Parke-Davis-Impfstoff allein. Die MTP-PE/MF-40-Emulsion erzeugte Anti-HA-Titer, die mehr als 130mal höher als bei dem Parke-Davis-Impfstoff allein und mehr als 60mal höher als bei dem Duphar-Impfstoff allein waren. MTP-PE in PBS zeigte nach einer Immunisierung keine Stimulierung eines Antikörpertiters. Nach zwei Immunisierungen wurden mit den Emulsionen ähnliche Steigerungen der Antikörpertiter beobachtet. Die mit den Adjuvans-Emulsionen beobachtete frühe Stimulierung von Anti-HA-Titern ist besonders signifikant, weil Grippeimpfstoffe im allgemeinen Erwachsenen als Ein-Dosis-Impfstoffe und Kindern als Zwei-Dosis-Impfstoffe gegeben werden. So zeigten die MTP-PE-Emulsionen wie bei Hamstern große Steigerungen der Immunantwort auf Grippeimpfstoffe.

In einem anderen Versuch wurde der Duphar-Impfstoff allein verglichen mit dem Duphar-Impfstoff zusammen mit der Adjuvans-Formulierung MF69. Der Parke-Davis-Impfstoff wurde allein und mit MF101, MF69, MF68 + MTP-PE sowie mit dem in dem Gaulin-Homogenisierer (Mikrofluidierer) hergestellten Ribi-Adjuvans-System verglichen. MF101 besteht aus 1,6% Squalen und 400 µg/ml MTP-PE, emulgiert in dem Mikrofluidierer. MF68 besteht aus 5% Squalen, 0,8% Span 85 und 0,2% Tween 80, emulgiert in dem Mikrofluidierer. MF68 + MTP-PE besteht aus MF68, dem nach der Emulgierung 400 µg/ml MTP-PE zugegeben wurden. Ribi-MF enthält 2% Squalen, 0,4% Tween 20, 250 µg/ml Monophosphoryllipid A, 250 µg/ml Trehalosedimycolat und 250 µg/ml Zellwand-Skelett (Ribi Immunochem, Hamilton, Montana), emulgiert in dem Gaulin-Homogenisierer. Alle Adjuvantien wurden in einer Dosis von 0,5 ml pro Injektion mit den gleichen Volumina Impfstoff (Antigen) verwendet. MF69 steigerte den ELISA-Titer des Duphar-Impfstoffs wesentlich. Ebenso steigerten alle getesteten Adjuvantien die sowohl mit dem ELISA-Titer als auch mit dem Hämagglutinations-Titer gemessene Immunogenität des Parke-Davis-Impfstoffs wesentlich.

In einem weiteren Versuch wurden MF69- und MF59-Formulierungen (die sich nur in dem Tween 80:Span 85-Verhältnis unterscheiden; siehe obige Beschreibungen) als Adjuvantien für den Parke-Davis-Grippeimpfstoff in Ziegen verglichen. Die Tiere wurden einmal mit der Hälfte einer menschlichen Impfstoffdosis (7,5 µg jeder der drei HA-Bestandteile), kombiniert mit den Adjuvans-Formulierungen, immunisiert. MTP-PE wurde in den Formulierungen in einer Dosis von 100 µg verwendet. Wie erwartet ergaben sich zwei Formulierungen sehr ähnliche Titer, wobei die MF59 einen mittleren Titer von 926 und die MF69 einen mittleren Titer von 821 zeigten.

Malaria

Es wurde eine Impfstudie, bei der MF59 (oben beschrieben) als Adjuvans verwendet wurde, begonnen. Es wurde ein Gemisch der im Handel erhältlichen Antigene der sporoziten, merozoiten und erythrozytären Stadien der Krankheit verwendet: Falc. 2.3-Zirkumsporozoit-Antigen, HP 195-Merozoit-Antigen und SERA 1-Blutrot-Stadium-Antigen. Impfstoff-Zusammensetzungen werden wie oben beschrieben hergestellt, nämlich durch Vermischen gleicher Volumina des vorher hergestellten MF59-Adjuvans und der Antigen-Zusammensetzung.

HIV

Es wurde ein Immunisierungsversuch zum Vergleich der Herstellung neutralisierender Antikörper durch eine Anzahl verschiedener gp120-Antigene durchgeführt. Einzelheiten der Herstellung der Antigene sind in der US-Patentanmeldung Nr. 490858, eingereicht am 9. März 1990, dargestellt. Ein Antigen war ein in Hefe hergestelltes gp120-Analogon (env 2-3), das denaturiert und nicht-glycosyliert ist. Ein anderes Antigen war glycosyliertes gp120, das seine natürliche Konfiguration behielt. Beide gp120-Materialien wurden aus derselben Genquelle, HIV-1-SF-2-Isolat, erhalten. Es wurde die Antikörperproduktion bei Pavianen gemessen. Anfangsstudien, bei denen Öl enthaltende Adjuvantien mit Partikelgrößen größer als 1 Mikron verwendet wurden, ergaben Titer, die kleiner als die bei der Verwendung üblicher Alum-Adjuvantien erhaltenen waren. Dagegen ergaben spätere Studien mit Submikronpartikel-Adjuvantien Antikörpertiter, die mindestens 10mal höher als mit Alum waren. Die Ausgangs-Submikron-Zusammensetzung enthielt 2% Squalen und 0,5 mg/ml MTP-PE in Wasser und wies Öltröpfchen mit einem mittleren Durchmesser von ungefähr 0,17 Mikron auf. Impfstoff-Zusammensetzungen für Paviane, bei denen MF59 (oben beschrieben) oder MF58 (MF59, bei dem aber MTP-PE exogen zugegeben wurde) als Adjuvans verwendet wurde, haben sich ebenfalls wirksamer als die verwendete Ausgangs-Submikron-Zusammensetzung bei der Stimulierung der Antikörperproduktion erwiesen. MF59 wurde in einer 1:2-Verdünnung mit einer Menge von 0,1 mg MTP-PE verwendet.

Herpes Simplex-Virus

Zusätzlich zu den oben beschriebenen gD2-Versuchen wurden Versuche durchgeführt, bei denen MF59 und verschiedene Mengen MTP-PE und Antigenen verwendet wurden. Befriedigende Antikörpertiter wurden bei Verwendung von 0,003 bis 0,250 mg gD2 mit MF59-Adjuvans und 0,05 mg MTP-PE für Meerschweinchen (intramuskuläre Verabreichung) und bei Verwendung von 0,01 bis 0,1 mg gD2 mit MF59 und 0,1 mg MTP-PE erhalten.

Cytomegalie-Virus

Impfstoff-Formulierungen können durch Vermischen von 0,001 bis 0,25 mg CMV-Antigenen in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 0,5 ml MF59-Adjuvans, das 0,050 mg MTP-PE enthält, hergestellt werden. MF69, MF101 und andere Submikronpartikel-Adjuvantien können auf dieselbe Weise verwendet werden.

Hepatitis-C-Virus

Impfstoff-Formulierungen können durch Vermischen von 0,001 bis 0,25 mg HCV-Antigenen in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 0,5 ml MF59-Adjuvans, das 0,05 mg MTP-PE enthält, hergestellt werden. MF69, MF101 und andere Submikronpartikel-Adjuvantien können auf dieselbe Weise verwendet werden. Obwohl die vorliegende Erfindung zum Zweck der Klarheit des Verständnisses im Zuge der Veranschaulichung und mit Verwendungszwecken in einigen Einzelheiten beschrieben wurde, wird dem Durchschnittsfachmann im Licht der Lehre der Erfindung verständlich werden, daß daran geeignete Änderungen und Modifizierungen vorgenommen werden können, ohne den Inhalt oder den Umfang der beigefügten Ansprüche zu verlassen.