



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 429 T2** 2007.09.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 009 430 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 429.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/05714**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 950 005.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/012565**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/39 (2006.01)**

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9718901 05.09.1997 GB

(73) Patentinhaber:
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, BE

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

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

(72) Erfinder:
GARCON, Nathalie, Rue de l'Institut 89, 1330 Rixensart, BE; MOMIN, Marie, Patricia, Rue de l'Institut 89, 1330 Rixensart, BE

(54) Bezeichnung: **Impfstoffe gegen Hepatitis B die Öl in Wasser Emulsionen enthalten**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Öl-in-Wasser-Emulsionszusammensetzungen, ihre Verwendung in der Medizin, insbesondere ihre Verwendung zur Steigerung der Immunreaktionen gegen Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen, und Verfahren zu ihrer Herstellung; die Öl-in-Wasser-Emulsionen umfassen ein metabolisierbares Öl, ein Sponin und ein Sterin.

[0002] Die Induktion cytotoxischer T-Zell (CTL)-Antworten tritt natürlicherweise während der Infektion einer Zielzelle auf oder bei den unkontrollierten Synthese eines Tumorantigens, wobei die enzymatische Degradierung des Zielantigens im Cytoplasma der Zelle stattfindet. Dieses Phänomen ermöglicht cytoplasmischen Peptiden, die von einem Pathogen stammen, oder von einem tumorspezifischen Antigen, den Th1 (endogenen Antigenprozessierungs-)Weg zu betreten, und auf der Oberfläche der Zelle in Assoziierung mit einem MHC-Klasse-I-Molekül präsentiert zu werden. Wenn ein Impfstoffantigen nicht in das Cytoplasma der Wirtszelle eindringt, dann kann es von der Zelle aufgenommen werden, und den exogenen Antigenprozessierungsweg beschreiten und schließlich auf der Oberfläche von Zellen in Assoziierung mit einem MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert werden. Die alternative Route führt im allgemeinen zu T-Helfer-Reaktionen und Antigen-spezifischen Antikörper-Reaktionen.

[0003] Nach einer konventionellen Impfung mit einer Untereinheit oder nichtlebenden Impfstoffen, betritt das Antigen im allgemeinen nicht das Cytoplasma einer Wirtszelle und daher wird es den endogenen Antigenprozessierungsweg nicht betreten und schließlich keine CTL-Antwort induzieren. Die CTL-Induktion korreliert vermutlich mit Th-1-Cytokinprofil-Antworten, spezifisch mit der Sekretion von IFN- γ und IL-2. Die IFN- γ -Sekretion wird mit schützenden Reaktionen gegen intrazelluläre Pathogene, einschließlich Parasiten, Bakterien und Viren, in Verbindung gebracht. Die Aktivierung von Leukocyten durch IFN- γ verstärkt das Abtöten intrazellulärer Pathogene und erhöht die Expression von Fc-Rezeptoren. Direkte Cytotoxizität kann ebenfalls auftreten, insbesondere in Synergie mit Lymphotoxin (ein weiteres Produkt von TH1-Zellen). IFN- γ ist ebenfalls sowohl ein Induktor und ein Produkt von NK-Zellen, welche die intrinsischen Hauptschutzeffektoren sind. TH1-artige Reaktionen, entweder durch IFN- γ oder anderen Mechanismen, wie vorzugsweise Hilfe für Maus-IgG2a, und menschliches IgG1, Immunglobulin-Isotypen.

[0004] Die internationale Patentanmeldung Nr. WO 95/17210 offenbart ein Adjuvans-Emulsionsystem, basierend auf Squalin, α -Tocopherol und Polyoxyethylensorbitanmonooleat (TWEEN 80), gegebenenfalls formuliert mit den Immunstimulantien QS21 und/oder 3D-MPL. Diese Adjuvansformulierung ist ein potenter Induktor eines breiten Spektrums an Immunreaktionen.

[0005] Diese Öl-in-Wasser-Emulsionen, sind potente Induktoren Th1-artiger Immunreaktionen, wenn sie mit 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A (3D-MPL) und QS21 formuliert werden. Daher stimuliert dieses System, wenn es mit einem Antigen assoziiert ist, vorzugsweise den Subisotypen von IgG, der mit Th1-Reaktion assoziiert ist (z.B. Maus-IgG2a und Menschen-IgG1) und wird signifikante Niveaus der IFN- γ -Produktion und der Antigen-spezifischen CTL-Reaktionen induzieren. Die Beobachtung, dass basische Öl-in-Wasser/QS21/3D-MPL-Formulierungen starke CTL-Reaktionen induzieren können, ist signifikant, da diese Reaktionen in einigen Tiermodellen gezeigt haben, dass sie gegen Erkrankungen einen Schutz auslösen.

[0006] Immunologisch aktive Saponinfraktionen (z.B. Quil A) mit Adjuvansaktivität, die aus der Rinde des südamerikanischen Baums Quillaja Saponaria Molina stammen, sind im Stand der Technik bekannt. Derivate von Quil A, z.B. QS21 (eine HPLC-gereinigte Fraktion, die von Quil A stammt) und das Verfahren zu dessen Herstellung ist im US-Patent Nr. 5,057,540 offenbart. Neben QS21 (bekannt als QA21) sind auch andere Fraktionen, wie QA17 offenbart. Die Verwendung solcher Saponine in isolierter Form wird vom Nachteil begleitet, dass lokale Necrose, d.h. lokalisierter Gewebstod, an der Injektionsstelle auftritt, und dadurch zu Schmerzen führt.

[0007] 3 De-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist ein gut bekanntes Adjuvans, dass von Ribi Immunochem, Montana hergestellt wird. Chemisch wird es häufig als Gemisch aus 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A entweder mit 4, 5 oder 6 acylierten Ketten geliefert. Es kann durch die Verfahren, die in GB 2122204 B erklärt werden, hergestellt werden. Eine bevorzugte Form von 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A ist in Form einer Emulsion mit kleiner Partikelgröße von weniger als 0,2 μ m Durchmesser, und dessen Herstellungsverfahren ist offenbart im europäischen Patent Nr. EP 0 671 948 B1.

[0008] Damit eine Öl-in-Wasser-Zusammensetzung für die Verabreichung an den Menschen geeignet ist, muss die Öl-Phase des Emulsionssystems ein metabolisierbares Öl umfassen. Squalen (2,6,10,15,19,23-He-

xamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaen) ist ein ungesättigtes Öl, welches in großen Mengen in Haileberöl gefunden wird und in geringeren Mengen in Olivenöl, in Weizenkeimöl, Reiskeimöl und Hefe und ist das Öl zur Verwendung in der Erfindung. Squalen in ein metabolisierbares Öl aufgrund der Tatsache, dass es ein Zwischenprodukt der Biosynthese von Cholesterin ist (Merck-Index, 10. Ausgabe, Eintrag Nr. 8619).

[0009] Öl-in-Wasser-Emulsionen sind per se im Fachgebiet bekannt und es wurde vorgeschlagen, dass sie als Adjuvanzusammensetzungen nützlich sind (EP 0399843).

[0010] Die Öl-in-Wasser-Emulsionen, die in der Internationalen Patentanmeldung Nr. WO 95/17210 beschrieben sind, haben offensichtlich größere Vorteile gegenüber konventionellen nicht-Th1-induzierenden Adjuvantien. Jedoch hat der Einschluss von QS21 dieses potente Adjuvans bisher reaktogen gemacht, was zu Schmerzen an der Injektionsstelle führt.

[0011] Formulierungen, die QS21 mit einem Sterin umfassen, sind aus der internationalen Patentanmeldung Nr. PCT/EP96/01464 bekannt, aber keine Öl-in-Wasser-Emulsion sind in diesem Dokument offenbart. Sterine sind im Fachgebiet gut bekannt, beispielsweise ist Cholesterin wohlbekannt und ist beispielsweise im Merck-Index, 11. Ausgabe, S. 341 als natürlich auftretendes Sterin, das in Tierfett gefunden wird, offenbart.

[0012] WO 97/01640 offenbart Impfstoffe gegen Hepatitis C-Virus, die auf Öl-in-Wasser-Emulsionen beruhen.

[0013] WO 96/33739 offenbart Impfstoffformulierungen, die ein Saponin und ein Sterin enthalten.

[0014] WO 90/03184 offenbart ISCOM-Matrices mit immunmodulierender Aktivität.

[0015] WO 98/15287 offenbart Impfstoffformulierungen, die Alaun, ein Antigen und eine immunologisch wirksame Saponinfraktion und ein Sterin enthalten.

[0016] Die vorstelligen Erfinder haben herausgefunden, dass Öl-in-Wasser-Formulierungen, die ein Sterin und QS21 enthalten, reduzierte lokale Reaktogenität nach Injektion in einem Wirt, bezogen auf vergleichbare Emulsionen haben, die ohne ein Sterin formuliert sind. Das ist überraschend, da Sterine, die öl-löslich sind, sich erwartungsgemäß im Kern des Öltröpfchens auflösen, während andererseits QS21 primär mit der wässrigen Phase assoziiert erwartet wird. Deswegen könnte erwartet werden, dass das Sterin physisch vom QS21 getrennt sei. Nichtsdestotrotz sind diese Formulierungen überraschend weniger reaktogen als solche Öl-in-Wasser-Emulsionen, die nicht Sterin enthalten.

[0017] Daher wird eine Impfstoffzusammensetzung, die ein Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen oder ein Derivat davon umfasst, bereitgestellt, eine Öl-in-Wasser-Emulsion und ein Saponin, wobei die Öltröpfchen dieser Öl-in-Wasser-Emulsion Squalen und ein Sterin umfassen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cholesterin, β -Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Ergocalciferol. Besonders bevorzugte Ausführungsformen hiervon schließen Zusammensetzungen ein, in denen das Saponin die nicht-toxische Fraktion von Quil A ist, die als QS21 bekannt ist, und wobei das Sterin Cholesterin ist. Eine solche Zusammensetzung kann auch andere Immunmodulatoren umfassen einschließlich: α -Tocopherol und Polyoxyethylensorbitanmonooleat (TWEEN 80) sowie 3D-MPL. Das Einschließen von Cholesterin in die Formulierung reduziert die lokale Reaktogenität der Zusammensetzung, sobald sie in einem Empfänger injiziert worden ist, stark. Andere Sterine, die leicht als Alternativen für Cholesterin dienen können, schließen β -Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Ergocalciferol ein.

[0018] Solche erfindungsgemäßen Ausführungsformen werden als leistungsfähige Impfstoffe verwendet. Vorteilhafterweise induzieren sie bevorzugt eine Th1-Antwort.

[0019] Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen Zusammensetzungen ein, die (zusammen mit dem Antigen) eine Öl-in-Wasser-Emulsion, ein Saponin und ein Sterin umfassen, dadurch gekennzeichnet, dass ein reduziertes Reaktogenizitätsprofil nach Verabreichung an einen Wirt im Vergleich mit dem Reaktogenizitätsprofil induziert wird, das nach der Verabreichung der gleichen Zusammensetzung beobachtet wird, bei der das Sterin weggelassen worden ist.

[0020] Vorhergehende Beispiele von Öl-in-Wasser-Adjuvans-Emulsionen, die in der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 95/17210 offenbart sind, schlossen große Mengen an Squalen ein. Das Verhältnis von Squalen:Saponin (G/G) in solchen Impfstoffpräparaten lag im Bereich von 240:1. Ein zusätzlicher Nutzen, den die Zugabe von Cholesterin verleiht, ist die Gelegenheit, das Gesamtniveau der Öl-in-Wasser-Emulsion zu re-

duzieren. Das führt zu reduzierten Herstellungskosten, einer Verbesserung der Gesamtverträglichkeit der Impfung und auch qualitativer und quantitativer Verbesserungen der resultierenden Immunantworten wie beispielsweise verbesserter IFN- γ -Produktion. Dem gemäß umfasst das Adjuvanssystem der vorliegenden Erfindung typischerweise ein Squalen:Saponin-Verhältnis (G/G) im Bereich von 200:1 bis 300:1, und die vorliegende Erfindung kann auch in einer "Niedrig-Öl"-Form verwendet werden, wobei der bevorzugte Bereich 1:1 bis 200:1 ist, bevorzugt 20:1 bis 100:1 und am meisten bevorzugt im wesentlichen 48:1, wobei dieser Impfstoff die vorteilhaften Adjuvanseigenschaften aller Bestandteile bewahrt, mit einem stark reduzierten Reaktogenizitätsprofil. Dem gemäß haben die besonders bevorzugten Ausführungsformen ein Verhältnis von Squalen:QS21 (G/G) im Bereich von 1:1 bis 250:1, ein ebenfalls bevorzugter Bereich ist 20:1 bis 200:1, bevorzugt 20:1 bis 100:1 und am meisten bevorzugt im wesentlichen 48:1.

[0021] Die erfindungsgemäßen Emulsionssysteme haben eine kleine Öltröpfchengröße im Submikrometerbereich. Vorzugsweise werden die Öltröpfchengrößen in dem Bereich von 120 bis 750 nm liegen, und am meisten bevorzugt von 120 bis 600 nm Durchmesser.

[0022] Die erfindungsgemäßen Formulierungen sind für monovalente oder polyvalente Impfstoffe geeignet. Zusätzlich kann die Öl-in-Wasser-Emulsion 3 De-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL) und/oder Polyoxyethylensorbitantrioleat (wie beispielsweise SPAN 85) enthalten. Zusätzlich ist die bevorzugte Form von 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A in der internationalen Patentanmeldung offenbart, die unter der Nr. 92116556 – SmithKline Beecham Biologicals s.a. veröffentlicht worden ist.

[0023] Derivate des Hepatitis B-Oberflächenantigens sind im Gebiet gut bekannt und schließen u.a. die PreS1-, PreS2-S-Antigene ein, die in den europäischen Patentanmeldungen EP-A-414 374; EP-A-0304 578 und EP 198-474 beschrieben sind.

[0024] Das Verhältnis des QS21 zu Cholesterin (G/G), welches in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vorhanden ist, wird in einem Bereich von 1:5 bis 1:20 sein, häufig im wesentlichen 1:10.

[0025] Das Verhältnis von QS21:3D-MPL (G/G) liegt typischerweise in einer Größenordnung von 1:10 bis 10:1, bevorzugt 1:5 bis 5:1 und häufig im wesentlichen 1:1. Der bevorzugte Bereich für eine optimale Synergie beträgt 2,5:1 bis 1:1 3D-MPL:QS21. Typisch für die Verabreichung an den Menschen sind QS21 und 3D MPL in einem Impfstoff in dem Bereich von 1 μ g bis 100 μ g, bevorzugt 10 μ g bis 50 μ g je Dosis vorhanden. Typischerweise wird die Öl-in-Wasser-Emulsion von 2 bis 10% Squalen, von 2 bis 10% α -Tocopherol und von 0,4 bis 2% Polyoxyethylensorbitanmonooleat (TWEEN 80) umfassen. Vorzugsweise ist das Verhältnis von Squalen: α -Tocopherol gleich oder weniger als 1, da dies stabilere Emulsionen ergibt. Sorbitantrioleat (SPAN 85) kann ebenfalls in einer Größenordnung von 0,5 bis 1% vorhanden sein. In einigen Fällen kann es vorteilhaft sein, dass die erfindungsgemäßen Impfstoffe weiter einen Stabilisator enthalten, z.B. andere Emulgatoren/Tenside, einschließlich Caprylsäure (Merck Index 10. Ausgabe, Eintrag Nr. 1739) von denen Tricaprylin eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist.

[0026] Die Impfstoffherstellung ist im allgemeinen in New Trends and Developments in Vaccines, herausgegeben von Voller et al., University Park Press, Baltimor, Maryland, USA 1978, beschrieben. Die Konjugierung von Proteinen in Makromoleküle ist von Likhite, US-Patent 4,372,995 und von Armor et al., US-Patent 4,474,757 offenbart.

[0027] Die Proteinmenge in jeder Impfstoffdosis wird als eine Menge ausgewählt, die eine immunprotektive Antwort ohne signifikante Nebenwirkungen typischer Impfstoffe ausgewählt. Eine solche Menge variiert in Abhängigkeit davon, welches spezifische Immunogen benutzt wird und wie es präsentiert wird. Im allgemeinen wird es erwartet, dass jede Dosis 1 bis 1.000 μ g Protein umfasst, bevorzugt 1 bis 500 μ g, bevorzugt 1 bis 100 μ g, von denen 1 bis 50 μ g der meist bevorzugte Bereich ist. Die optimale Menge eines bestimmten Impfstoffs kann durch Standardstudien, einschließlich der Beobachtung einer geeigneten Immunantwort in Individuen bestimmt werden. Nach einer ersten Impfung können die Individuen eine oder mehrere Booster-Immunisierungen, die in geeigneter Weise zeitlich getrennt sind, erhalten.

[0028] In einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt wird ein Impfstoff bereitgestellt, der wie hier geschrieben ist, zu Verwendung in der Medizin dient.

[0029] Ebenfalls durch die vorliegende Erfindung wird ein Verfahren zum Verhindern der Reaktogenizität eines Saponins, bevorzugt QS21, welches eine Öl-in-Wasser-Emulsion enthält, bereitgestellt, und umfasst die Zugabe eines Sterins, bevorzugterweise Cholesterin zur Ölphase der Öl-in-Wasser-Emulsion in einem erfin-

dungsgemäßen Impfstoff.

[0030] QS21 in wässriger Lösung ist dafür bekannt, mit der Zeit in eine Adjuvans-inaktive Form, QS21-H, zer-
setzt zu werden, wobei die Zersetzung durch OH^- -Hydrolyse des wässrigen Mediums verursacht wird. Ein sol-
cher Zerfall kann auftreten, wenn das QS21 in der wässrigen Phase eines Öl-in-Wasser-Adjuvans vorhanden
ist. Überraschenderweise ist gefunden worden, dass die Zugabe von Cholesterin zur Ölphase der Öl-in-Was-
ser-Emulsion die Wirkung hat, QS21 in seiner aktiven Form zu bewahren, mit den offensichtlichen Vorteilen für
die Lagerfähigkeit der Adjuvans/Impfstoffformulierung. Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Sta-
bilisieren eines Saponinderivats, bevorzugterweise QS21, in seiner nicht-hydrolysierten Adjuvanzaktiven Form
bereit, wenn das QS21 in einem Adjuvans vorhanden ist, das auf einer Öl-in-Wasser-Emulsion basiert. Dieses
Verfahren umfasst die Zugabe von Sterin, bevorzugt Cholesterin zur Ölphase der Öl-in-Wasser-Emulsion in
einem Impfstoff gemäß der Erfindung.

[0031] Ebenfalls durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt wird das Verfahren zur Herstellung eines Impf-
stoffpräparats, umfassend die Zugabe von Cholesterin zu dem Squalen, gefolgt von der Emulgierung der Öl-
phase; wobei in die Emulsion QS21, und ein Antigen und gegebenenfalls 3D-MPL und α -Tocopherol zugege-
ben wird.

[0032] Das erfindungsgemäße Impfstoffpräparat kann verwendet werden, um einen Säuger, der für eine He-
patitis B-Infektion empfänglich ist oder daran leidet, zu schützen oder zu behandeln, indem der Impfstoff über
den systemischen oder mukösen Weg verabreicht wird. Diese Verabreichungen können die Injektion via intra-
muskuläre, intraperitoneale, intradermale oder subkutane Wege einschließen; oder mittels muköser Verabrei-
chung in die oralen/alimentär, respiratorischen, urogenitalen Trakte.

BEISPIEL 1

HERSTELLUNG DER ÖL-IN-WASSER-EMULSIONSADJUVANTIEN

[0033] Die Öl-in-Wasser-Emulsions-Adjuvansformulierungen, die in folgenden Beispielen verwendet werden,
wurden jeweils so gemacht, dass sie den folgenden Öl-in-Wasser-Emulsionsbestandteil umfassen: 5% Squa-
len, 5% α -Tocopherol, 2,0% Polyoxyethylensorbitanmonooleat (TWEEN 80).

[0034] Die Emulsion wurde wie folgt als 2-Fach-Konzentrat hergestellt. Alle Beispiele, die in den immunolo-
gischen Experimenten verwendet wurden, sind durch die Zugabe von Extra-Bestandteilen und Verdünnungs-
mitteln verdünnt worden, um eine Einfachkonzentration zu ergeben (entsprechend einem Squalen:QS21-Ver-
hältnis (G/G) von 240:1) oder weitere Verdünnungen davon.

[0035] Kurzgefasst wird TWEEN 80 in phosphatgepufferter Salzlösung gelöst, um eine 2%ige Lösung in PBS
zu ergeben. Um 100 ml einer 2-fach-konzentrierten Emulsion zu ergeben, werden 5 ml DL- α -Tocopherol und
5 ml Squalen gevortext, um sie gut zu durchmischen. 95 ml PBS/TWEEN-Lösung wird zu dem Öl hinzugege-
ben und gut durchmischt. Die resultierende Emulsion wird dann durch eine Spritzennadel geleitet und schließ-
lich unter Verwendung einer M110S-Mikrofluidics-Maschine mikrofluidisiert. Die resultierenden Öltröpfchen ha-
ben eine Größe von ungefähr 145 bis 180 nm (ausgedrückt als z_{av} , gemessen durch PCS) und werden als
"ganze Dosis" an SB62 bezeichnet.

[0036] Diese Formulierungen können durch einen 0,2 μl -Filter steril filtriert werden. Die anderen Adju-
vans/Impfstoffbestandteile (QS21, 3D-MPL oder Antigen) werden zu der Emulsion in einer einfachen Zumi-
schung hinzugegeben.

[0037] Die Antigen-haltigen Impfstoffe, die hier verwendet werden, werden entweder mit ganzer Dosis an
SB62-Adjuvans formuliert, um ein hohes Squalen:QS21-Verhältnis (240:1) zu ergeben, oder mit einer geringe-
ren Menge der Emulsion formuliert, um eine Formulierung mit geringem Verhältnis (48:1). Diese Adjuvansfor-
mulierungen werden als SB62 und SB62' bezeichnet. Andere Impfstoffe wurden durch die Zugabe von Cho-
lesterin zur Ölphase der Emulsion vor dem Emulgierprozess formuliert, wobei das QS21:Cholesterinverhältnis
1:10 ist (bezeichnet durch die Zugabe des Buchstaben "c").

BEISPIEL 2

REAKTOGENITÄTSSTUDIEN MIT ÖL-IN-WASSER-EMULSIONS-ADJUVANTIEN MIT QS21 UNTER OPTIONALER ZUGABE VON CHOLESTERIN

[0038] Es wurde eine Studie durchgeführt, um die lokale und systemische Reaktogenität verschiedener Adjuvansformulierungen zu untersuchen. Öl-in-Wasser-Impfstoffadjuvantien, die QS21 enthalten, sind dafür bekannt, dass sie nach der Verabreichung an einen Wirt moderate Nebenwirkungen als klinische Symptome hervorrufen. Diese Untersuchung verglich das resultierende reaktogene Profil mit dem, das durch die gleiche Adjuvansformulierung erzeugt wird, die außerdem Cholesterin enthält.

EXPERIMENTELLES VERFAHREN

[0039] Die getesteten Öl-in-Wasser-Emulsionen wurden unter Verwendung von Techniken, die im Beispiel 1 beschrieben sind, hergestellt. Gruppen von 5 SPF-gezüchteten Neuseeland White-Albino-Kaninchen wurde durch intramuskuläre Injektion in den rechten Hinterbeinmuskel (gastrocnemius) mit 0,5 ml der Adjuvanspräparate inokuliert. Vor und nach der Impfung wurden Proben genommen, um den Prozentsatz der Polymorpho-Neutrophilen im Blut (als Ausmaß der Entzündung, %PMN) und Creatinphosphokinase (als Maß für Muskelschäden, CPK) zu untersuchen. Die Tiere wurden 3 Tage nach der Impfung für die histologische Untersuchung der Injektionsstelle geopfert.

Tabelle 1

GRUPPEN DER IN BEISPIEL 2 VERWENDETEN KANINCHEN

Gruppe	Impfstoffpräparat
19	SB62', QS21 (50 µg), MPL (50 µg)
20	SB62'c, QS21 (50 µg), MPL (50 µg)
21	QS21 (50 µg)
22	QS21 (5 µg)
23	SB62
24	SB62c
25	PBS

Fußnoten:

SB62 = ganze Dosis der Öl-in-Wasser-Emulsion

SB62' = 1/5 Dosis SB62

SB62'c = SB62', enthaltend Cholesterin in der Ölphase

PBS0 = Phosphatgepufferte Salzlösung

[0040] Die CPK-Niveaus, in Einheiten pro Liter (E/L) wurden aus dem Serum zu verschiedenen Zeitpunkten während des Experiments unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenzien (Abbot) und eines Abbot Vision System-Analysers bestimmt. %PMN in Blutproben wurden gleichzeitig unter Verwendung eines Sysmex K-1000 Hematology analyser (Toa Medical Electronics Co.) bestimmt.

[0041] Drei Tage nach der Injektion bestimmte die Post-Mortem-Inspektion der Kaninchen die Läsionsgröße an der Injektionsstelle und die lokale Histopathologie.

ERGEBNISSE

CPK-NIVEAUS VOR UND NACH DER IMPFUNG

Tabelle 2

MITTLERE CPK-KONZENTRATIONEN IN KANINCHEN

Gruppe	Mittlerer CPK (E/L)		
	Tag 0 (SD)	Tag 1 (SD)	Tag 3 (SD)
19	764 (545)	2.868 (1.284)	1.539 (487)
20	1.364 (1.842)	871 (543)	1.360 (309)
21	400 (191)	2.860 (1.405)	1.364 (552)
22	962 (783)	1.650 (343)	1.370 (475)
23	863 (762)	719 (306)	1.164 (426)
24	606 (274)	599 (172)	1.336 (779)
25	401 (107)	778 (176)	666 (164)

[0042] Aus der Tabelle 2 oben kann gesehen werden, dass Adjuvansformulierungen, die QS21 enthalten, einen merklichen Anstieg der Plasma-CPK-Niveaus am Tag 1 nach der Injektion zeigen, was auf ein signifikantes Niveau der Muskelschädigung an der Injektionsstelle hindeutet (Gruppen 19, 21 und 22).

[0043] Die Zugabe von Cholesterin zu Adjuvansformulierung verdrängt diese Wirkung und daher wurden keine Anstiege der CPK nach der Impfung gesehen (Gruppe 20). Die Ergebnisse, die unter Verwendung dieses Adjuvans erreicht wurden, sind sehr ähnlich denen, die mit PBS oder SB62 erzielt wurden, welches allein verabreicht wurde (siehe die Gruppen 23, 24 und 25).

PROZENTSATZ PMN

Tabelle 3

VERÄNDERUNGEN DER BLUT-%-PMN

Gruppe	% PMN				
	Tag -5 (SD)	Tag -1 (SD)	Tag 0 (SD)	Tag 1 (SD)	Tag 3 (SD)
19	14,1 (2,1)	18,9 (2,1)	15,2 (1,8)	34,0 (4,6)	12,9 (1)
20	17,3 (1,1)	20,7 (3,2)	18,0 (2,8)	40,2 (8,4)	16,7 (3,9)
21	15,8 (1,9)	18,4 (1,6)	15,6 (1,3)	25,7 (5,6)	14,3 (2,2)
22	14,3 (2,3)	16,3 (2,2)	14,7 (1,9)	14,6 (3,2)	15,9 (2,7)
23	15,5 (1,2)	16,5 (1,4)	15,7 (2,1)	31,9 (7,1)	14,0 (2,5)
24	16,5 (1,7)	20,0 (2,7)	13,6 (2,6)	32,3 (2,7)	14,9 (2,5)
25	15,0 (2,9)	18,2 (2,9)	16,4 (2,2)	16,1 (5,0)	12,4 (2,2)

[0044] Der Prozentsatz an Blut-PMN wird als Indikator der Stärke der lokalen Entzündungsreaktion in Reaktion auf die Impfung herangezogen. Wie aus der Tabelle 3 gesehen werden kann, betrifft die Zugabe von Cholesterin zu der QS21-haltigen Adjuvansformulierung nicht signifikant des Entzündungsprozess am Tag 1 nach der Impfung, trotz der Abwesenheit von Muskelschäden, wie in Tabelle 2 gezeigt wird. Die Zugabe von Cholesterin betrifft nicht den Entzündungsprozess, der durch SB62 induziert wird.

TABELLE 4

HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Gruppe	Kanninchen	Injektionsstelle		Histopathologie					Bemerkungen
		Läs	Größe (mm)	Necro	Rhabdo	Infiltr	Oedem	haemo	
19	1	+	3x3x2	1	1	3	2	2	
	2	+	30x10x6	4	2	3	2	2	
	3	+	25x18x6	4	3	3	2	3	
	4	+	28x10x5	4	2	3	2	3	
	5	+	27x14x4	4	2	3	2	2	
20	6	+	3x2x2	1	2	3	1	2	
	7	s	0	0	0	1	0	0	
	8	-	0	1	0	1	0	0	
	9	-	0	1	2	2	1	1	
	10	+	4x2x2	1	2	3	1	2	
21	11	+	24x13x5	4	2	3	2	3	
	12	+	25x12x7	4	3	3	2	3	

	13	+	22x12x4	4	2	3	2	3	
	14	+	18x10x4	4	2	3	2	3	
	15	+	22x12x7	4	3	3	2	3	
22	16	+	14x7x5	3	3	3	2	3	
	17	+	8x4x2	3	2	3	2	4	
	18	+	10x8x3	3	1	3	2	1	
	19	+	4x3x2	2	2	3	2	4	
	20	+	12x7x2	2	3	3	2	3	
23	21	-	0	0	2	2	1	1	
	22	s	0	0	1	2	1	1	
	23	-	0	0	0	1	0	0	
	24	-	0	0	0	0	0	0	
	25	-	0	0	0	0	0	0	
24	26	-	0	0	1	2	0	0	
	27	s	0	0	1	2	0	0	
	28	-	0	0	1	2	0	0	
	29	-	0	0	0	2	0	0	
	30	s	0	1	2	2	1	1	
25	31	s	0	0	0	1	0	0	
	32	s	0	0	0	0	0	0	
	33	s	0	0	0	2	1	1	
	34	-	0	0	0	0	0	0	
	35	-	0	0	0	0	0	0	

Fußnoten:

Läs = Läsion

Necro = Necrose

Infiltr = Lymphocyteninfiltration

Oedem = Ödem

Haemo = Hämorrhagie

Rhabdo = Rhabdomyolyse

Einteilung:

0 = keine Anzeichen

1 = sehr leicht

2 = leicht

3 = moderat

4 = schwer

+ = vorhanden

s = punktuell

- = kein Anzeichen

[0045] Die histologische Untersuchung an der Injektionsstelle bestätigt die früheren CPK-Daten, die in Tabelle 2 gezeigt werden, in der Hinsicht, dass die lokale Schädigung signifikant durch die Zugabe von Cholesterin zu der Adjuvansformulierung reduziert war.

[0046] Eine schwere Necrose, begleitet mit einer moderaten Rhabdomyolyse, Ödem und Hämorrhagie wurde bei allen Impfstoffadjuvantien beobachtet, die "nicht-gequenchtes" QS21 enthalten (Gruppen 19, 21 und 22). Diese Zeichen waren mit sehr großen Läsionen an der Injektionsstelle assoziiert.

[0047] Das Einschließen von Cholesterin (Gruppe 20) reduzierte das makroskopische Auftreten von Läsionen (in nur 2 der 5 Kaninchen), wenn es mit denen der Gruppe 19 verglichen wurde und reduzierte signifikant den Schweregrad anderer histopathologischer Anzeichen, wenn sie vorhanden waren.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0048] Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird klar, dass die Verwendung der Adjuvansformulierungen, die QS21 umfassen, oder sogar QS21 alleine, ein signifikantes Ausmaß lokaler Schädigung an der Injektionsstelle verursachen. Diese schädigende Wirkung kann erfolgreich durch das Einschließen von Cholesterin in der Adjuvansformulierung verhindert werden.

BEISPIEL 3

IMMUNOGENIZITÄTSSTUDIEN MIT REKOMBINANTEM ANTIGEN S,L*

[0049] In Balb/C-Mäusen wurde eine Studie durchgeführt, um die Immunogenizität der verschiedenen S,L*-haltigen Formulierungen zu vergleichen. S,L* ist ein zusammengesetztes Antigen, das ein modifiziertes Oberflächenantigen-L-Protein (L*) und ein S-Protein umfasst, die beide vom Hepatitis B-Virus stammen (HB). Dieses zusammengesetzte Antigen ist Gegenstand der europäischen Patentanmeldung Nr. EP 0 414 374.

[0050] Zahlreiche Formulierungen mit verschiedenen Verhältnissen von Squalen:QS21, ggf. mit Cholesterin in einem QS21:Cholesterin-Verhältnis von 1:10 wurden mit S,L* kombiniert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit verglichen, humorale und zellvermittelte Immunantworten zu induzieren (Cytokinproduktion und CTL). Diese Öl-in-Wasser-Adjuvansemulsionen wurden unter Verwendung von Verfahren, die im Beispiel 1 beschrieben sind, hergestellt. S,L*, das auf Aluminiumhydroxid (AlOH₃) induziert wurde, wurde als eine Th2-induzierende Kontrolle verwendet.

[0051] Kurz gefasst wurden Gruppen von 10 Mäusen intramuskulär 4-mal in 3-wöchigen Intervallen mit 2 µg lyophilisiertem S,L*, kombiniert mit verschiedenen Öl-in-Wasser-Emulsionssystemen (SB62), immunisiert. 14 Tage nach der vierten Immunisierung wurde die Produktion von Cytokinen (IL5 und IFN-γ) und die CTL-Aktivität nach der in vitro Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen mit S,L*-Antigen analysiert. Die Antikörperantwort gegen S,L* und das Isotypenprofil, das induziert wurde, wurden mittels ELISA 21 Tage nach II und 14 Tage post IV überwacht.

GRUPPEN DER MÄUSE

[0052] Gruppen der 10 Balb/C-Mäuse wurden intramuskulär mit den Formulierungen, die unten beschrieben sind, immunisiert. SB62 wurde zusammen mit dem Antigen in einem normalen (240:1, SB62) oder niedrigen (48:1, SB62') Verhältnis von Squalin:QS21 formuliert, ggf. unter Zugabe von Cholesterin (c).

TABELLE 5

GRUPPEN DER IN BEISPIEL 3 BESCHRIEBENEN MÄUSE

Gruppe	Antigen S,L*	Adjuvansname	Zusammensetzung der Adjuvansformulierung
GR 1	2 µg	SB62	25 µl SB62 / 5 µg QS21 / 5 µg 4D-MPL
GR 2	2 µg	SB62c	25 µl SB62c / 5 µg QS21 / 5 µg 4D-MPL
GR 3	2 µg	SB62'	5 µl SB62 / 5 µg QS21 / 5 µg 4D-MPL
GR 4	2 µg	SB62'c	5 µl SB62c / 5 µg QS21 / 5 µg 4D-MPL
GR 5	2 µg	Alaun	50 µl AlOH ₃

IMMUNISIERUNGSSCHEMA

[0053] Die Tiere wurden an den Tagen 0, 21, 42 und 63 intramuskulär in das Bein immunisiert (50 µl bei allen Gruppen, außer bei der Gruppe 5, in der 100 µl injiziert wurden). Aus dem retrosorbitalen Sinus wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Immunisierungen Blut entnommen. Am Tag 77 wurden Tiere jeder Gruppe geopfert, die Milzen und Lymphknoten, die die Injektionsstelle umgeben (ileale Lymphknoten) wurden für die in vitro Restimulation herausgenommen. Pools aus 3 oder 4 Milzen und 1 Pool aus 10 LN wurden für jede Gruppe gewonnen und separat in den in vitro Assays behandelt.

MAUS-SEROLOGIE

[0054] Die Quantifizierung der Anti-HBs-Antikörper wurde durch einen Elisa unter Verwendung von HB-Oberflächenantigen als Beschichtungsantigen durchgeführt. Antigen und Antikörperlösungen wurden zu 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde auf eine finale Konzentration von 1 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Vertiefungen einer 96 Well Mikrotiterplatte (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 Stunde bei 37°C mit PBS, das 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 gewaschen (Sättigungspuffer) enthält, inkubiert. Zweifache Verdünnungen der Seren (ausgehend von einer 1/100-Verdünnung) in dem Sättigungspuffer, wurden zu den HBs-beschichteten Platten gegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1% Tween 20 und Biotin-konjugierten Anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b oder -Ig (Amersham, UK), welche auf 1/1000 Sättigungspuffer verdünnt waren, wurden zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden wie oben gewaschen und für 20 Minuten mit einer Lösung aus o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04% H₂O₂ 0,03% in 0,1% TWEEN 20, 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde durch H₂SO₄ 2N gestoppt und bei 492/620 nm ausgelesen. Die ELISA-Titer wurden durch eine Referenz von SoftmaxPro (unter Verwendung von vier Parametergleichungen) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

T-ZELLENPROLIFERATION

[0055] 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen und Lymphknoten wurden aseptisch in Pools entfernt (3 oder 4 Organe pro Pool für Milzzellen, 1 Pool aus 10 Organen für LNC). Die Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO), enthaltend 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 1% syngenes normales Mausserum hergestellt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen pro ml (bei LNC oder SPC) in 200 µl in Rundboden-96 Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen (10-0,03 µg/ml) an S,L*-Antigen (25D84) kultiviert. Jeder Test wurde vierfach durchgeführt. Nach 96 Stunden Kultur bei 37°C unter 5% CO₂ wurden die Zellen für 18 Stunden mit 3H-Thymidin beladen (Amersham, UK, 5 Ci/mmol) zu 0,5 µCi/Well und dann mit einem Zellernter auf Glasfaserfilter geerntet. Die eingebaute Radioaktivität wurde in einem Flüssig-Szintillationszählgerät gemessen. Die Ergebnisse werden als cpm ausgedrückt (mittlerer cpm in vier Wells) oder als Stimulationsindizes (mittlerer cpm in Kulturen der Zellen mit Antigen/mittlerer cpm in Zellkulturen ohne Antigen).

CYTOKINPRODUKTION

[0056] 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, Milzen und Lymphknoten wurden aseptisch in Pools entfernt (3 oder 4 Organe pro Pool für Milzzellen, 1 Pool von 10 Organen für LNC). Es wurden Zellsuspensionen in RPMI 1640-Medium (GIBCO), enthaltend 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 5% fötales Kälberserum hergestellt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 2,5 bis 5×10^6 Zellen pro ml (jeweils für LNC bzw. SPC) in 1 ml in Rundboden-24-Well mit verschiedenen Konzentrationen (1-0,01 µg/ml) an S,L* (25D84) kultiviert. Die Überstände wurden 96 Stunden später geerntet und bis sie auf das Vorhandensein von IFNγ und IL-5 mittels Elisa getestet wurden, eingefroren.

IFN-γ-PRODUKTION

[0057] Die Quantifizierung von IFNγ wurde durch Elisa unter Verwendung von Reagenzien von Genzyme durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden zu 50 µl pro Well verwendet. 96 Well-Mikrotiterplatten (Maxisorb Immunoplate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl Hamster-Anti-Maus-IFNγ verdünnt auf 1,5 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 9,5, beschichtet.

[0058] Die Platten wurden dann für 1 Stunde bei 37°C mit 100 µl PBS, enthaltend 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 (Sättigungspuffer) inkubiert. Zweifachverdünnungen des Überstands der in vitro Stimulation (beginnend bei 1/2) in Sättigungspuffer, wurden zu den Anti-IFNγ-beschichteten Platten hinzugegeben

und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 4-mal mit PBS Tween 0,1% (Waschpuffer) gewaschen und Biotin-konjugierter Ziege-anti-Maus-IFN γ , verdünnt in Sättigungspuffer, auf eine Endkonzentration von 0,5 μ g/ml wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschschrift wurde AMDEX-Konjugat (Amersham) verdünnt auf 1/10.000 in Sättigungspuffer für, 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und mit 50 μ l TMB (Biorad) für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,4 N H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm gelesen. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (Maus-IFN γ -Standard) mittels SoftmaxPro (Vier-Parameteregleichung) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

II-5-PRODUKTION

[0059] Die Quantifizierung von IL5 wurde durch Elisa unter Verwendung von Reagenzien von Pharmingen durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden zu 50 μ l pro Well verwendet. 96 Well-Mikrotiterplatten (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 μ l Ratte-anti-Maus-IFN γ verdünnt auf 1 μ g/ml in Carbonatpuffer, pH 9,5, beschichtet. Die Platten wurden dann für 1 Stunde bei 37°C mit 100 μ l PBS, enthaltend 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 (Sättigungspuffer) inkubiert. Zweifach-verdünnungen des Überstands der in vitro Stimulation (beginnend bei 1/2) in Sättigungspuffer, wurden zu den Anti-IL5-beschichteten Platten hinzugegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 4-mal mit PBS Tween 0,1% (Waschpuffer) gewaschen und Biotin-konjugierter Ratte-anti-Maus-IL5 in Sättigungspuffer auf eine Endkonzentration von 1 μ g/ml verdünnt, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde AMDEX-Konjugat (Amersham), verdünnt auf 1/10.000 in Sättigungspuffer, für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und mit 50 μ l TMB (Biorad) für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,4 N H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm gelesen. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (Maus-IL5) durch Softmax-Pro (Vier-Parameteregleichung) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

CTL-INDUKTION

[0060] 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen aseptisch in Pools von 3 oder 4 Mäusen entfernt (2 Pools von 3 und 1 Pool von 4 Mäusen je Gruppe). Die Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO), enthaltend 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5 \times 10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol und 5% fötales Kälterserum hergestellt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 2 \times 10⁶ Zellen pro ml in 10 ml Medium, enthaltend 2 μ g/ml S,L* und 1,25% ConA sup (25 cm² Falcon Flaschen) kultiviert und 8 Tage bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert.

CTL-ASSAY

[0061] Am Tag vor dem CTL-ASSay (d7) wurden die Zielzellen durch Inkubation von P815-Zellen (10⁶ Zellen/ml) mit S,L* oder Peptid S₂₈₋₃₉ zu 10 μ g/ml hergestellt. Nach 1 Stunde Inkubation in 15 ml Falcon-Röhrchen in einem geringen Volumen wurden die Zellen in 24 Well-Platten transferiert und ON bei 37°C inkubiert.

[0062] Am Tage des Assays wurden 2 \times 10⁴ S,L* und S₂₈₋₃₉-gepulste P815-Zellen und P815-S zentrifugiert in 50 μ l FCS resuspendiert und mit 75 μ l ⁵¹Cr (375 μ Ci) für 1 Stunde bei 37°C (Schütteln alle 15') resuspendiert. Die Zellen werden dann 4-mal mit 10 ml Komplettmedium gewaschen und nach dem vierten Waschen für 30' bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden dann zentrifugiert und auf eine Konzentration von 2 \times 10⁴ Zellen/ml resuspendiert.

[0063] Die Effektorzellen werden dann zentrifugiert, gezählt und auf 2 \times 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Die dreifachen seriellen Verdünnungen der Effektorzellen werden in 96 V-Bodenplatten durchgeführt, beginnend bei einer Konzentration von 2 \times 10⁵ Zellen/Vertiefung/100 μ l.

[0064] 2 \times 10³ Zielzellen in 100 μ l werden zu den Effektorzellen in Triplikaten hinzugegeben. Spontane und maximale Freisetzung werden durch Inkubieren der Zielzellen mit Medium bzw. Triton X100 3% bestimmt.

[0065] Die Platten werden für 3' bei 700 Upm zentrifugiert und für 4 Stunden für 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 50 μ l Überstand aus jeder Vertiefung in Luma-Platten überführt und über Nacht getrocknet, bevor sie in einem Top-Count-Szintillationszählgerät gezählt werden. Die Ergebnisse werden als spezifische Lyse ausgedrückt und wie folgt berechnet: %SR = (Durchschnitt cpm-Probe – Durchschnitt cpm-Medium/Durchschnitt cpm-Maximum – Durchschnitt cpm-Medium) \times 100

ERGEBNISSE

SEROLOGIE

[0066] Die humoralen Reaktionen (Ig und Isotypen) wurden durch einen Elisa unter Verwendung von HB-Oberflächenantigenen als Beschichtungsantigen gemessen. Nur der Zeitpunkt: 21 Tage post II wurde untersucht. Die Ergebnisse werden in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt.

[0067] [Fig. 1](#) zeigt die Titer der Anti-Hepatitis B-Virus-Antikörperreaktionen (Ig), die sowohl für individuelle Mausseren und als Durchschnitt (21 Tage post II) ausgedrückt werden.

[0068] [Fig. 2](#) zeigt die Sub-Isotypverteilung von HBs-spezifischem IgG im Serum der geimpften Mäuse.

- Wie in [Fig. 1](#) gesehen werden kann, induzieren SB62-abhängige Formulierungen viel höhere Antikörpertiter als die S,L*-Alaun-Formulierung.
- Die Analyse der durchschnittlichen Titer der individuellen Seren legt nahe, dass höhere Antikörpertiter mit SB62c- und SB62'c-Formulierungen erzielt werden (ungefähr 2-fach höhere Antikörpertiter als SB62 und SB62').
- Die statistische Analyse der individuellen Seren (Anova1-Test Newman Keuls) zeigte keinen signifikanten Unterschied der Antikörpertiter, die durch SB62c und SB62'c induziert wurden oder gleichermaßen zwischen den Antikörpertitern, die durch SB62 und SB62'c induziert wurden.
- Das Sub-Isotypen-Verteilungsprofil (wie in [Fig. 2](#) gezeigt ist) ist vergleichbar mit allen SB62-verwandten Formulierungen (25 bis 30% IgG2a), wobei Alaun nur 4% IgG2a induziert.

ZELLVERMITTELTE IMMUNANTWORTEN

[0069] Die zellvermittelten Immunreaktionen (Lymphoproliferation, IFN γ /IL5-Produktion und CTL) wurden am Tag 14 post IV nach in vitro Restimulierung von Milz und ilealen Lymphknotenzellen mit S,L*-Antigen gemessen.

CYTOKINPRODUKTION

[0070] Die Cytokinproduktion (IFN- γ und IL-5) ist nach 96 Stunden einer in vitro Restimulierung von Milzzellen und ilealen Lymphknotenzellen mit S,L* gemessen worden. Die Ergebnisse werden in den [Fig. 3](#) bis [Fig. 6](#) gezeigt.

[0071] [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse von IFN- γ -Produktion durch Milzzellen (Mittelwert der mit drei Pools/Gruppe erhaltenen Daten).

[0072] [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse der IL-5-Produktion durch Milzzellen (Mittelwert der mit drei Pools/Gruppe gewonnenen Daten).

[0073] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse der IFN- γ -Produktion durch ileale Lymphknotenzellen (Mittelwert der Daten, die mit drei Pools/Gruppe gewonnen werden).

[0074] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse der IL-5-Produktion durch ileale Lymphknotenzellen (Mittelwert der Daten, die mit drei Pools/Gruppe gewonnen werden).

Tabelle 6

VERHÄLTNIS VON IFN- γ :IL-5-PRODUZIERENDEN ZELLEN, DIE IN MILZZELLEN NACHGE-WIESEN WERDEN

Restimulierung	Gruppen				
	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5
S, L* 10 μ g/ml	22, 9	10, 7	51, 7	17, 0	0, 9

Diskussion

[0075] Ein IFN- γ :IL-5-Verhältnis > 1 legt klar nahe, dass eine pro-TH1-Reaktion durch SB62-verwandte For-

mulierungen (berechnet auf 10 µg/ml S,L*) (siehe Tabelle 6) induziert wird.

[0076] Die stärkste IFN-γ-Produktion wird nach Restimulierung von Milzzellen von Tieren erzielt, die mit S,L* SB62' und SB62'c immunisiert wurden. SB62c-Formulierungen induzieren stärkere IFN-γ-Produktion als die entsprechenden SB62-Formulierungen (Milzzellen).

[0077] Höhere Konzentrationen an IL-5 werden durch Tiere produziert, die mit S,L* SB62c-Formulierungen statt S,L* SB62-Formulierungen, die kein Cholesterin enthalten, produziert. S,L* Alaun-immunisierte Tiere produzierten die höchsten IL-5-Konzentrationen.

[0078] Kein signifikanter Unterschied wird zwischen ilealen Lymphknotenzellen-IFN-γ-Produktion zwischen SB62- und SB62c-Formulierungen beobachtet.

[0079] Die Stärkste IFN-γ-Produktion wird nach Restimulierung von Milzzellen von mit S,L* SB62'c-immunisierten Tieren erzielt.

CYTOTOXISCHE T-ZELLENREAKTION

[0080] S,L*-spezifische CTL-Reaktionen, die in den Milzzellen von Mäusen zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung beobachtet werden, sind in [Fig. 7](#) gezeigt.

[0081] [Fig. 7](#) zeigt die CTL-Aktivität von Milz-T-Zellen, die in vitro für 7 Tage mit S,L*-Antigen stimuliert wurden (Mittelwert%-spezifische Lyse von drei Pools).

DISKUSSION

[0082] S,L*-spezifische CTL wird durch die Impfung mit allen Öl-in-Wasser-Emulsionsformulierungen stimuliert.

[0083] Eine stärkere CTL-Reaktion wird mit Formulierungen beobachtet, die SB62'-Emulsionen enthalten, wenn auf das limitierende E/T-Verhältnis, wie 3/1, geschaut wird.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Das TH1-artige Profil der Immunreaktion, welches durch alle SB62-verwandten Formulierungen induziert wird, wird weiter durch das IFN-γ/IL-5-Verhältnis bestätigt.
2. Ein vergleichbares Isotypenprofil (25 bis 30% IgG2a) wird mit allen SB62-verwandten Formulierungen erzielt, was die Induktion einer TH1-typischen HBs-spezifischen Immunreaktion nahe legt.
3. Alle SB62-verwandten Formulierungen induzieren spezifische CTL mit einer leichten Verbesserung, die bei der Verabreichung von SB62' gesehen wird.
4. Kein signifikanter Unterschied wird zwischen den Antikörpertitern gesehen, die auf die Immunisierung mit SB62c und SB62' folgen.
5. Die stärkste IFN-γ-Produktion wird nach der Immunisierung mit SB62'c beobachtet.

Tabelle 7

ZUSAMMENFASSENDE TABELLE DER IMMUNPARAMETER, DIE DURCH DIE IMPFSTOFFFORMULIERUNG INDUZIERT WERDEN, DIE IN BEISPIEL 3 BESCHRIEBEN WIRD

Immunparameter	Formulierungen, die S,L* enthalten				
	SB62	SB62c	SB62'	SB62'c	Alaun
Ak-Titer	+++	+++	++	+++	+
TH-Typ (%IgG2a)	Th1 (29)	TH1 (26)	TH1 (29)	TH1 (30)	TH2 (4)
IFN-γ	+	++	+++	++++	+
IL-5	-	+	+	++	+++
CTL	+	+	++	++	-

BEISPIEL 4: STABILISIERUNG VON QS21 DURCH ZUGABE VON CHOLESTERIN

[0084] Es ist zuvor beschrieben worden, dass QS21-H das Hydrolyseprodukt von QS21 ist, das als Adjuvans nicht länger wirksam ist. Es wird durch die Spaltung des QS21-Moleküls durch OH^- in der wässrigen Lösung gebildet. Diese Reaktion tritt auf, wenn der pH-Wert des wässrigen Mediums über einem Wert von 6,5 liegt, und wird bei höherer Temperatur beschleunigt. Die Öl-in-Wasser-Emulsionen, die in dieser Patentanmeldung beschrieben werden (z.B. SB62) sind dafür bekannt, dass sie eine stabilisierende Wirkung aufweisen, so dass die Hydrolyse von QS21 in QS21-H gehemmt wird. Durch die Verdünnung der Öl-in-Wasser-Emulsion in Gegenwart von konstantem QS21, verlieren sie ihre stabilisierende Eigenschaft und das QS21 degeneriert in die inaktive Form QS21-H. Überraschenderweise bewahren Emulsionen, die zusätzliches Cholesterin enthalten, welche bei einem 1/1-Verhältnis keine verbesserte QS21-Stabilität zeigen, die stabilisierende Wirkung selbst bei einer 1/5-Verdünnung.

[0085] QS21 und QS21-H werden direkt in der Emulsion untersucht. Dies wird durch das chemische Derivatisieren der vollständigen Formulierung erreicht, und durch Durchführen eines selektiven Extraktionsschritts, welcher das QS21 löst, aber die meisten interferierenden Matrixverbindungen zurück lässt. Dieser Test basiert auf HPLC, und die Verbindungen werden dansyliert. Die Dansylierung wird durch Trocknen einer Probe der Emulsion durchgeführt und durch das Zugabe von 100 μl von 3,5 mg Dansylhydrazin/ml C/M 2/1 und 100 μl 1:4 Essigsäure:C/M 2/1, in dieser Reihenfolge. Die Mischung wird gut gevortext und für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird in der Speedvac getrocknet. Es wird in 500 μl 30% ACN in H_2O rekonstruiert und zweimal bei 14.000 Upm für 2 Minuten zentrifugiert. Dann werden die Überstände in einem Autosampler-Röhrchen gesammelt. Eine Standardkurve wird durch Herstellen von QS21 und QS21-H in einer Mischung erstellt, die die gleichen Verbindungen wie die Emulsion der Studie enthält.

[0086] Der HPLC-Test wird auf einer Vydac 218TP54 5 μm Partikelgröße C18RP-Säule, 250*4,6 mm laufen lassen. Die Lösungsmittel sind A:H2O + 0,05% TFA (Trifluoressigsäure) und B:Acetonitril + 0,05% TFA. Die Gradiententabelle ist:

Zeit (min)	%A	%B
0	70	30
2	70	30
15	50	50
17	50	50
17,1	10	90
19	10	90
21	70	30
25	70	30

[0087] Die Fließrate beträgt 1 ml/min. Die Detektion wird mittels Fluoreszenz gemacht, bei einer Anregung von 345 nm und einer Emission bei 515 nm. 50 μl von sowohl der Probe und der Standards wird injiziert. Die Säulenerwärmung wird auf 37°C für diese Trennung eingestellt. Die Peaks für QS21, QS21-iso und QS21-H werden auf dem Chromatogramm unterscheidbar.

[0088] Eine Reihe von Proben mit der folgenden Zusammensetzung wurde analysiert:

Zusammensetzung	SB62	SB62c	MPL	QS21
SB62	250 μl	-	50 μg	50 μg
SB62'	50 μl	-	50 μg	50 μg
SB62c	-	250 μl	50 μg	50 μg
SB62'c	-	50 μl	50 μg	50 μg

[0089] Der Test für QS21/QS21-H wurde nach Inkubation der Proben zu verschiedenen zeitlichen Intervallen und Temperaturen (4°C und 37°C) durchgeführt. Die Daten für 1 Monat bei 37°C in diesem Modell korrelieren

gut mit der Stabilität von QS21 nach verlängerter Lagerung bei 4°C (z.B. 2 Jahre).

TABELLE 8

HPLC QS21-ASSAY: % DES ÜBER DIE ZEIT ERZEUGTEN QS21-H

Zusammensetzung	3 Monate (4°C)	6 Monate (4°C)	3 Monate (4°C) + 7 Tage (37°C)	1 Monat (37°C)
SB62	1 %	2 %	3 %	15 %
SB62'	1 %	1 %	9 %	31 %
SB62c	2 %	2 %	3 %	17 %
SB62'c	2 %	2 %	3 %	21 %

[0090] Diese Ergebnisse in der oben gezeigten Tabelle zeigen klar (sowohl für 7 Tage und 1 Monat) die Wirkung der Zugabe eines Sterins, in diesem Fall Cholesterin, zum SB62' bei Aufrechterhaltung der Stabilität von QS21.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0091] Aus den obigen Beispielen ist klar, dass die vorliegende Erfindung eine Öl-in-Wasser-Emulsion umfasst, die vorzugsweise starke Th1-artige Immunreaktionen induziert. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, wie in den Beispielen beschrieben, schließen Zusammensetzungen ein, die eine Öl-in-Wasser-Emulsion, ein Saponin und ein Sterin umfassen, dadurch gekennzeichnet, dass ein reduziertes Reaktogenitätsprofil nach Verabreichung an einen Wirt im Vergleich mit dem Reaktogenitätsprofil induziert wird, das nach Verabreichung der gleichen Zusammensetzung beobachtet wird, bei der das Sterin weggelassen wird. Die Zugabe von Cholesterin beeinflusst jedoch quantitativ oder qualitativ nicht die Immunreaktionen die induziert werden.

Patentansprüche

1. Impfstoffzusammensetzung, umfassend ein Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen oder ein Derivat davon, eine Öl-in-Wasser-Emulsion und ein Saponin, wobei die Öltröpfchen dieser Öl-in-Wasser-Emulsion Squalen und ein Sterin umfassen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cholesterin, β -Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Ergocalciferol.

2. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 1 beansprucht, wobei das Sterin Cholesterin ist.

3. Zusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 oder 2 beansprucht, wobei das Saponin ein Derivat von QuilA ist.

4. Zusammensetzung, wie in Anspruch 3 beansprucht, wobei dieses Derivat von QuilA QS21 ist.

5. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 4 beansprucht, wobei das Verhältnis von QS21:Cholesterin im Bereich von 1:1 bis 1:10 (G/G) liegt.

6. Impfstoffzusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 4 oder 5 beansprucht, wobei das Verhältnis von Squalen:QS21 im Bereich von 1:1 bis 250:1 (G/G) liegt.

7. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 6 beansprucht, wobei das Verhältnis von Squalen:QS21 im wesentlichen 48:1 (G/G) ist.

8. Impfstoffzusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht, weiter enthaltend einen oder mehrere andere Immunmodulatoren.

9. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 8 beansprucht, in der einer oder mehrere andere Immunmodulatoren ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus 3D-MPL und α -Tocopherol.

10. Impfstoffzusammensetzung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 beansprucht, wobei die Öl-in-Was-

ser-Emulsion Öltröpfchen umfasst, die einen Durchmesser haben, der weniger als 1 Mikrometer beträgt.

11. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 10 beansprucht, wobei die Öl-in-Wasser-Emulsion Öltröpfchen umfasst, deren Durchmesser im Bereich von 120 bis 750 nm liegt.

12. Impfstoffzusammensetzung, wie in Anspruch 11 beansprucht, wobei die Öl-in-Wasser-Emulsion Öltröpfchen umfasst, deren Durchmesser im Bereich von 120 bis 600 nm liegt.

13. Impfstoffzusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12 beansprucht, zur Verwendung als Medikament.

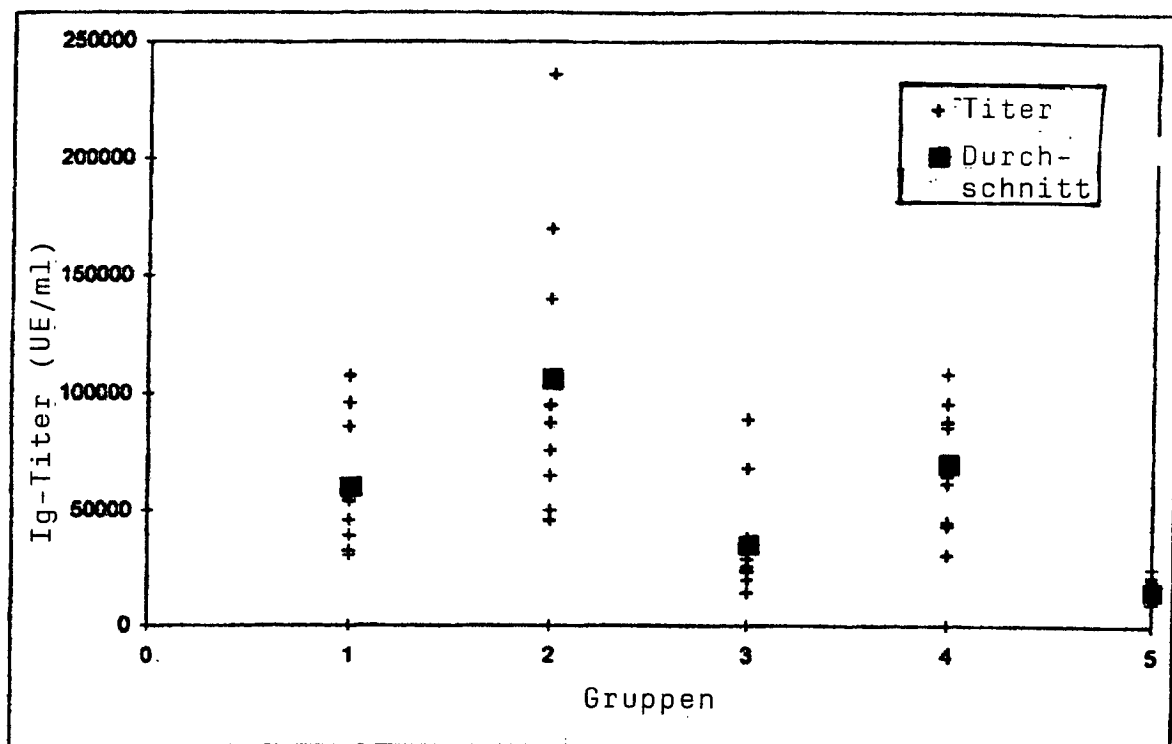
14. Verfahren zur Herstellung einer Impfstoffzusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12 beansprucht, umfassend das Mischen von (a) einer Öl-in-Wasser-Emulsion, wobei die Öltröpfchen Squalen und ein Sterin umfassen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cholesterin, β -Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin und Ergocalciferol; (b) QS21; und (c) eines Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigens oder eines Derivats davon.

15. Verwendung einer Zusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Menschen, der dafür anfällig ist, unter einer Hepatitis B-Virusinfektion zu leiden.

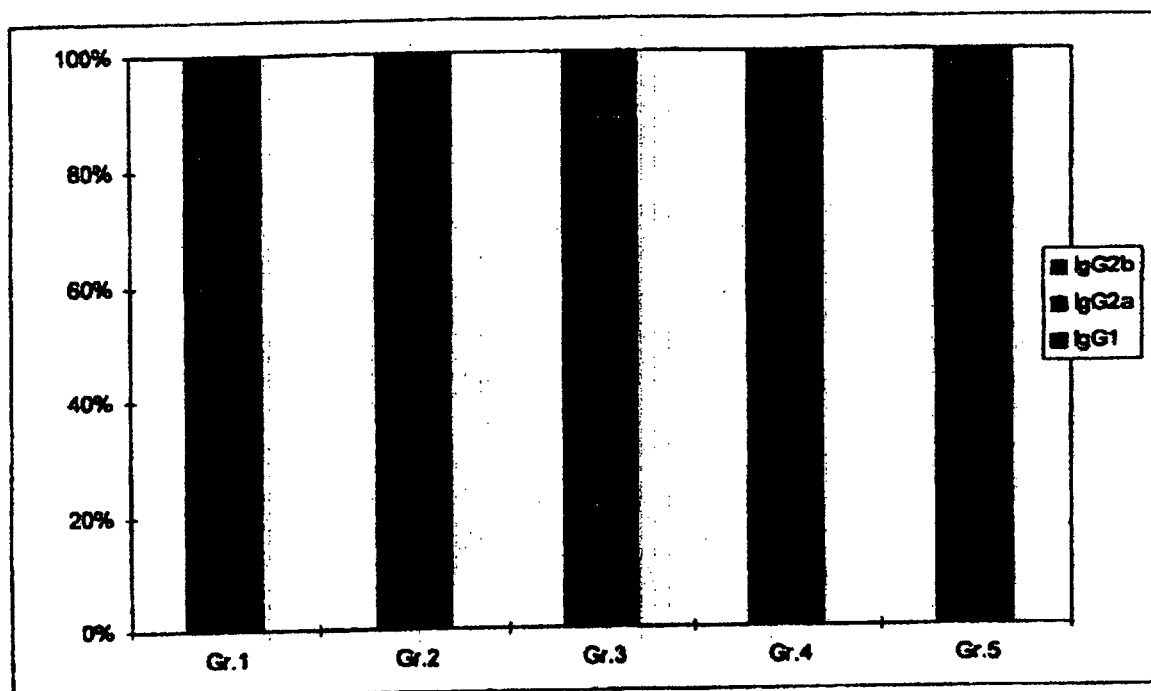
Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

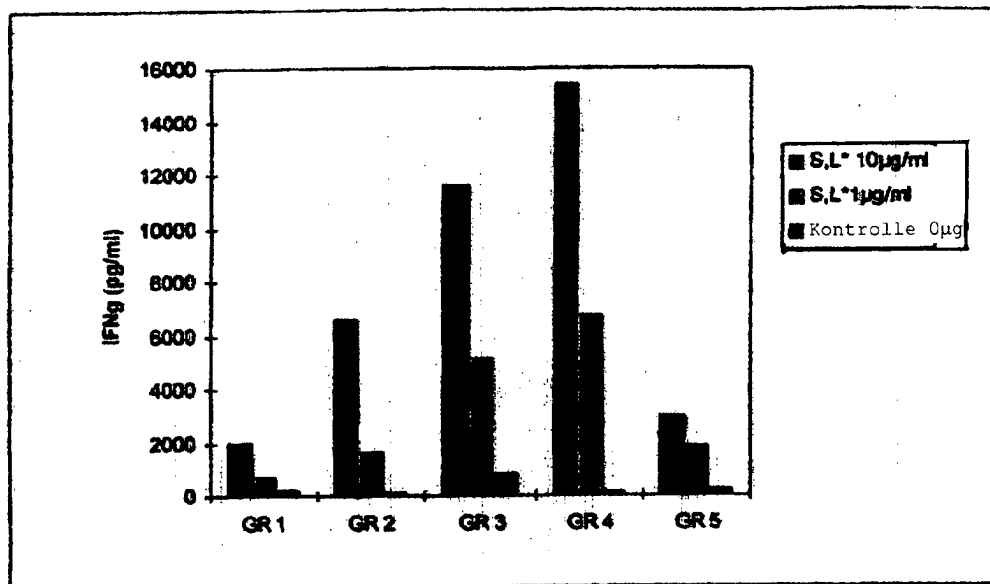
Fig **Figur 1** zeigt die Titer der Anti-Hepatitis B-Virus-Antikörperreaktionen (Ig), die sowohl als individuelle Maus-Seren und als Durchschnitt (21 Tage post II) exprimiert werden



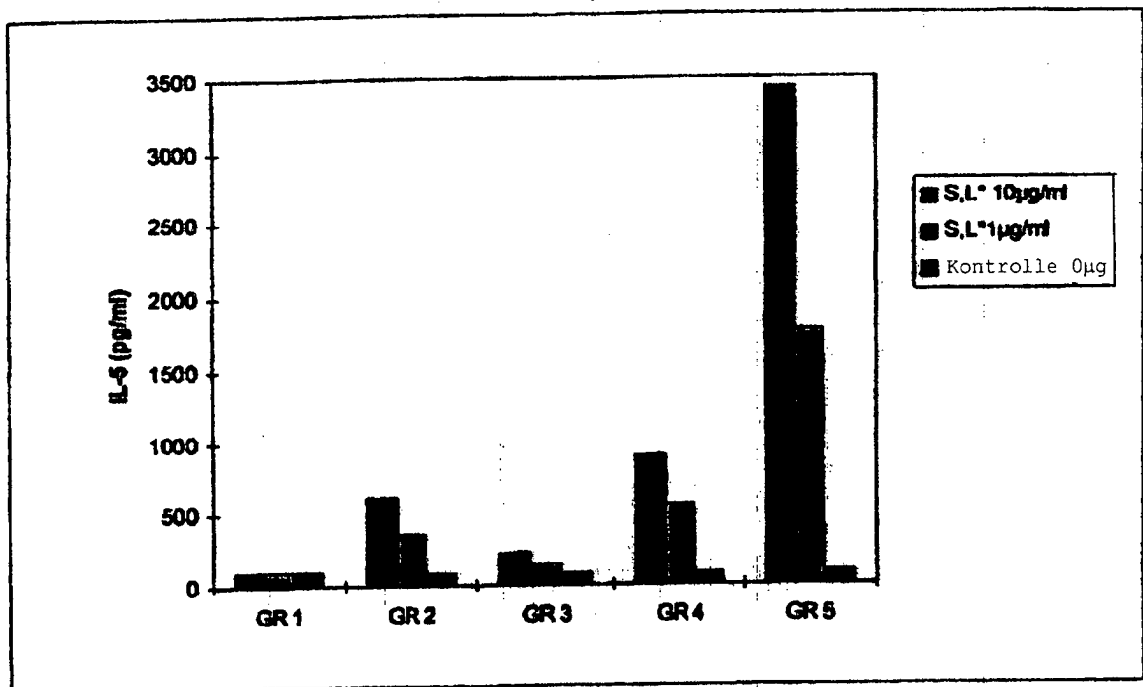
Figur 2 zeigt die Sub-Isotypenverteilung von HBs-spezifischen IgG im Serum der geimpften Mäuse



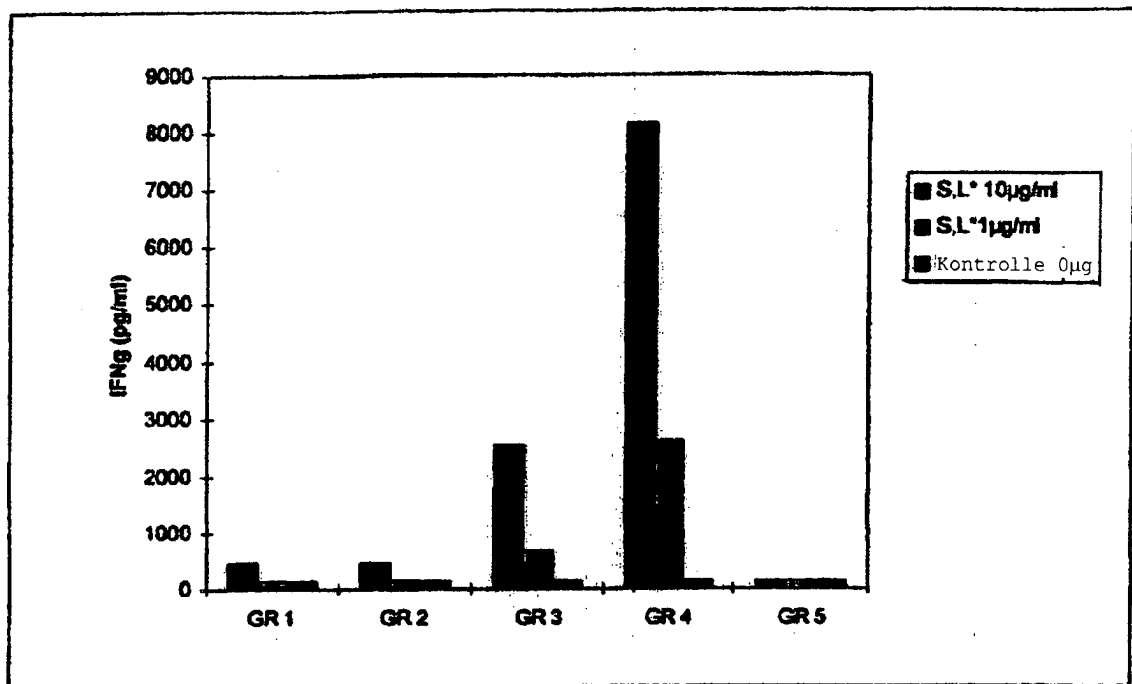
Figur 3 zeigt die Ergebnisse einer Analyse der IFN- γ -Produktion durch Milzzellen (Mittelwert der Daten, die mit drei Pools/Gruppe erzielt wurden)



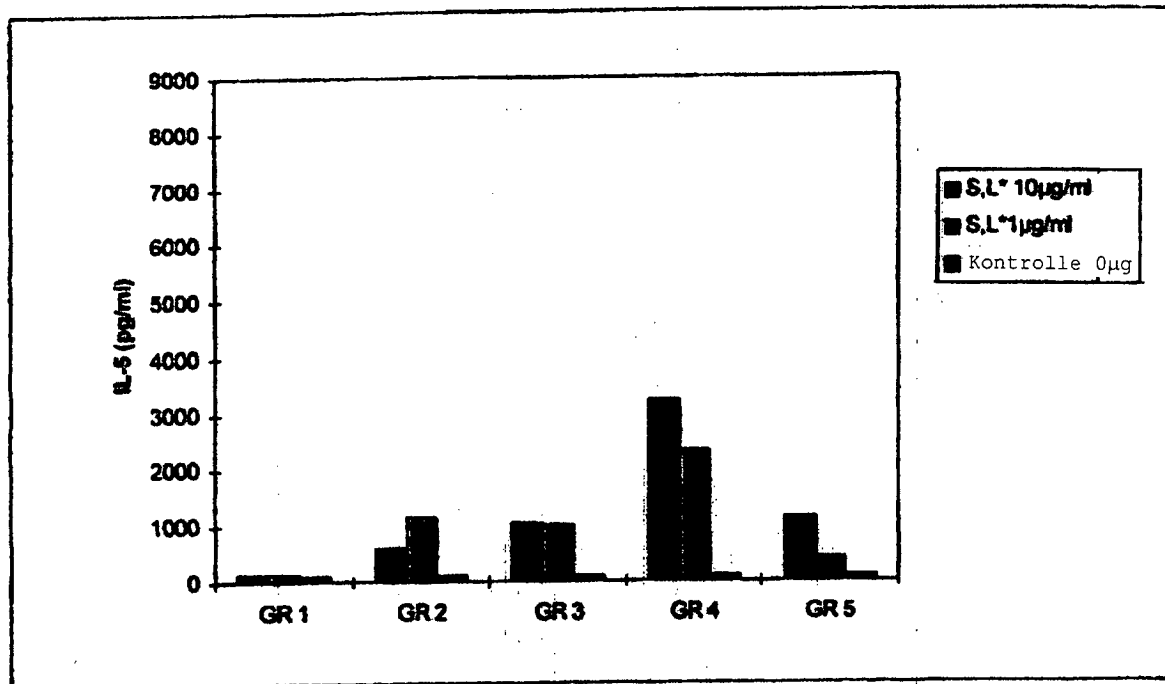
Figur 4 zeigt die Ergebnisse der Analyse der IL-5-Produktion durch Milzzellen (Mittelwert der Daten, die bei drei Pools/Gruppe erzielt wurden).



Figur 5 zeigt die Ergebnisse der Analyse der IFN- γ -Produktion durch ileale Lymphknotenzellen (Mittelwert der Daten, die mit drei Pools/Gruppe erzielt wurden).



Figur 6 zeigt die Ergebnisse der Analyse der IL-5-Produktion durch ileale Lymphknotenzellen (Mittelwert der Daten, die bei drei Pools/Gruppe erzielt wurden)



Figur 7 zeigt die CTL-Aktivität von Milz-T-Zellen, die in vitro für 7 Tage mit S,L*-Antigen stimuliert wurden (Mittelwert %-spezifische Lyse von drei Pools)

