



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 12 941 T2 2004.02.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 991 403 B1**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 9/16**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 12 941.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/01738**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 904 760.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/033487**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **06.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.02.2004**

(30) Unionspriorität:

<b>36316 P</b>	<b>30.01.1997</b>	<b>US</b>
<b>69749 P</b>	<b>16.12.1997</b>	<b>US</b>

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware),  
Emeryville, Calif., US**

(72) Erfinder:

**O'HAGAN, Derek, Emeryville, US; VAN NEST, Gary,  
Emeryville, US; OTT, S., Gary, Emeryville, US;  
BARACKMAN, John, Emeryville, US; KAZZAZ,  
Jina, Emeryville, US**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON MIKROPARTIKELN MIT ADSORBIERTEM ANTIGEN ZUR STIMULIERUNG  
DER IMMUNABWEHR**

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

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

**Beschreibung**

## Technisches Sachgebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im weiteren Sinn Impfstoffe. Im engeren Sinn betrifft die Erfindung die Verwendung von Mikropartikeln mit adsorbiertem Antigen zur Stimulierung von Immunantworten, sowie Verfahren zur Herstellung der Mikropartikel.

## Hintergrund

[0002] Viele Arzneimittel enthalten Adjuvantien, um ihre Aktivität, ihre antigene Wirkungsstärke zu steigern und um die Stabilität der Rezeptur zu erhöhen. In dieser Hinsicht enthalten Impfstoffe oft immunologische Adjuvantien, um die zellvermittelte und die humorale Immunantwort zu verstärken. Zum Beispiel werden oft Depotadjuvantien verwendet, die verabreichte Antigene adsorbieren und/oder fällen, und die dazu dienen, das Antigen an der Injektionsstelle zu halten. Typische Depotadjuvantien sind unter anderen Aluminiumverbindungen und Wasserin-Öl-Emulsionen. Obwohl sie die Antigenwirkung steigern, verursachen Depotadjuvantien jedoch oft heftige, anhaltende örtliche Reaktionen, wie etwa Granulome, Abszesse, und Vernarbungen, wenn sie subcutan oder intramuskulär injiziert werden.

[0003] Andere Adjuvantien, wie Lipopolysaccharide und Muramylpeptide können nach einer Injektion pyrogene Antworten und/oder Reiter-Symptome (influenzaartige Symptome, allgemeine Gelenkschmerzen und manchmal Uveitis der vorderen Gliedmaßen, Arthritis und Urethritis) hervorrufen.

[0004] Trotz des Vorhandenseins solcher Adjuvantien bieten konventionelle Impfstoffe oft keinen angemessenen Schutz gegen den Ziel-Erreger. In diesem Zusammenhang verdichten sich die Hinweise darauf, daß eine Impfung gegen intrazelluläre Krankheitserreger, wie eine Anzahl Viren, sowohl gegen den zellulären als auch gegen den humoralen Zweig des Immunsystems gerichtet sein sollte.

[0005] Insbesondere die cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs) spielen eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten Immunabwehr gegen intrazelluläre Krankheitserreger, wie Viren und tumorspezifische Antigene, die von bösartigen Zellen produziert werden. Die CTLs bewirken die Cytotoxizität von vireniinfizierten Zellen, indem sie virale Determinanten in Verbindung mit MHC-Molekülen der Klasse I, die die infizierten Zellen aufweisen, erkennen. Die cytoplasmatische Proteinexpression ist eine Vorbedingung für die Verarbeitung der MHCs der Klasse I und die Lieferung antigener Peptide an CTLs. Jedoch erzeugt eine Immunisierung mit abgetöteten oder abgeschwächten Viren oft nicht die CTLs, die zur Eindämmung der intrazellulären Infektion nötig wären. Weiterhin sind konventionelle Impfverfahren gegen Viren, die eine bedeutende genetische Heterogenität und/oder schnelle Mutationsraten aufweisen, die die Selektion von Varianten, die sich dem Immunsystem entziehen, wie HIV oder Influenza, erleichtern, problematisch. Dementsprechend wurden alternative Impfverfahren entwickelt.

[0006] Zur Auslösung angemessener Immunantworten wurden partikuläre Träger mit adsorbierten oder eingeschlossenen Antigenen verwendet. WO 94/15635 beschreibt die Verwendung von partikulären Trägern zur Induzierung von CTL-Antworten, wobei die Antigene kovalent oder nichtkovalent an Partikel wie Eisenoxid, Silica und Polystyrol gebunden sind. Partikuläre Träger liefern dem Immunsystem mehrere Kopien eines ausgewählten Antigens und fördern den Einschluß und das Zurückbehalten von Antigenen in örtlichen Lymphknoten. Die Partikel können durch Makrophagen phagocytiert werden und können die Antigenüberbringung durch Cytokinabgabe erhöhen. Beispiele für partikuläre Träger sind unter anderen jene, die aus Polymethylmethacrylat-Polymeren abgeleitet sind, ebenso jene Mikropartikel, die aus den als PLG bekannten Poly(Lactiden) und Poly(Lactid-co-Glykoliden) abgeleitet sind. Polymethylmethacrylat-Polymere sind nicht abbaubar, während PLG-Partikel durch zufällige nichtenzymatische Hydrolyse von Esterbindungen biologisch in Milchsäuren und Glykolsäuren abgebaut werden, die über die normalen Stoffwechselwege ausgeschieden werden.

[0007] Neuere Studien haben gezeigt, daß PLG-Mikropartikel mit eingeschlossenen Antigenen dazu in der Lage sind, die zellseitige Immunität auszulösen. Es wurde zum Beispiel gezeigt, daß mikroverkapseltes gp120 des HIV (Human Immunodeficiency Virus) in Mäusen HIV-spezifische CD4+- und CD8+-T-Zellen-Antworten induziert (Moore et al., Vaccine (1995), 13: 1741-1749). Darüberhinaus wurden in Mäusen, die mit einem in PLG eingeschlossenem Mycobacterium tuberculosis-Antigen geimpft wurden, sowohl Antikörper- als auch T-Zellen-Antworten induziert (Vordermeier et al., Vaccine (1995), 13: 1576-1582).

[0008] Obwohl sie anderen, stärker toxischen Systemen gegenüber wesentliche Vorteile aufweisen, haben die in Antigene eingeschlossenen PLG-Mikropartikel auch einige Nachteile. Zum Beispiel ist die Herstellung von Mikropartikeln schwierig und bedingt den Einsatz aggressiver Chemikalien, die das Antigen denaturieren und seine Immunogenität zerstören können. Weiterhin kann Antigeninstabilität auch aufgrund der hohen Scherkräfte, die zur Herstellung von kleinen Mikropartikeln angewandt werden, und aufgrund von Schnittstelleneffekten innerhalb der verwendeten Emulsionen auftreten.

[0009] Die Verwendung von an Mikropartikeln adsorbierten Antigenen vermeidet diese Unzulänglichkeiten.

WO97/02810 beschreibt Zusammensetzungen, in denen ein aktives Agens, etwa ein Virus, an lamellenartige Partikel adsorbiert wird, die ein biologisch abbaubares Polymer enthalten, das wenigstens teilweise kristallin ist. Jedoch waren die Berichte über die Immunogenität von Mikropartikeln mit adsorbierten Antigenen gemischt. Tatsächlich haben die Versuchsaufsteller postuliert, daß Antigene in Mikropartikeln eingeschlossen sein müssen, um eine angemessene Adjuvanswirkung zu erreichen. Vgl. zum Beispiel Eldridge et al., *Infect. Immun.* (1991) 59: 2978–2986; Eldridge et al., *Seminars in Hematology* (1993) 30: 16–25; Nakaoka et al., *J. Controlled Release* (1995) 37: 215–224; Sah et al., *J. Controlled Release* (1995) 35: 137–144; und Duncan et al., „Poly(lactide-co-glycolide) Microencapsulation of Vaccines for Mucosal Immunization“ in *Mucosal Vaccines* (Academic Press, Inc., 1996).

[0010] Im einzelnen wurde gezeigt, daß in Mikropartikeln verkapseltes oder daran adsorbiertes Ovalbumin die zellseitige Immunantwort *in vivo* startet und bei oraler Verabreichung IgA-Antworten der Schleimhäute induziert. Jedoch induzierte eingeschlossenes Antigen eine stärkere Antwort als adsorbiertes Antigen (O'Hagan et al., *Vaccine* (1993) 11: 149–154). Coombes et al., *Vaccine* (1996) 14: 1429–1438 beschreibt auch Versuche sowohl mit ovalbuminverkapselten als auch mit ovalbuminadsorbierten Mikropartikeln. Die Antikörperantworten gegen das adsorbierte Antigen waren signifikant geringer als jene, die durch die Verabreichung von eingeschlossenem Ovalbumin ausgelöst wurden. Schließlich wurde von antigenspezifischen CTL-Antworten bei Mäusen berichtet, die ein kurzes synthetisches Peptid aus dem Circumsporozoitenprotein von *Plasmodium berghei* verwenden, das in biologisch abbaubaren Mikrosphären mikroverkapselt oder an leere Mikrosphären adsorbiert war (Men et al., *Vaccine* (1997) 15: 1405–1312).

[0011] WO94/28879 beschreibt eine Zusammensetzung für orale Verabreichung, die ein biologisch aktives Material wie ein Antigen, einen Antikörper gegen dieses Material und eine Menge Polymerkügelchen umfaßt.

[0012] Jedoch beschreibt keine der vorstehend genannten Studien die Verwendung antigenadsorbierter Mikropartikel, und zwar unter Verwendung viraler Antigene, um die zellvermittelte Immunantwort zu stimulieren. Dementsprechend besteht auch weiterhin ein Bedarf an effektiven und sicheren Adjuvantien zur Verwendung in verschiedenen Arzneimitteln und Impfungen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Die Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, daß die Adsorption ausgewählter viraler Antigene an aus einer Poly( $\alpha$ -Hydroxysäure) abgeleitete Mikropartikel bessere Immunantworten liefert. Dementsprechend erstreckt sich die Erfindung primär auf Verfahren und Zusammensetzungen, die solche Mikropartikel beinhalten, und auf Herstellungsverfahren für diese. Die Verwendung von Mikropartikeln mit adsorbierten Antigenen stellt einen sicheren und wirkungsvollen Weg zur Erhöhung der Immunogenität einer großen Vielzahl von Antigenen dar.

[0014] Die Erfindung ist in den Patentansprüchen definiert.

[0015] In besonders bevorzugten Ausführungsformen sind die vorstehend erwähnten Mikropartikel aus Poly(D,L-lactid-co-glykolid) gebildet.

[0016] In Anbetracht dieser Offenbarungen werden sich diese und andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dem Durchschnittsfachmann leicht erschließen.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0017] Die Ausübung der vorliegenden Erfindung verwendet, wo dies nicht anders angegeben ist, konventionelle Verfahren der Chemie, Biochemie, Molekularbiologie, Immunologie und Pharmakologie, die innerhalb dessen liegen, was auf dem Fachgebiet üblich ist. Solche Verfahren werden ausführlich in der Literatur erläutert. Vgl. zum Beispiel Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18. Auflage (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); *Methods In Enzymology* (Hrsg. S. Colowick und N. Kaplan, Academic Press, Inc.); und *Handbook of Experimental Immunology*, Bde. I–IV (Hrsg. D. M. Weir und C. C. Blackwell, 1986, Blackwell Scientific Publications); und Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Auflage, 1989).

[0018] Im Sprachgebrauch dieser Beschreibung und der Patentansprüche im Anhang schließen die Singularformen „ein“, „eine“ und „der“ jeweils auch die Pluralbezüge ein, sofern der Inhalt nicht deutlich das Gegenteil diktiert.

#### A. Definitionen

[0019] Bei der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe verwendet und sollen dazu wie nachstehend angegeben definiert sein: Der Begriff „Mikropartikel“ bedeutet im Zusammenhang dieser Arbeit ein Partikel von etwa 100 nm bis etwa 150  $\mu$ m Durchmesser, stärker bevorzugt etwa 200 nm bis etwa 30  $\mu$ m Durchmesser, und besonders bevorzugt etwa 500 nm bis etwa 10  $\mu$ m Durchmesser. Das Mikropartikel wird vorzugsweise von einem Durchmesser sein, der eine parenterale Verabreichung ohne Okklusion von Na-

deln und Kapillaren erlaubt. Die Größe der Mikropartikel kann leicht mit Verfahren bestimmt werden, die auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, wie Photonenkorrelations-Spektroskopie, Laser-Diffraktometrie und/oder abtastende Elektronenmikroskopie.

[0020] Die Mikropartikel zur Verwendung im Rahmen dieser Erfindung werden aus Materialien bestehen, die sterilisierbar, ungiftig und biologisch abbaubar sind. Solche Materialien sind, unter anderen Poly(a-Hydroxysäure), Polyhydroxybuttersäure, Polycaprolacton, Polyorthoester, Polyanhydrid; sie sind jedoch nicht nur auf diese beschränkt.

[0021] Vorzugsweise sind Mikropartikel zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung aus einer Poly(a-Hydroxysäure) abgeleitet, besonders aus einem Poly(Lactid) („PLA“) oder einem Copolymer aus D, L-Lactid und Glykolid oder Glykolsäure, wie ein Poly(D, L-lactid-co-glykolid) („PLG“ oder „PLGA“), oder einem Copolymer aus D, L-Lactid und Caprolacton. Die Mikropartikel können aus jedem beliebigen von verschiedenen polymeren Startmaterialien, die verschiedene Molekulargewichte und im Fall der Copolymere wie PLG verschiedene Lactid : Glykolid-Verhältnisse haben, abgeleitet sein; die Auswahl kann großteils nach Belieben erfolgen, und hängt teilweise vom gleichzeitig verabreichten Antigen ab. Diese Parameter werden nachstehend ausführlicher erörtert.

[0022] Unter „Antigen“ wird ein Molekül verstanden, das ein oder mehrere Epitope enthält, die das Immunsystem eines Wirtes bei Vorliegen des Antigens zu einer zellulären antigenspezifischen Immunantwort oder einer humoralen Antikörperantwort stimulieren. Normalerweise enthält ein Epitop zwischen etwa 3 bis 15, im allgemeinen 5 bis 15 Aminosäuren.

[0023] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung können Antigene aus jedem beliebigen von mehreren bekannten Viren abgeleitet sein.

[0024] Weiterhin bezeichnet für die Zwecke der vorliegenden Erfindung „Antigen“ ein Protein, das Modifikationen gegenüber der nativen Sequenz wie Deletionen, Additionen und Substitutionen (im allgemeinen solche konservativer Art) einschließt, solange das Protein die Fähigkeit zu einer Immunantwort beibehält. Diese Modifikationen können beabsichtigt sein, wie durch stellengerichtete Mutagenese, oder sie können zufällig sein, wie durch Mutationen von Wirten, die die Antigene erzeugen.

[0025] Eine „Immunantwort“ auf ein Antigen oder eine Zusammensetzung ist die Entwicklung einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort in einer Person auf Moleküle in dieser Zusammensetzung von Interesse. Für Zwecke der vorliegenden Erfindung bezeichnet eine „humorale Immunantwort“ eine Immunantwort, die durch Antikörpermoleküle erfolgt, während eine „zelluläre Immunantwort“ eine solche durch T-Lymphocyten und/oder andere weiße Blutkörperchen ist. Ein wichtiger Aspekt der Zellimmunität betrifft eine antigenspezifische Antwort durch cytolytische T-Zellen („CTLs“). CTLs haben eine Spezifität für Peptidantigene, die in Verbindung mit Proteinen, die durch die Haupt-Histokompatibilitätskomplexe (MHC) codiert werden, überbracht und auf den Zelloberflächen exprimiert werden. CTLs helfen dabei, die intrazelluläre Zerstörung intrazellulärer Mikroben oder die Lyse von mit solchen Mikroben infizierten Zellen zu induzieren und voranzutreiben. Ein anderer Aspekt der zellulären Immunität betrifft eine antigenspezifische Antwort durch Helfer-T-Zellen. Helfer-T-Zellen wirken, indem sie die Funktion nichtspezifischer Effektorzellen gegen Zellen stimulieren, die mit MHC-Molekülen assoziierte Peptidantigene auf ihrer Oberfläche aufweisen, und indem sie deren Aktivität auf diese fokussieren. Eine „zelluläre Immunantwort“ bezieht sich auch auf die Produktion von Cytokinen, Chemokinen und anderen solchen Molekülen, die von aktivierten T-Zellen und/oder anderen weißen Blutkörperchen, darunter auch jenen, die aus CD4+- und CD8+-T-Zellen abgeleitet sind.

[0026] Eine Zusammensetzung oder ein Impfstoff, der eine zellseitige Immunantwort auslöst, kann dazu dienen, ein Wirbeltier durch das Überbringen von Antigen in Verbindung mit MHC-Molekülen an der Zelloberfläche zu sensibilisieren.

[0027] Die zellvermittelte Immunantwort findet an oder bei Zellen, die auf ihrer Oberfläche ein Antigen aufweisen, statt. Zusätzlich können antigenspezifische T-Lymphocyten erzeugt werden, die fortan den Schutz eines immunisierten Wirtes ermöglichen.

[0028] Die Fähigkeit eines bestimmten Antigens oder einer Zusammensetzung, die zellvermittelte Immunantwort zu stimulieren, kann mit einer Anzahl von Tests bestimmt werden, etwa durch Lymphoproliferations- (Lymphocytenaktivierungs)-tests, cytotoxische CTL-Zelltests, oder durch Test auf T-Lymphocyten, die für das Antigen in einer sensitivisierten Person spezifisch sind. Solche Tests sind auf dem Fachgebiet allgemein bekannt. Vgl. zum Beispiel Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151: 4189–4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369–2376; und die nachstehenden Beispiele.

[0029] Somit kann eine Immunantwort, wie im Zusammenhang dieser Arbeit gebraucht, eine solche sein, die die Produktion von CTLs und/oder die Produktion oder Aktivierung von Helfer-T-Zellen stimuliert. Das Antigen von Interesse kann auch eine antikörperseitige Immunantwort auslösen. Folglich kann eine Immunantwort eine oder mehrere der folgenden Effekte beinhalten: die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen; und/oder die Aktivierung von Suppressor-T-Zellen und/oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die spezifisch gegen ein Antigen oder gegen Antigene, die in der Zusammensetzung oder Impfung von Interesse vorhanden sind, gerichtet sind. Diese Antworten können dazu dienen, Infektivität zu neutralisieren und/oder Antikörper-Komplement- oder antikörperab-

hängige Zellcytotoxizität (ADCC) zu bewirken, um einem immunisierten Wirt Schutz zu verleihen. Solche Antworten können mit Standard-Immuntests und -Neutralisierungstests, die auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, festgestellt werden.

[0030] Ein Impfstoff, der ein an Mikropartikel adsorbiertes ausgewähltes Antigen enthält, weist „erhöhte Immunogenität“ auf, wenn die von ihm ausgelöste Immunantwort stärker ist als jene, die von der gleichen Menge des nicht in Verbindung mit den Mikropartikeln verabreichten Antigens ausgelöst wird. Somit kann ein Impfstoff eine „erhöhte Immunogenität“ aufweisen, weil das Antigen aufgrund seiner Adsorption an die Mikropartikel stärker immunogen ist, oder weil nur eine geringere Antigendosis erforderlich ist, um in der Person, der sie verabreicht wird, eine Immunantwort zu erreichen. Eine solche erhöhte Immunogenität kann festgestellt werden, indem die Mikropartikel/Antigen-Zusammensetzung und Antigen-Kontrollen Versuchstieren verabreicht und die Antikörpertiter gegen beide verglichen werden; dies kann mit Standardtests wie Radioimmuntest und ELISAs geschehen, die auf dem Fachgebiet allgemein bekannt sind.

[0031] Die Begriffe „wirksame Menge“ oder „pharmazeutisch wirksame Menge“ eines Antigens/Mikropartikel, wie im Zusammenhang dieser Arbeit verwendet, bezeichnen eine ungiftige, aber ausreichende Menge des Antigens/Mikropartikel, um die gewünschte immunologische Antwort und die entsprechende therapeutische Wirkung zu liefern. Wie nachstehend gezeigt wird, variiert die jeweils erforderliche genaue Menge von Individuum zu Individuum, je nach Art, Alter und Gesamtzustand des Individuums, der Schwere des zu behandelnden Zustandes und dem besonderen Antigen von Interesse, der Verabreichungsweise und ähnlichen. Eine geeignete „wirksame“ Menge kann in jedem individuellen Fall von einem Durchschnittsfachmann durch Routineversuche ermittelt werden.

[0032] Mit „Wirbeltier“ ist jeder beliebige Angehörige des Unterstammes Chordata gemeint, darunter ohne Einschränkung Säugetiere, wie Rinder, Schafe, Schweine, Ziegen, Pferde und Menschen; Haustiere, wie Hunde und Katzen; sowie Vögel, darunter Hausgeflügel, Wildvögel und jagdbare Vögel, wie Hähne und Hühner, einschließlich Küken, Truthähne und andere Hühnervögel. Der Begriff bezieht sich nicht auf ein bestimmtes Alter. Er erstreckt sich somit gleichermaßen auf adulte wie auf neugeborene Tiere.

[0033] Unter „pharmazeutisch verträglich“ oder „pharmakologisch verträglich“ wird ein Stoff verstanden, der nicht biologisch oder sonstwie unerwünscht ist, d. h. der Stoff kann zusammen mit der Mikropartikelzubereitung einem Individuum verabreicht werden, ohne daß er irgendwelche unerwünschte biologische Wirkungen verursacht, oder daß er in zerstörerischer Weise mit einem beliebigen Bestandteil der Zusammensetzung, in der er enthalten ist, wechselwirken würde.

[0034] Unter „physiologischem pH-Wert“ oder „pH-Wert im physiologischen Bereich“ wird ein pH-Wert im Bereich von etwa 7.2 bis einschließlich 8.0, noch typischer im Bereich von etwa 7.2 bis einschließlich 7.6 verstanden.

[0035] Wie im Zusammenhang dieser Arbeit verwendet, bezeichnet „Behandlung“ eine beliebige der folgenden Definitionen: (1.) das Vorbeugen einer Infektion oder Reinfektion, wie bei der traditionellen Impfung, (2.) das Lindern oder Ausschalten von Symptomen, und (3.) die wesentliche oder vollständige Eliminierung des fraglichen Krankheitserregers. Die Behandlung kann prophylaktisch (vor der Infektion) oder therapeutisch (nach der Infektion) erfolgen.

## B. Allgemeine Verfahren

[0036] Der zentrale Punkt der vorliegenden Erfindung ist die Entdeckung, daß PLA- und PLG-Mikropartikel mit adsorbierten viralen Antigenen in einem Wirbeltier eine zellvermittelte Immunantwort erzeugen können. Die Fähigkeit des Antigens/Mikropartikel der vorliegenden Erfindung zur Auslösung einer zellvermittelten Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen bildet eine starke Waffe gegen Infektionen durch eine Vielzahl von Viren. Das Antigen/Mikropartikel der vorliegenden Erfindung kann in Impfstoffe einbezogen werden. Darüber hinaus können die Adjuvanzzubereitungen der Erfindung benützt werden, um die Aktivität von in vivo erzeugten Antigenen zu erhöhen, d. h. in Verbindung mit DNA-Immunisierung.

[0037] Obwohl die einzelnen Bestandteile der Impfstoffe und die in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren bereits bekannt waren, kam es unerwartet und überraschend, daß solche Kombinationen starke zellvermittelte Immunantworten erzeugen, die über dem Niveau liegen, das bei separater Anwendung der Bestandteile erreicht wird. So kann das hier beschriebene System zusätzlich zu einer konventionellen Antikörperantwort z. B. auch die Assoziierung der exprimierten Antigene mit MHC-Molekülen Klasse 1 bewirken, so daß eine zellvermittelte Immunantwort auf das Antigen von Interesse in vivo ausgelöst werden kann, die die Produktion von CTLs stimuliert, um eine spätere Erkennung des Antigens zu ermöglichen. Weiterhin können die Verfahren eine antigenspezifische Antwort durch Helfer-T-Zellen auslösen. Dementsprechend werden die Verfahren der vorliegenden Erfindung mit einem beliebigen Antigen Verwendung finden, für das zellvermittelte und/oder humorale Immunantworten erwünscht sind, darunter auch Antigene, die aus viralen Krankheitserregern, die Antikörper induzieren können, abgeleitet sind, T-Zell-Helferepitopen und cytotoxischen T-Zell-Epitopen. Solche Antigene beinhalten unter anderen jene, die von menschlichen und tierischen Viren codiert werden, und sie können

entweder strukturellen oder nichtstrukturellen Proteinen entsprechen.

[0038] Das Verfahren ist zur Immunisierung gegen intrazelluläre Viren, die normalerweise eine schwache Immunantwort auslösen, besonders nützlich. Zum Beispiel wird die vorliegende Erfindung Anwendung finden, um eine Immunantwort gegen eine Vielzahl von Proteinen der Familie der Herpesviren auszulösen, darunter Proteinen, die aus Herpes Simplex-Viren (HSV) der Typen 1 und 2 abgeleitet sind, wie die HSV-1- und HSV-2-Glykoproteine gB, gD und gH; Antigene, die aus Varicella Zoster-Viren (VZV), Epstein-Barr-Viren (EBV) und Cytomegalieviren (CMV) abgeleitet sind, darunter CMV gB und gH; und Antigene, die aus anderen menschlichen Herpesviren, wie HHV6 und HHV7 abgeleitet sind. (Vgl. z. B. Chee et al., Cytomegaloviren (Hrsg. J. K. McDougall, Springer-Verlag 1990) S. 125–169, zu einer Besprechung des Proteincodierungsgehaltes des Cytomegalievirus; McGeoch et al., J. Gen. Virol. (1988) 69: 1531–1574, zu einer Diskussion der verschiedenen HSV-1-codierten Proteine; U.S. Patent Nr. 5,171,568 zu einer Diskussion der gB- und gD-Proteine von HSV-1 und HSV-2 und die diese codierenden Gene; Baer et al., Nature (1984) 310: 207–211, zur Bestimmung von Proteincodierungssequenzen in einem EBV-Genom; und Davison und Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67: 1759–1816, zu einer Besprechung von VZV.) Antigene aus der Familie der Hepatitisviren, darunter das Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), das Hepatitis-Delta-Virus (HDV), das Hepatitis-E-Virus (HEV) und das Hepatitis-G-Virus (HGV), können ebenfalls bequem in den hier beschriebenen Verfahren verwendet werden. Beispielsweise ist die virale Genomsequenz von HCV bekannt, ebenso die Verfahren zur Feststellung der Sequenz. Vgl. z. B. die internationalen Veröffentlichungen Nr. WO 89/04669; WO 90/11089; und WO 90/14436. Das HCV-Genom codiert mehrere virale Proteine, darunter E1 (auch als E bekannt) und E2 (auch als E E2/NSI bekannt) und ein N-terminales Nucleocapsidprotein („core“ genannt) (vgl. Houghton et al., Hepatology (1991) 14: 381–388, zu einer Diskussion von HCV-Proteinen, darunter E1 und E2). Jedes dieser Proteine, wie auch antigene Fragmente davon, werden in den vorliegenden Verfahren Anwendung finden.

[0039] Ähnlicherweise ist auch die Sequenz des  $\delta$ -Antigens von HDV bekannt (vgl. z. B. U. S. Patent Nr. 5,378,814), und auch dieses Antigen kann in den vorliegenden Verfahren bequem verwendet werden. Weiterhin werden in den vorliegenden Verfahren von HBV abgeleitete Antigene Anwendung finden, wie das Core-Antigen, das Oberflächenantigen sAg, ebenso wie die Prä-Oberflächensequenzen pre-S1 und pre-S2 (früher pre-S genannt), ebenso wie Kombinationen davon, wie sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2, und pre-S1/pre-S2. Vgl. z. B. „HBV Vaccines – from the laboratory to license: a case study“ in Mackett, M. und Williamson, J. D., Human Vaccines and Vaccination, S. 159–176, zu einer Diskussion der HBV-Struktur; und die U.S. Patente Nr. 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513; Beames et al., J. Virol. (1995) 69: 6833–6838, Birnbaum et al., J. Virol., (1990) 64: 3319–3330; und Zhou et al., J. Virol. (1991) 65: 5457–5464.

[0040] Aus anderen Viren abgeleitete Antigene werden in den beanspruchten Verfahren ebenfalls Anwendung finden, wie, ohne Einschränkung, Proteine von Mitgliedern der Familien Picornaviridae (z. B. Polioviren usw.); Caliciviridae; Togaviridae (z. B. Rubella-Virus, Dengue-Virus, usw.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (z. B.

[0041] Tollwutvirus usw.); Filoviridae; Paramyxoviridae (z. B. Mumpsvirus, Masernvirus, Respiratorisches Syncytialvirus usw.); Orthomyxoviridae (z. B. Influenzaviren Typen A, B und C usw.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (z. B. HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (auch als HTLV-III, LAV, ARV, hTLR usw. bekannt), einschließlich von Antigenen aus den Isolaten HIV<sub>IIIb</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>LAI</sub>, HIV<sub>MN</sub>, jedoch nicht nur aus diesen); HIV-1<sub>CM235</sub>; HIV-1<sub>US4</sub>; HIV-2; Simian-Immunschwächevirus (SIV) und andere.

[0042] Weiterhin können Antigene auch aus menschlichen Papillomviren (HPV) und den von Zecken übertragenen Encephalitisviren abgeleitet sein. Vgl. z. B. Virology, 3. Auflage (Hrsg. W. K. Joklik 1988); Fundamental Virology, 2. Auflage (Hrsg. B. N. Fields und D. M. Knipe, 1991), zu einer Beschreibung dieser und anderer Viren.

[0043] Insbesondere ist das gp20-Hüllprotein eines beliebigen der vorstehend genannten HIV-Isolate, einschließlich jenes von Angehörigen der verschiedenen genetischen Subtypen von HIV bekannt und beschrieben (vgl. z. B. Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers et al., Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; und Modrow et al., J. Virol. (1987) 61: 570–578, zu einem Vergleich der Hüllsequenzen verschiedener HIV-Isolate), und in den vorliegenden Verfahren werden Antigene, die aus einem beliebigen dieser Isolate abgeleitet sind, Anwendung finden. Darüberhinaus ist die Erfindung gleichermaßen auf andere immunogene Proteine, die aus einem beliebigen HIV-Isolat abgeleitet wurden, anwendbar, auch auf ein beliebiges Hüllprotein wie gp160 und gp41, auf gag-Antigene wie p24gag und p55gag, ebenso wie auf aus der pol-Region abgeleitete Proteine.

[0044] Wie vorstehend erläutert, ist das Influenzavirus ein weiteres Beispiel eines Virus, für das die vorliegende Erfindung besonders nützlich ist. Speziell die Hüllglykoproteine HA und NA von Influenza A sind zur Auslösung einer Immunantwort von besonderem Interesse. Es wurden zahlreiche HA-Subtypen von Influenza A identifiziert (Kawaoka et al., Virology (1990) 179: 759–767; Webster et al., „Antigenic Variation among type A influenza viruses“, S. 127–168. In: P. Palese und D. W. Kingsbury (Hrsg.), Genetics of influenza viruses. Sprin-

ger-Verlag, New York). Somit können auch Proteine, die von einem beliebigen dieser Isolate abgeleitet sind, in den hier beschriebenen Immunisierungsverfahren verwendet werden.

[0045] Es liegt auf der Hand, daß die vorliegende Erfindung zur Auslösung einer Immunantwort gegen viele verschiedene Antigene und somit zur Behandlung von oder Vorbeugung gegen eine große Zahl von Krankheiten benützt werden kann.

[0046] Das ausgewählte Antigen wird zur anschließenden Abgabe an Mikropartikel adsorbiert. Biologisch abbaubare Polymere zur Herstellung von Mikropartikeln zur Anwendung in der vorliegenden Erfindung sind im Handel zum Beispiel von Boehringer Ingelheim, Deutschland und Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL erhältlich. Zur Bildung der Mikropartikel nutzbare Polymere sind zum Beispiel unter anderen die aus Polyhydroxybuttersäure abgeleiteten; Polycaprolacton; Polyorthoester; Polyanhydrid; ebenso wie eine Poly( $\alpha$ -Hydroxysäure), wie Poly(L-lactid), Poly(D, L-lactid) (hier beide als „PLA“ bezeichnet), Poly(Hydroxybutyrat), Copolymere von D, L-Lactid und -Glykolid, wie Poly(D, L-lactid-co-Glykolid) (hier als „PLG“ oder „PLGA“ bezeichnet) oder ein Copolymer von D, L-Lactid und Caprolacton. Zur Verwendung hierin besonders bevorzugte Polymere sind PLA- und PLG-Polymere. Diese Polymere sind in vielen Molekulargewichten erhältlich, und das für ein gegebenes Antigen geeignete Molekulargewicht läßt sich von einem Fachmann leicht bestimmen. So zum Beispiel liegt das geeignete Molekulargewicht für PLA in der Größenordnung von etwa 2000 bis 5000. Für PLG rangieren die geeigneten Molekulargewichte im allgemeinen von etwa 10.000 bis 200.000, vorzugsweise von etwa 15.000 bis etwa 150.000, und besonders bevorzugt von etwa 50.000 bis etwa 100.000.

[0047] Wird ein Copolymer, wie PLG, zur Bildung der Mikropartikel verwendet, können dabei verschiedene Lactid : Glykolid-Verhältnisse Anwendung finden, wobei das Verhältnis grobenteils eine Sache der Auswahl ist und teilweise vom gleichzeitig verabreichten Antigen und der gewünschten Degradationsrate abhängt. Beispielsweise liefert ein 50 : 50 PLG-Polymer, das 50% D, L-Lactid und 50% Glykolid enthält, ein schnell resorbierendes Copolymer, während 75 : 25 PLG langsamer degradiert, und 85 : 15 und 90 : 10 wegen des erhöhten Lactidanteils noch langsamer. Es liegt auf der Hand, daß ein geeignetes Lactid : Glykolid-Verhältnis sich je nach der Art des Antigens und der fraglichen Krankheit vom Fachmann leicht bestimmen läßt. Darüberhinaus werden auch Gemischen von Mikropartikeln mit variierenden Lactid Glykolid-Verhältnissen in Rezepturen Anwendung finden, um die gewünschte Abgabekinetik für ein gegebenes Antigen zu erreichen und sowohl eine primäre als auch eine sekundäre Immunantwort zu veranlassen. Die Degradationsrate der Mikropartikel der vorliegenden Erfindung kann auch über Faktoren wie Molekulargewicht und Kristallinität des Polymers gesteuert werden. PLG-Copolymere mit variierenden Lactid : Glykolid-Verhältnissen und Molekulargewichten sind im Handel von einer Anzahl Hersteller erhältlich, darunter Boehringer Ingelheim, Deutschland und Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Diese Polymere lassen sich auch durch einfache Polykondensation der Milchsäurekomponente mit den in Tabata et al., J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22: 837–858 beschriebenen, auf dem Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren synthetisieren.

[0048] Die Antigen-enthaltenden Mikropartikel werden mit einer beliebigen von mehreren auf dem Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren hergestellt. Beispielsweise können doppelte Emulsions-/Lösungsmittelverdampfungsverfahren, wie sie in U.S. Patent Nr. 3.523.907 und Ogawa et al., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36: 1095–1103 beschrieben sind, hierin zur Herstellung der Mikropartikel verwendet werden. Diese Verfahren beinhalten die Bildung einer primären, aus Tröpfchen von Polymerlösung bestehenden Emulsion, die anschließend mit einer kontinuierlichen wässrigen Phase, die einen Partikelstabilisator/Tensid enthält, vermischt wird.

[0049] Insbesondere kann ein Wasser-in-Öl-in-Wasser (w/o/w) Lösungsmittelverdampfungssystem zur Bildung der Mikropartikel verwendet werden, wie es von O'Hagan et al., Vaccine (1993) 11: 965–969 und Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10: 362 beschrieben wurde. Bei diesem Verfahren wird das jeweilige Polymer mit einem organischen Lösungsmittel kombiniert, wie etwa Ethylacetat, Dimethylchlorid (auch Methylenchlorid und Dichlormethan genannt), Acetonitril, Aceton, Chloroform, und ähnliche. Das Polymer wird in einer 2–15%-igen, vorzugsweise 4–10%-igen, und besonders bevorzugt einer 6%-igen Lösung in organischem Lösungsmittel bereitgestellt. Die Polymerlösung wird zum Beispiel mit einem Homogenisator emulgiert. Dann wird die Emulsion mit einem größeren Volumen einer wässrigen Lösung eines Emulsionsstabilisators wie Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyvinylpyrrolidon emulgiert. Der Emulsionsstabilisator wird typischerweise in einer 2–15%-igen, noch typischer in einer 4–10%-igen Lösung bereitgestellt. Dann wird das Gemisch homogenisiert und ergibt eine stabile w/o/w-Doppelemulsion. Schließlich werden die organischen Lösungsmittel verdampft.

[0050] Die Parameter der Zubereitung können verändert werden, um kleine ( $< 5 \mu\text{m}$ ) und große ( $> 30 \mu\text{m}$ ) Mikropartikel herzustellen. Vgl. z. B. Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10: 362–368; McGee et al., J. Microencap. (1996). Beispielsweise ergibt schwächeres Schütteln größere Mikropartikel; ebenso eine Zunahme des Volumens der internen Phase. Kleine Partikel erzeugt man durch ein niedriges Volumen der wässrigen Phase mit hohen PVA-Konzentrationen.

[0051] Mikropartikel lassen sich auch durch Sprühtrocknung und Koazervierung bilden, wie zum Beispiel in Thomasin et al., J. Controlled Release (1996) 41: 131; U. S. Patent Nr. 2,800,457; Masters, K. (1976) Spray Drying, 2. Aufl., Wiley, New York beschrieben; durch Luftstrombeschichtungsverfahren, wie pan-Beschichtung und Wurster-Beschichtung, wie von Hall et al., (1980) The „Wurster Process“ in Controlled Release Technolo-

gies: Methods, Theory, and Applications (Hrsg. A. F. Kydonieus), Bd. 2, S. 133–154, CRC Press, Boca Raton, Florida und von Deasy, P. B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S(2): 99–139 beschrieben; und durch ionische Gelbildung wie zum Beispiel von Lim et al., Science (1980) 210: 908–910 beschrieben.

[0052] Die Partikelgröße kann beispielsweise durch Laserlichtstreuung unter Verwendung eines Spektrometers mit einem Helium-Neon-Lasers bestimmt werden. Im allgemeinen erfolgt die Bestimmung der Partikelgröße bei Zimmertemperatur, und sie beinhaltet mehrere Analysen der Probe, um einen Mittelwert des Partikeldurchmessers zu erhalten. Die Partikelgröße läßt sich auch leicht durch abtastende Elektronenmikroskopie (SEM) bestimmen.

[0053] Nach der Herstellung können die Mikropartikel im Ist-Zustand gelagert oder für weiter Verwendung gefriergetrocknet werden. Um Antigen an die Mikropartikel zu adsorbieren, wird die Mikropartikelzubereitung einfach mit dem Antigen von Interesse vermischt, und der so erhaltene Stoff kann vor seiner Anwendung abermals lyophilisiert werden. Der Proteingehalt der Mikropartikel kann mittels Standardverfahren bestimmt werden.

[0054] Ein besonders zu bevorzugendes Verfahren zum Adsorbieren von Antigen an hergestellte Mikropartikel ist das folgende: Mikropartikel werden rehydriert und mittels dialysierbarer Detergentien zu einer im wesentlichen monomeren Mikropartikelsuspension dispergiert. Nutzbare Detergentien sind beliebige Vertreter der verschiedenen N-Methylglucamide (als MEGAs bekannt), wie Heptanoyl-N-Methylglucanmid (MEGA-7), Octanoyl-N-Methylglucamid (MEGA-8), Nonanoyl-N-Methylglucamid (MEGA-9), und Decanoyl-N-Methylglucamid (MEGA-10); Cholsäure; Natriumcholat; Deoxycholsäure; Natriumdeoxycholat; Taurocholsäure; Natriumtaurocholat; Taurodeoxycholsäure; Natriumtaurodeoxycholat; 3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat (CHAPS); 3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-2-Hydroxy-L-Propan-Sulfonat (CHAPSO); N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-3-Ammonio-1-Propan-Sulfonat (ZWITTERGENT 3-12); N,N-bis-(3-D-Gluconamidopropyl)-Deoxycholamid (DEOXY-BIGCHAP); N-Octylglucosid; Sucrosemonolaurat; Glykocholsäure/Natriumglykocholat; Laurosarcosin (Natriumsalz); Glykodeoxycholsäure/Natriumglykodeoxycholat; sie sind jedoch nicht nur auf diese beschränkt. Die genannten Detergentien sind im Handel z. B. von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO erhältlich. Im allgemeinen wird man ein Mischungsverhältnis von 0,0156 : 1 Detergens zu Mikropartikel (w : w) verwenden, stärker bevorzugt 0,625 : 1, noch stärker bevorzugt 0,25 : 1 und besonders bevorzugt etwa 1 : 1 bis 2 : 1, Detergens zu Mikropartikel (w : w).

[0055] Das Mikropartikel/Detergens-Gemisch wird dann physikalisch, z. B. mit einem Keramikmörser und -Stößel gemahlen, bis ein weicher Brei entsteht. Dann wird ein geeigneter wässriger Puffer, wie phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) oder Tris-gepufferte Kochsalzlösung hinzugefügt und das so erhaltene Gemisch ultraschallzertrümmert oder homogenisiert, bis die Mikropartikel vollkommen suspendiert sind. Dann wird das Antigen von Interesse zur Mikropartikelsuspension hinzugefügt und das System dialysiert, um das Detergens zu entfernen. Das System aus polymeren Mikropartikeln und Detergens wird vorzugsweise so gewählt, daß das Antigen von Interesse an die Mikropartikeloberfläche adsorbiert und dabei noch die Antigenaktivität beibehält. Aus den so erhaltenen Mikropartikeln mit oberflächenadsorbiertem Antigen kann das nicht gebundene Antigen ausgewaschen werden, und sie können als Suspension in einer geeigneten Pufferlösung aufbewahrt oder wie nachstehend beschrieben mit den geeigneten Excipientien lyophilisiert werden.

[0056] Sobald die Antigen/Mikropartikel hergestellt sind, werden sie wie vorstehend beschrieben zu Impfstoffen zur Behandlung und/oder Vorbeugung vieler Virenkrankheiten zubereitet. Die Zusammensetzungen beinhalten gewöhnlich ein oder mehrere „pharmazeutisch akzeptable Excipientien oder Vehikel“ wie Wasser, Kochsalzlösung, Glycerin, Polyethylenglykol, Hyaluronsäure, Ethanol usw. Weiterhin können in solchen Vehikeln Hilfsstoffe, wie benetzende und emulgierende Mittel, biologische Puffersubstanzen und ähnliches vorhanden sein. Ein biologischer Puffer kann praktisch jede beliebige Lösung sein, die pharmakologisch akzeptabel ist, und die der Zubereitung den gewünschten pH-Wert, d. h. einen solchen im physiologischen Bereich verleiht. Beispiele für Pufferlösungen sind Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) oder Tris-gepufferte Kochsalzlösung, Hank'sche gepufferte Kochsalzlösung und ähnliche.

[0057] Zur Steigerung der Wirkung der Arzneimittel können Adjuvantien eingesetzt werden. Die Adjuvantien können gleichzeitig mit den Mikropartikeln der vorliegenden Erfindung verabreicht werden, d. h. in der gleichen Zusammensetzung oder aber in separaten Zusammensetzungen. Alternativ kann ein Adjuvans vor oder nach den Mikropartikelzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verabreicht werden. Solche Adjuvantien sind unter anderen: (1) Aluminiumsalze (Alaun), wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat, usw.; (2) Öl-in-Wasser-Emulsionsrezepturen (mit oder ohne spezifische immunstimulierende Agentien, wie Muramylpeptide (siehe nachstehend) oder Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie beispielsweise (a) MF59 (Internationale Veröffentlichung Nr. WO90/14837), das 5% Squalene, 0,5% Tween 80, und 0,5% Span 85 enthält (sowie wahlweise, jedoch nicht unbedingt verschiedene Mengen MTP-PE (siehe nachstehend)), und das mittels eines Mikrofluidizers wie Model 110Y von Microfluidics, Newton, MA in Submikronteilchen zubereitet ist; (b) SAF, das 10% Squalene, 0,4% Tween 80, 5% Pluron-blockiertes Polymer L121, und thr-MDP (siehe nachstehend) enthält, und das entweder zu einer Submikronemulsion mikrofluidisiert oder zur Erzeugung einer Emulsion mit größeren Partikeln gevortext wurde, und (c) Ribi™ Adjuvanssystem (RAS, Ribi Immu-



nochem, Hamilton, MT), das 2% Squalene, 0,2% Tween 80, und eine oder mehrere bakterielle Zellwandbestandteile aus folgender Gruppe enthält: Monophosphorylipid A (MPL), Trehalosedimycolat (TDM), und Zellwandskelett (CWS), vorzugsweise MPL + CWS (Detox™). (Zu einer weiteren Diskussion geeigneter Submikron-Öl-in-Wasser-Emulsionen zur Verwendung in dieser Erfindung vgl. die in gemeinsamem Eigentum befindliche, am gleichen Datum wie die vorliegende Anmeldung zu den Akten genommene Patentanmeldung Nr. 2300-1397 (Vorgangs-Nr. des Anwalts); (3) es können Saponinadjuvantien, wie Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) oder daraus erzeugte Partikel wie ISCOMs (immunostimulating complexes) verwendet werden; (4) vollständiges Freund'sches Adjuvans (CFA) und unvollständiges Freund'sches Adjuvans (IFA); (5) Cytokine, wie Interleukine (IL-1, IL-2, usw.), Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF), Tumornekrosefaktor (TNF), usw.; und (6) andere Substanzen, die als immunstimulierende Agentien wirken und die Effektivität der Zusammensetzung erhöhen. Alaun und MF59 sind vorzuziehen.

[0058] Muramylpeptide beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, N-Acetyl-Muramyl-L-Threonyl-D-Iso-glutamin (thr-MDP), N-Acetyl-Normuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutam (nor-MDP), N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutaminyl-L-Alanin-2-(1'-2'-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Hydroxyphosphoryloxy)-Ethylamin (MTP-PE), usw. Die Zusammensetzungen enthalten eine „therapeutisch wirksame Menge“ des Antigens von Interesse. Das heißt, in die Zusammensetzung wird eine Menge Antigen/Mikropartikel gegeben, die eine Immunantwort der Person bewirkt, die ausreicht, um Symptomen vorzubeugen, diese zu reduzieren oder zu eliminieren. Die genaue Menge variiert je nach der zu behandelnden Person, dem Alter und dem Allgemeinzustand der zu behandelnden Person, der Fähigkeit des Immunsystems der Person, Antikörper zu synthetisieren, der gewünschten Schutzwirkung, der Schwere des zu behandelnden Zustands, dem bestimmten ausgewählten Antigen und der Art seiner Verabreichung, sowie anderen Faktoren. Eine geeignete wirksame Menge kann von einem Fachmann leicht bestimmt werden. Somit bewegt sich die „therapeutisch wirksame Menge“ in einem relativ breiten Bereich, der durch Routineversuche bestimmt werden kann. Beispielsweise reicht eine wirksame Dosis für den Zweck der vorliegenden Erfindung typischerweise von etwa 1 µg bis etwa 100 mg, stärker bevorzugt von etwa 10 µg bis etwa 1 mg, und besonders bevorzugt von etwa 50 µg bis etwa 500 µg Antigen pro Dosis.

[0059] Die fertig zubereiteten Stoffe der Erfindung können parenteral, z. B. durch Injektion verabreicht werden. Die Stoffe können entweder subcutan, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär injiziert werden. Andere Verabreichungsweisen sind oral und pulmonär, durch Suppositorien und transdermal durch Auftragen. Der Dosierungsplan kann ein Einzeldosisplan oder ein Mehrfachdosisplan sein. Ein Mehrfachdosisplan ist einer, bei dem eine erste Impfungsreihe 1–10 separate Dosen umfassen kann, und dem weitere Dosen in Zeitintervallen folgen, die so gewählt sind, daß sie die Immunantwort erhalten und/oder verstärken; zum Beispiel die zweite Dosis nach 1–4 Monaten und nötigenfalls eine oder mehrere weitere nach einigen Monaten. Das Dosierungsschema hängt auch wenigstens teilweise vom Bedarf der Person und vom Urteil des Arztes ab. Ist die Vorbeugung einer Krankheit beabsichtigt, so werden die Impfungen im allgemeinen vor einer Primärinfektion mit dem Krankheitserreger von Interesse verabreicht. Ist eine Behandlung beabsichtigt, z. B. die Verringerung von Symptomen oder Rückfällen, werden die Impfungen nach der Primärinfektion verabreicht.

### C. Versuchsteil

[0060] Nachstehend finden sich Beispiele spezifischer Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Die Beispiele dienen nur zur Veranschaulichung und sollen den Schutzbereich der Erfindung in keiner Weise einschränken.

[0061] Es wurde Mühe darauf verwendet, Genauigkeit bei den Zahlenangaben (zum Beispiel Mengen, Temperaturen usw.) sicherzustellen, doch manche Versuchsfehler und -abweichungen sollten natürlich in Betracht gezogen werden.

#### Beispiel 1: Herstellung HA-eingeschlossener Mikrosphären mittels einer Lösungsverdampfungs-technik

[0062] In ein 15 ml-Glasteströhrchen wurden 0,5 ml 5 mg/ml Influenza A/Beijing93-Hämagglutinin-antigen (HA) und 5 in 6% w : w PLG (Poly D, L-lactid-co-Glykolid) in Dichlormethan, Molverhältnis Lactid : Glykolid 50 : 50, mittleres Molekulargewicht 70–100 kDa (Medisorb Technologies International), gefüllt. Die Lösung wurde 2 Minuten lang bei hoher Umdrehungszahl mit einem Handhomogenisierer homogenisiert. Das Homogenat wurde in einem 100 ml-Glasbecher zu 20 ml 8% Polyvinylalkohol (PVA) (12–23 kDa) hinzugefügt. Das Gemisch wurde zwei Minuten lang bei 10.000 U/min mit einem Tisch-Skalen-Homogenisierer, der mit einem Generator von 20mm Durchmesser ausgestattet war, homogenisiert. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührstab bei Zimmertemperatur mäßig schnell umgerührt, bis die Lösungsmittel verdampft waren. Die Mikrosphären wurden in Wasser resuspendiert und mehrere Male mit Wasser gewaschen, wobei die Mikrosphären zwischen den Waschvorgängen mittels Zentrifugierung gefällt wurden. Die Mikrosphären wurden in Gegenwart eines Trockenmittels (Driit-CaSO<sub>4</sub>) im Vakuum getrocknet. Die mittlere Volumengröße wurde mittels Laser-Dif-

fraktionsmessung bestimmt; sie betrug 0,9 µm. Der Proteingehalt der Mikrosphären wurde mittels Aminosäurezusammensetzungs-Analyse bestimmt; er betrug 0,5% w . w.

#### Beispiel 2: Herstellung HA-adsorbierter Mikrosphären mittels einer Lösungsverdampfungsstechnik

[0063] In einen 100 ml-Glasbecher wurden 10 ml Wasser und 100 ml 4% w : w PLG in Dichlormethan; Mol-verhältnis Lactid : Glykolid 50 : 50, mittleres Molekulargewicht 80 kDa gefüllt (Boehringer Ingelheim). Die Lösung wurde drei Minuten bei 10.000 U/min mit einem Tisch-Skalen-Homogenisierer, der mit einem Generator von 35 mm Durchmesser ausgestattet war, homogenisiert. Unter weiterem dreiminütigem Homogenisieren wurden 400 ml 10% PVA (12–23 kDa) hinzugefügt. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur über Nacht mäßig schnell umgerührt, bis das Dichlormethan verdampft war. Die Mikrosphären wurden mehrere Male mit Wasser gewaschen, wobei die Mikrosphären zwischen den Waschvorgängen mittels Zentrifugierung gefällt wurden; anschließend wurden sie gefriergetrocknet. 123 mg gefriergetrockneter Mikrosphären wurden in einer Glasphiole zu 2,4 ml 1 mg/ml Influenza A/Beijing93-HA-Antigen hinzugefügt und nach Inkubierung über Nacht bei 4°C gefriergetrocknet. Die mittlere Volumengröße wurde mittels Laser-Diffraktionsmessung bestimmt; sie betrug 0,34 µm. Der Proteingehalt nach der Gefrier Trocknung betrug etwa 2% w : w.

#### Beispiel 3: Immunogenität HA-eingeschlossener und -adsorbierter Mikrosphären

[0064] Die wie vorstehend beschrieben hergestellten HA-eingeschlossenen und -adsorbierten Mikrosphären wurden Mäusen verabreicht, und nach 28 Tagen erhielten die Tiere eine Auffrischungsimpfung, wie in Tabelle 1 gezeigt. Es wurde eine Gesamtdosis von 4 µg HAadsorbierte Mikropartikel verabreicht. Es wurde eine Gesamtdosis von HA-eingeschlossene Mikropartikel verabreicht. Am Tag 42 wurde Serum gesammelt und auf Gesamt-HIA- und Gesamt-Ig-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Wie gesehen werden kann, waren die HA-adsorbierten Mikropartikel stärker immunogen als die HA-eingeschlossene Rezeptur.  
[0065]

Tabelle 1

Tiergruppe	µg HA Erstimpfung/Auffrischung	Anti-HA-Antwort des Serums am Tag 42	
		Gesamt-Ig	HIA
	Tag 0/Tag 28		
HA-adsorbiert	2/2	7,00E + 05	1280
HA-verkapselt	1/4	1,50E + 05	160

#### Beispiel 4: Herstellung HA-adsorbierter Mikrosphären mittels eines Sprühtrocknungsverfahrens

[0066] 2% (w : w) Poly(D,L-lactid-co-glykolid) (Medisorb Technologies International, Molverhältnis Lactid : Glykolid 50 : 50, Molekulargewicht oder -äquivalent 70–100 kDa) in Dichlormethan wurden mit einem Büchi-Minisprühtrockner (Modell B-191) bei einer Einlaßtemperatur von 67–68°C, einer Auslaßtemperatur von 55°C, einem Sprühdruk von 80 PSI und einer Durchflußrate von 800 l/h sprühetrocknet. Die Größe der so erhaltenen Mikropartikel wurde durch lichtmikroskopische Untersuchung und Vergleich mit Größenstandards bestimmt; sie betrug 1–5 µm im Durchmesser.

[0067] 450 mg der sprühetrockneten Mikropartikel und 9 ml 10% MEGA-10-Detergens (im w : w-Verhältnis MEGA-10 zu Mikropartikel von 2 : 1) wurden in einen Keramikmörser gegeben. Das Gemisch wurde mit einem Keramikstößel zerkleinert, bis ein weicher Brei entstand. Es wurden 22,5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) hinzugefügt und das Gemisch drei Minuten lang bei 25.000 U/min mit einem Tisch-Skalen-Homogenisierer, mit einem 10mm-Generator homogenisiert, bis die Mikropartikel völlig resuspendiert waren.

[0068] A/Beijing HA-Massen-Antigen mit 1 mg/ml Proteingehalt, wie mit einem Bicinchoninsäure- (BCA)-Proteintest (Pierce, Rockford, IL) bestimmt, und mit einer HA-Aktivität von etwa 0,2 mg/ml, wie mit Radial-Einzelimmundiffusion (SRID) bestimmt, wurde folgendermaßen an die Mikropartikel adsorbiert: 6 ml A/Beijing HA-Massen-Antigen wurden mit 9,6 ml PBS verdünnt und dann zu 8,4 ml des Mikropartikelbreies hinzugefügt (Endzusammensetzung: 0,25 mg/ml Protein, 120 mg Mikropartikel, 1% w : v MEGA-10, 5% w : w- Protein : Partikel-Verhältnis). Das Gemisch wurde mit einer Zellulose-Dialysemembran mit einem Grenzdurchlassbereich von einem Molekulargewicht vom 50.000 gründlich gegen PBS dialysiert, bis das MEGA-10 entfernt war, was durch einen colorimetrischen Test nachgewiesen wurde. Das Dialysat wurde aus dem Dialyseschlauch entfernt und zentrifugiert, wodurch man Mikropartikel erhielt. Der Überstand wurde entfernt und verworfen und

die Mikropartikel gewaschen, wobei die PBS zweimal gewechselt und zwischen den Waschvorgängen zentrifugiert wurde. Pro Waschvorgang wurden 30 ml PBS verwendet. Die Proteinbeladung wurde mit Standardverfahren unter Verwendung von BCA bestimmt; sie betrug ungefähr 1,4% Proteingehalt pro Gewichtseinheit des Mikropartikel.

#### Beispiel 5: Immunogenität durch Sprühtrocknung hergestellter HA-adsorbierter Mikrosphären

[0069] Um die Immunogenität der in Beispiel 4 hergestellten Mikropartikel zu testen, wurden Gruppen von Balb/C-Mäusen (n = 10) nach dem in Tabelle 2 gezeigten Schema intramuskulär immunisiert. Erstimpfung und Auffrischung erfolgten im Abstand von einem Monat. Die Dosierung geschah mit A/Beijing-Antigen auf der Grundlage der HA-Aktivität (SRID), entweder als lösliches Antigen nur in PBS, oder an Mikropartikel oberflächenadsorbiert. Zwei Wochen und vier Wochen nach der Auffrischungsimpfung wurden Serumproben genommen und mittels kalorimetrischem ELISA auf ihren spezifischen A/Beijing-Gesamt-Ig-Titer untersucht. Die Serumproben wurden weiterhin auf ihre Hämagglutinations-Inhibitionsaktivität (HI) untersucht. Die Ergebnisse der ELISA- und HI-Tests sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Wie angegeben, ergab die intramuskuläre Immunisierung mit HA-adsorbierten Mikropartikeln einen gleich hohen oder meßbar höheren Ig-Titer als die Immunisierung mit HA allein.

[0070] Es wurde gezeigt, daß mit einem Standard-Mikroverkapselungsverfahren in PLG-Mikropartikel verkapselte A/Beijing-HA nach intramuskulärer Verabreichung schwache HI-Antworten lieferten, was darauf hinweist, daß die Denaturierung von HA während des Verkapselungsvorgangs stattfand. Deshalb bietet das Darreichen des Antigens auf der Oberfläche von Mikropartikeln Vorteile gegenüber einer Mikroverkapselung des Antigens und zeigt überraschenderweise eine Adjuvanswirkung.

[0071]

Tabelle 2

Grp. Nr.	Immunisierungsschema		Serumtiter			
			Zwei Wochen nach der Auffrischungsimpfung		Vier Wochen nach der Auffrischungsimpfung	
	Erstimpfung (Tag 0)	Auffrischungsimpfung (Tag 28)	Gesamt-Ig	HI	Gesamt-Ig	HI
1		14 µg HA	52.000	150	207.000	160
2		14 µg HA (HA-Mikropartikel)	236.000	320	415.000	320
3	1 µg HA	14 µg HA	1.160.000	1.280	911.000	1.280
4	1 µg HA	14 µg HA (HA-Mikropartikel)	1.310.000	2.560	1.360.000	1.280

#### Beispiel 6: Herstellung PLG-eingeschlossener HSVgD2-Mikrosphären

[0072] Mit einer Lösungsmittelverdampfungstechnik wurden im allgemeinen wie vorstehend beschrieben, HSVgD2-eingeschlossene PLG-Mikropartikel hergestellt. Kurz gesagt, wurden die Mikropartikel mit einer 1% w : w-Antigenladung hergestellt, indem 2 ml Antigenlösung zu 10 ml 5% w : v PLG-Polymerlösung in Methylchlorid hinzugefügt und mit einem Silverson-Homogenisierer bei hoher Geschwindigkeit emulgiert wurden. Die Primäremulsion wurde dann zu 50 ml destilliertem Wasser mit PVA (10% w : v) hinzugefügt. Das führte zur Bildung einer w/o/w-Emulsion, die nochmals 4 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert wurde. Die so erhaltene Emulsion wurde bei Zimmertemperatur 12 Stunden lang mit 1000 U/min umgerührt, und das Methylchlorid wurde verdampfen gelassen. Die Mikropartikel wurden filtriert, zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und lyophilisiert.

Beispiel 7: Herstellung PLG-adsorbierter HSVgD2-Mikrosphären Mit einer Lösungsmittelverdampfungstechnik wurden leere Mikropartikel hergestellt. Kurz gesagt, wurden die Mikropartikel mit einer 0% w : w-Proteinladung (leere Mikropartikel oder Placebo) hergestellt, indem 2 ml gewöhnliche Kochsalzlösung zu 10 ml 10% w : v PLG-Polymerlösung in Methylchlorid hinzugefügt und mit einem Silverson-Ho-

mogenisierer bei hoher Geschwindigkeit emulgiert wurde. Die Primäremulsion wurde dann zu 50 ml destilliertem Wasser mit Polyvinylalkohol (10% w : v) hinzugefügt. Das führte zur Bildung einer w/o/w-Emulsion, die nochmals 4 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit umgerührt wurde. Die so erhaltene Emulsion wurde bei Zimmertemperatur 12 Stunden lang mit 1000 U/min umgerührt, und das Methylchlorid wurde verdampfen gelassen. Die Mikropartikel wurden filtriert, zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die leeren PLG-Mikropartikel wurden zu einer HSVgD2-Proteinlösung hinzugefügt und durch Schütteln der Suspension auf einem Reagenzglasschüttler bei Zimmertemperatur zwei Stunden lang gründlich gemischt.

[0073] Die Suspension wurde dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die eingefrorene Suspension wurde zur Verwendung als assoziierte HSVgD2-Zubereitung lyophilisiert.

#### Beispiel 8: Immunogenität HSVgD2-eingeschlossener und -adsorbierter Mikrosphären

[0074] Die wie vorstehend beschrieben hergestellten HSVgD2-eingeschlossenen und -adsorbierten Mikrosphären wurden an Mäuse verabreicht, und nach 28 Tagen wurde eine Auffrischung vorgenommen. Es wurde eine Gesamtmikropartikeldosis von  $10\text{ }\mu\text{g}$  verabreicht. Nach 4 und nach 8 Wochen wurden Serumproben genommen und die Ig- und Neutralisationstiter geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt. Wie daraus ersichtlich ist, ergab an Mikropartikel adsorbiertes HSVgD2 höhere Neutralisationstiter als die in HSVgD2 eingeschlossenen Mikropartikel

Tabelle 3

Zubereitung	4 Wochen nach 2			8 Wochen nach 2		
	IgG-Titer	Neutralisationstiter	Verhältnis Neutralisationstiter : IgG-Titer	IgG-Titer	Neutralisationstiter	Verhältnis Neutralisationstiter : IgG-Titer
HSVgD2 1 $\mu\text{m}$ eingeschlossen	$5,4 \times 10^{-5}$	58	$1,04 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10_5$	68	$3,01 \times 10^{-4}$
HSVgD2 400 nm adsorbiert	$8,54 \times 10^5$	192	$2,26 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10_5$	136	$6,10 \times 10^{-4}$

#### Beispiel 9 : Herstellung Gag-adsorbierter und -eingeschlossener Mikrosphären

[0075] Folgende Lösungen wurden zur Herstellung Gag-adsorbierter  $0,4\text{ }\mu\text{m}$ -Mikropartikelzubereitungen verwendet:

- (1) 4% RG 503 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dimethylchlorid
- (2) 10% PVA (ICN) in Wasser
- (3) PBS

[0076] Im einzelnen wurde die interne Emulsion durch Hinzufügung von 1,25 ml PBS zu 12,5 ml Polymerlösung und 2,5-minütige Homogenisierung bei 23 K mit einem IKA-Handhomogenisierer mit einer kleinen Sonde vorgenommen. Die zweite Emulsion wurde durch Hinzufügung der internen Emulsion zu 50 ml der PVA-Lösung und 3-minütige Homogenisierung mit einem Tischhomogenisierer mit einer 20 mm-Sonde bei 10 K vorgenommen. Die Emulsion wurde über Nacht weiter gerührt, um das Lösungsmittel verdampfen zu lassen. Die gebildeten Mikrosphären wurden durch ein  $38\text{ }\mu\text{m}$ -Netz gefiltert, dessen Größe im Malvern Master-Größenbestimmer eingestellt worden war, dann durch Zentrifugierung drei Mal mit Wasser gewaschen und lyophilisiert.

[0077] P24 gag wurde folgendermaßen an die Mikrosphären adsorbiert:

#### a) 5% adsorbierte Mikrosphären

[0078] 200 mg lyophilisierte Placebo-Mikrosphären wurden mit 80 ml  $0,25\text{ mg/ml}$  P24gag-Protein in PBS unter Schaukeln über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikrosphären zentrifugiert und der Überstand mit BCA auf seine gag-Konzentration getestet, um die adsorbierte Menge zu bestimmen.

men. Die Mikrosphären wurden einmal mit PBS gewaschen und lyophilisiert. Die lyophilisierten Mikrosphären wurden mit weiteren 40 ml 0,25 mg/ml P24 gag in PBS unter Schaukeln bei Zimmertemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikrosphären zentrifugiert und der Überstand mittels BCA auf Protein überprüft. Die Mikrosphären wurden einmal mit PBS gewaschen und lyophilisiert. Die lyophilisierten Mikrosphären wurden mittels Basenhydrolyse auf adsorbiertes Gesamtprotein analysiert.

b) 1% adsorbierte Mikrosphären

[0079] 100 mg 0,4 µm-Placebo-Mikrosphären wurden mit 10 ml 0,2 mg/ml P24gag in PBS unter Schaukeln über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikrosphären zentrifugiert und der Überstand mit BCA auf Protein getestet. Die Mikrosphären wurden einmal mit PBS gewaschen, lyophilisiert und mittels Basenhydrolyse auf adsorbiertes Protein analysiert.

Beispiel 10: Immunogenität Gag-adsorbierter Mikrosphären

[0080] Die wie in Beispiel 9 beschrieben hergestellten Gag-adsorbierten Mikrosphären sowie gag-verkapselte Mikrosphären und Leermikrosphären als Kontrolle wurden wie vorstehend beschrieben Mäusen verabreicht und die CTL-Aktivität zwei Wochen nach der Endimmunisierung geprüft. Wie in den Tabellen 4 und 5 gezeigt, induzierten Mikropartikel mit an der Oberfläche überbrachtem gag (1%) die CTL-Aktivität, während die gleiche Menge in biologisch abbaubare Partikel verkapseltes gag dies nicht bewirkte. 5% oberflächenadsorbiertes gag war auch besser für die Induzierung von CTL-Aktivität als eingeschlossenes Protein.

[0081]

Tabelle 4

Effektor	Verhältnis E : T	Prozent spezifische Lyse von Zielen		
		Deb-Test 1		
		SV/0	SV/p7g	MC/p7g
PLG	60 : 1	3	23	1
Oberfläche 1%	12 : 1	2	10	2
	2,4 : 1	1	3	1
PLG	60 : 1	0	1	-1
Verkapselt 1%	12 : 1	0	1	1
	2,4 : 1	0	1	-1
gag allein	60 : 1	0	6	1
	12 : 1	1	5	1
	2,4 : 1	1	2	2
Vaccinia gag	60 : 1	2	27	0
	12 : 1	1	10	2
	2,4 : 1	1	4	2

Tabelle 5

Effektor	Verhältnis E : T	Prozent spezifische Lyse von Zielen		
		Deb-Test 1		
		SV/0	SV/p7g	MC/p7g
PLG	60 : 1	3	32	2
Oberfläche 5%	12 : 1	2	13	0
	2,4 : 1	1	5	1
PLG	60 : 1	13	18	12
Verkapselt 5%	12 : 1	5	8	4
	2,4 : 1	1	2	0
gag allein	60 : 1	5	9	4
	12 : 1	2	4	3
	2,4 : 1	2	1	3
Vaccinia gag	60 : 1	9	32	11
	12 : 1	1	14	4
	2,4 : 1	0	6	1

[0082] Damit ist die Anwendung antigenadsorbierter Mikropartikel zur Stimulierung der zellvermittelten Immunantworten, wie auch Verfahren zur Herstellung der Mikropartikel offenbart. Obwohl bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ziemlich detailliert beschrieben wurden, versteht es sich, daß offensichtliche Variationen davon ausgeführt werden können, ohne von der Idee und vom Schutzbereich der Erfindung, wie in den anhängenden Patentansprüchen definiert, abzuweichen.

### Patentansprüche

1. Zusammensetzung, die (i) ein ausgewähltes virales Antigen adsorbiert an einen Poly( $\alpha$ -hydroxysäure)-Mikropartikel und (ii) einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst, mit der Maßgabe, dass die Mikropartikel keine lamellenartigen Partikel sind, die zumindest teilweise kristallin sind.

2. Zusammensetzung, die (i) ein ausgewähltes virales Antigen adsorbiert an eine Poly( $\alpha$ -hydroxysäure)-Mikrosphäre und (ii) einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zusammensetzung für eine parenterale Verabreichung formuliert ist.

3. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines viralen Antigens;
- (b) Adsorbieren des viralen Antigens an einen Poly( $\alpha$ -hydroxysäure)-Mikropartikel durch Zugabe des viralen Antigens zu einer Suspension von Poly( $\alpha$ -hydroxysäure)-Mikropartikeln in Anwesenheit eines dialysierbaren Detergens, und
- (c) Vereinigen der Mikropartikel und des adsorbierten Antigens mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren den Schritt des Dialysierens des Mikropartikel/Antigen-Gemisches umfasst, um das Detergens zu entfernen.

4. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen des viralen Antigens;
- (b) Bereitstellen der Poly( $\alpha$ -hydroxysäure)-Mikropartikel; und

(c) Mischen der Mikropartikel mit dem Antigen.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Mikropartikel Mikrosphären sind.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 2 oder Verfahren nach Anspruch 5, worin die Mikrosphären einen Durchmesser zwischen 200 nm und 30 µm aufweisen.
7. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 6, worin die Mikrosphären einen Durchmesser zwischen 500 nm und 10 µm aufweisen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, worin die Mikropartikel unter Verwendung von Verfahren der Doppalemulsion/Lösungsmittelverdampfung erzeugt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, worin die Mikropartikel unter Verwendung von Koazervierung, Luftstrombeschichtung oder ionischer Gelbildung erzeugt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, worin die Mikropartikel unter Verwendung der Sprühtrocknung erzeugt werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, das weiterhin den Schritt des Lyophilisierens umfasst.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 1, 2, 6 oder 7 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 11, worin die Poly(a-hydroxysäure) ein Poly(L-lactid), ein Poly(D,L-lactid) oder ein Poly(D,L-lactid-co-glycolid) ist.
13. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 12, worin das Mikropartikel aus Poly(D,L-lactid-co-glycolid) erzeugt wird.
14. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 13, worin das Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50% D,L-Lactid und 50% Glycolid enthält.
15. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, worin das Poly(D,L-lactid-co-glycolid) ein Molekulargewicht im Bereich von 10.000 bis 200.000 aufweist.
16. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 15, worin das Poly(D,L-lactid-co-glycolid) ein Molekulargewicht im Bereich von 15.000 bis etwa 150.000 aufweist.
17. Zusammensetzung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, worin die Zusammensetzung für die Injektion formuliert ist.
18. Zusammensetzung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin die Zusammensetzung einen Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Werts im physiologischen Bereich umfasst.
19. Zusammensetzung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, worin das virale Antigen ein Protein ist, ausgewählt aus der Herpes-Virus-Familie, Herpes Simplex-Virus (HSV) Typ 1 oder Typ 2, Varicella-Zoster-Virus, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus, HHV6, HHV7, Hepatitis A-Virus, Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus, Delta-Hepatitis-Virus, Hepatitis E-Virus, Hepatitis G-Virus, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Retroviridae, menschlichem Papillomavirus, oder einem Zecken-Enzephalitis-Virus.
20. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 19, worin das virale Antigen HIV-gp120, HIV-p24gag, Influenza A Hämagglutinin, HCV E1, HCV E2, oder Herpes Simplex-Virus gD2 ist.
21. Zusammensetzung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, worin die Zusammensetzung ein weiteres Adjuvans umfasst.
22. Zusammensetzung oder Verfahren nach Anspruch 21, worin das weitere Adjuvans ein Aluminiumsalz, eine Öl-in-Wasser-Emulsion, MF59, ein Saponin, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans oder ein Cytokin ist.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 1, 2, 6, 7 oder einem der Ansprüche 12 bis 22 zur Verwendung als Impfstoff.

24. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 1, 2, 6, 7 oder einem der Ansprüche 12 bis 22 für die Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines Vertebraten-Individuums.

25. Verwendung nach Anspruch 24, worin eine humorale Immunantwort im Vertebraten-Individuum ausgelöst wird.

26. Verwendung nach Anspruch 24 oder 25, worin eine zelluläre Immunantwort im Vertebraten-Individuum ausgelöst wird.

27. Verwendung nach Anspruch 26, worin die zelluläre Immunantwort eine cytotoxische T-Lymphocyten-Antwort und/oder eine T-Helferzellen-Antwort einschließt.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, worin das Medikament in Verbindung mit DNA-Immunisierung verwendet wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen