

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

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
1. November 2012 (01.11.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/146364 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 49/14* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/001738
- (22) Internationales Anmeldedatum:
23. April 2012 (23.04.2012)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2011 018 499.6
23. April 2011 (23.04.2011) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CHARITE - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Charitéplatz 1, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WALDEN, Peter** [DE/DE]; Rykestr. 4, 10405 Berlin (DE). **LADEMANN, Jürgen** [DE/DE]; Hauffstr. 36, 15517 Fürstenwalde (DE). **BAUDE, Barbara** [DE/DE]; Schwielowsee 84c, OT Caputh, 14548 Schwielowsee (DE). **DÄHNE, Lars** [DE/DE]; Ravensteiner Promenade 3, 15366 Dahlewitz Hoppegarten (DE). **WIESMÜLLER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Hemmlingstr. 6, 71083 Herrenberg (DE).
- (74) Anwalt: **EXNER, Torsten**; Schiweck Weinzierl Koch GbR, Landsberger Strasse 98, 80339 Munich (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: MICROPARTICLE AND/OR NANOPARTICLE VACCINE FOR PROPHYLACTIC AND/OR THERAPEUTIC APPLICATION

(54) Bezeichnung : MIKRO- UND/ODER NANOPARTIKEL-VAKZIN ZUR PROPHYLAKTISCHEN UND/ODER THERAPEUTISCHEN ANWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to novel topical vaccines that, with the aid of a particle-based support system, specifically address the dendritic cells of the skin and thereby induce effective prophylactic and/or therapeutic T-cell-mediated immunity. The invention further relates to the composition of such a vaccine of antigen-determinants for cytotoxic effector-T cells and helper-T cells and also the use of synthetic analogues of bacterial lipopeptides as TLR-based adjuvants for reinforcing the specific immune response. A combination of the vaccine components is immobilized on micro- and/or nano-scale support particles, after application to the skin are transported by these in an active transport process into the hair follicles and are there temporarily deposited. The active ingredients liberated in the hair follicle under the physiological conditions diffuse to the target structures in the skin, stimulate the cell surface receptors of the dendritic cells and induce a targeted T-cellular immune response. The novel topical micro- and/or nanoparticle vaccines and formulations thereof are suitable, firstly, for prevention, and secondly for treatment, of diseases such as infections, cancer, autoimmune disease, chronic infections and allergies in humans and animals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue topische Vakzine, die mit Hilfe eines Partikel-basierten Trägersystems gezielt die dendritischen Zellen der Haut adressieren und damit eine effektive prophylaktische und/oder therapeutische T-Zell-vermittelte Immunität induzieren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Zusammensetzung eines solchen Vakzins aus Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen und Helfer-T-Zellen sowie die Verwendung von synthetischen Analoga bakterieller Lipopeptide als TLR-basierte Adjuvantien für die Verstärkung der spezifischen Immunantwort. Eine Kombination der Vakzinkomponenten wird an mikro- und/oder nanoskaligen Trägerpartikeln immobilisiert, nach Auftragen auf die Haut durch diese in einem aktiven Transportprozess in die Haarfollikel befördert und dort temporär deponiert. Die unter den physiologischen Bedingungen im Haarfollikel freigesetzten Wirkstoffe diffundieren zu den Zielstrukturen in der Haut, stimulieren die Zelloberflächenrezeptoren der dendritischen Zellen und induzieren eine gezielte T-zelluläre Immunantwort. Die neuen topischen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine und deren Formulierungen eignen sich einerseits zur Vorbeugung und andererseits zur Behandlung von Erkrankungen wie Infektionen, Krebs, Autoimmunkrankheiten, chronischen Entzündungen und Allergien bei Mensch und Tier.

WO 2012/146364 A1

Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung

Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität einer Anmeldung über "Topische Nanopartikel-Vakzine zur Immunstimulation der dendritischen Zellen in der Haut", die am 21. April 2011 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht wurde, wo ihr das Aktenzeichen DE 10 2011 018 499.6 zugeteilt wurde. Der Inhalt der genannten Anmeldung, die am 21. April 2011 eingereicht wurde, wird hiermit durch Bezug für alle Zwecke aufgenommen, inklusive der Aufnahme eines Bestandteils oder Elements oder eines Teils der Beschreibung, der Ansprüche oder der Zeichnungen, die hier nicht enthalten und in Regel 20.5(a) des PCT genannt sind, gemäß Regel 4.18 der PCT.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung, insbesondere zur topischen Applikation auf die Hautoberfläche. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein pharmazeutisches Präparat, das das Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin enthält, sowie die Verwendung der Mikro- bzw. Nanopartikel-Vakzine oder eines solchen pharmazeutischen Präparats zur Behandlung oder Prophylaxe einer Erkrankung.

Hintergrund der Erfindung

Die Suche nach Alternativen zu den üblichen Vakzinierungsverfahren über die parenteralen und oralen Applikationswege findet immer mehr Beachtung (O'Hagan et al. 2004).

Bei der systemischen Aufnahme der Wirkstoffe, die über das Blut- und Lymphsystem im gesamten Körper verteilt werden, kommt nur ein Bruchteil der pharmakologisch aktiven Bestandteile an den Zielstrukturen an. Zudem weisen viele Wirkstoffe aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nur eine geringe Bioverfügbarkeit auf. Weniger stabile Verbindungen werden durch enzymatische Abbauprozesse, vor allem im Gastrointestinaltrakt, metabolisiert, bevor sie den Wirkort erreichen. Somit werden mit den bisher üblichen Vakzinierungsverfahren sehr oft hohe Dosierungen benötigt, um einen adäquaten Immunisierungserfolg zu erzielen, entsprechende Nebenwirkungen inbegriffen.

Deshalb wurden in der letzten Zeit zunehmende Anstrengungen unternommen, über gezielte Drug Delivery Systeme die Wirkstoffe kontrolliert, in stabilisierter Form und in ausreichend hoher Dosis an einen festgelegten Wirkort zu bringen und dort mit einem definierten Freisetzungsprofil abzugeben.

Weitere einschränkende Bedingungen sind die mit den systemischen, meist invasiven Applikationsformen verbundenen Risiken und Nebenwirkungen, wie z.B. Sekundärinfektio-

nen, allergische Reaktionen, Reizungen, Intoxikation, Hämatome und ähnliches. Nicht zuletzt fällt durch die Injektionsnadeln eine große Menge potentiell infektiösen Sondermülls an.

Vorteile einer topischen Vakzinierung dagegen, sind neben der einfachen, flexiblen und schmerzarmen Handhabung auch die gezielte Adressierung von relevanten Strukturen des Immunsystems in der Haut, die eine effektive Immunisierung ermöglichen, ohne dabei den gesamten Organismus mit den oftmals wenig verträglichen Substanzen zu belasten, sowie die Vermeidung jeglichen Infektionsrisikos. Geschultes medizinisches Personal ist oftmals entbehrlich.

Die topische Anwendung von Arzneimitteln auf der Haut basiert auf der direkten Auftragung der Wirkstoffformulierung auf die Hautoberfläche, dem Durchtritt der gegebenenfalls Trägergebundenen Wirkstoffe durch die Haut und der Penetration / Diffusion der aktiven Komponenten zum Wirkort.

Dazu wurden bereits einige Applikationsstrategien entwickelt. Jedoch wurden nur wenige Konzepte in die klinische Anwendung, d.h. in klinische Studien überführt.

Bereits im Jahr 1998 begründete die Firma Iomai Corporation die Entwicklung der Pflaster-Technologie mit einer Patentanmeldung, die die transkutane Immunisierung über die Langerhans-Zellen der Haut durch Applikation von Antigen-Determinanten im Kombination mit ADP-ribosylierenden Exotoxinen oder anderen Adjuvantien direkt auf die Hautoberfläche, zum Gegenstand hat (WO 1999/43350). Jedoch ist es auch Gegenstand dieser Anmeldung, dass der Penetrationsprozess durch die Haut durch die Anwendung von physikalischen oder chemischen Methoden zur Barrierschädigungen unterstützt wird.

In einer weiteren Anmeldung (WO 2002/074244) wird die topische Applikation lediglich der Adjuvantien beschrieben, um die durch parenteral applizierte Vakzine ausgelöste Immunreaktion zu verstärken. Die angewandte Technologie zur Vermittlung der Hautpenetration entspricht dem oben genannten Prinzip, das eine Abtrennung der oberen Epidermisschicht beinhaltet. Danach wird das Pflaster aufgeklebt und die austretende Wundflüssigkeit benetzt den Impfstoff, der dann in die Haut diffundieren soll. Für den Mechanismus dieser Penetration werden u.a. die interzelluläre Penetration innerhalb der Lipidschichten und, vorrangig für polare Substanzen, der Transfer durch flüssige interzelluläre Kanäle zwischen den Keratinozyten diskutiert. Den Haarfollikeln und Schweißdrüsen wird ausdrücklich eine „minimale Rolle“ beim transkutanen Wirkstofftransport zugebilligt. Partikel werden lediglich zur besseren Stabilisierung von Suspensionen und als Depots für die verzögerte Freisetzung der Wirkstoffkomponenten vorgeschlagen. Eine Transportfunktion dieser Partikel ist nicht beschrieben.

Auf Basis dieser Erfindungen hat die Firma Intercell AG inzwischen ein Impf-Pflaster gegen Reise-Diarrhöe entwickelt (WO 2005/103073). Das Zulassungsverfahren wurde allerdings gestoppt, da in den klinischen Studien der Phase III keine ausreichende Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte. Ein System zur Impfung gegen Influenza, bei dem die immunisierende Wirkung von niedrigen Dosen der konventionell verabreichten Antigene durch ein ein
5 toxisches Adjuvans enthaltendes Pflaster verstärkt wird sowie ein Impfstoff-Pflaster gegen Krankenhauskeime sind in der Entwicklung (WO 2003/047602, Glenn et al. 2007).

Andere Ansätze zur topischen Vakzinierung erzielen die transdermale/intradermale Applikation von Antigenen durch nadelfreie Injektion mittels Luft, Flüssigkeiten und/oder Druck
10 (WO 1999/31262, Chen et al. 2000, 2002, Mitragotri 2006) oder Mikro-Nadeln (Choi et al. 2007). Mit Intanza® und IDflu® von Sanofi Pasteur wurde im Dezember 2008 das erste intradermale Mikroinjektions-Impfsystem für die saisonale Influenza-Impfung in der EU zugelassen. Durch die nur 1,5 mm langen Mikro-Nadeln wird das Antigen minimal-invasiv direkt in die Haut injiziert. Allerdings wird damit nicht die mit den immunkompetenten Zellen besonders dicht
15 durchzogene Epidermis als ideale Zielregion erreicht. Sullivan et al. (2010) schlagen die Verwendung von Pflastern mit selbstauflösenden Mikro-Nadeln aus Polyvinylpyrrolidon vor, in die die Vakzine eingeschlossen sind.

Versuche mit zellpenetrierenden Peptiden hatten weniger Erfolg. Durch die Kopplung von TAT-Peptiden an Lipid-Nanopartikel konnten diese bis zu einer Tiefe von 120 µm in die Epidermis gelangen. Auch in den Haarfollikeln waren Partikel in dieser Tiefe nachweisbar. Für die Adressierung der für die Immunisierung notwendigen DCs reicht dies aber nicht aus (Patlolla et al. 2010). In anderen Arbeiten ist der Transporteffekt auf wenige Proteine beschränkt
20 (Huang et al. 2010).

Seit einigen Jahren werden auch Liposomen als Transportsysteme für topisch applizierte Wirkstoffe in und durch die Barriere der menschliche Haut eingesetzt (Barry 2002). Untersuchungen ergaben, dass diese vesikulären Strukturen die Hautbarriere nicht als intakte Einheiten durchdringen, sondern die Wirkstoffe freisetzen, die dann eigenständig weiter penetrieren.

Es gibt jedoch Untersuchungen, dass Nanopartikel unterhalb einer bestimmten Größe in der Lage sind, die Hautbarriere nach Vorschädigung zu durchdringen. Vogt et al. applizierten beispielsweise Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 - 1.500 nm auf exzidierte Haut, deren Barriere vorher mit einem Cyanacrylat-Abriss geschädigt wurde. In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die kleinsten untersuchten Partikel in das Gewebe eindringen konnten und dort von den Langerhans-Zellen aufgenommen wurden (Vogt et al. 2006). Eine darauf aufbauende Vakzinierungsstrategie mit klassischen Influenza-Vakzin-
30 Suspensionen befindet sich in der klinischen Phase Ia (Combadière et al. 2010, WO 2006/

136959). Dasselbe Prinzip beinhaltet der DNA-basierte HIV-Impfstoff DermaVir von Genetic Immunity (klinischen Phase II), bei dem die Nukleinsäuren an Nanopartikel aus mannosyliertem Polyethylenimin gebunden sind. Eine Freisetzung der Wirkstoffe ist in diesen Konzepten nicht vorgesehen. Vielmehr geht man von der partikulären Struktur der Antigene z.B. in Form von viralen Partikeln, Nanopartikel oder DNA aus.

Zahlreiche nanoskalige Trägersysteme sind entwickelt worden, deren Ziel vor allem darin besteht, die Träger-gebundenen Wirkstoffe direkt zu den und in die immunkompetenten Zellen zu befördern. In WO 2010/006753 werden SiO₂-Nanopartikel einer Größe von 25 nm als Antigen-Träger eingesetzt, wobei die Effektivität der Aufnahme in die antigenpräsentierenden Zellen der Lymphknoten und damit der Immunisierung über die Größe der Partikel steuerbar ist. Auch in WO 2008/118861 wird die Adressierung der immunkompetenten Zellen durch Größe und Geometrie der Trägerpartikel, weitestgehend unabhängig von deren Zusammensetzung, erzielt. Die Applikation erfolgt in beiden Fällen parenteral durch intradermale oder subkutane Injektion. Die Trägerpartikel werden, zusammen mit den kovalent gebundenen Wirkstoffen, direkt von den antigenpräsentierenden Zellen der Lymphknoten aufgenommen. Ähnliche Ansätze basieren auf biologisch abbaubaren Trägerpartikeln (WO 2008/048298, WO 2007/067744, WO 1998/28357), wobei die Wirkstoff-Komponenten in die Matrix integriert oder durch adsorptive Wechselwirkungen oder Komplexbildung an die Oberfläche gebunden sein können. Auch werden Trägerpartikel mit intrinsischem adjuvantem Effekt beschrieben (Chen et al. 2010, Florindo et al. 2010).

Durch nicht-kovalente Kopplung der Wirkstoffe an die Trägerpartikel auf der Basis von physikalisch-chemischen Wechselwirkungen, ergibt sich die Möglichkeit der kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung nach Erreichen des Wirkortes (WO 2009/046498, WO 2007/067744).

Bisher ist es jedoch in keiner Anwendung gelungen, den transdermalen Wirkstofftransport für beliebige und beliebig viele Vakzinkomponenten ohne eine Vorschädigung der Haut oder Injektionssysteme und ohne Eintritt des Trägers in das lebende Körpergewebe zu realisieren (Prausnitz et al. 2008). Während die Penetration von Nanopartikeln in die Haarfollikel inzwischen recht gut erforscht ist, sind die Anwendung größerer und damit nicht zellgängiger Trägerpartikel, die effektive Bindung und gezielte Freisetzung der Wirkstoffe und auch die eigenständige Diffusion der Wirkstoffe zu den immunkompetenten Strukturen der Haut, noch Gegenstand aktueller Forschungen.

Die Entwicklung von Impfstoffen, weg von den kompletten Organismen hin zu hochreinen synthetischen Vakzinkomponenten, erhöht die Erfordernis von Adjuvantien zur Verstärkung der Immunantwort. Viele klassische Adjuvantien simulieren durch bestimmte molekulare Strukturen, Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), die immunologisch effektiven

Komponenten der Pathogene und werden von den immunkompetenten Zellen des angeborenen Immunsystems, einschließlich der antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. DCs, bevorzugt über die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) erkannt. Diese Zellen spielen durch die Präsentation der Antigene an die Lymphozyten und die Expression von Zytokinen auch eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Antigen-spezifischen adaptiven Immunantwort.

Unter einigen anderen kommt den bakteriellen Lipopeptiden, die vor allem die T-zelluläre Immunantwort stimulieren, eine große Bedeutung zu (Brown et al. 2005). Weil die TLR für Lipopeptide, im Gegensatz zu den TLR für die meisten anderen Immunmodulatoren, auf den Oberflächen der Zellen exprimiert werden, sind bakterielle Lipopeptide besonders gut zum Targeting geeignet. Zudem können diese durch synthetische Analoga ersetzt werden, die als charakteristisches Merkmal die ungewöhnliche Aminosäure S-[2,3-di(hydroxy)-propyl]-[R]-cystein am N-Terminus, an die zwei oder drei Fettsäuren gebunden sind, aufweisen. So reagiert das TLR 1 / TLR 2-Heterodimer ebenfalls auf triacylierte synthetische Lipopeptide, wie die Pam₃Cys-Derivate (EP 0210412). TLR 6 / TLR 2-Heterodimere sind sensitiv für diacylierte synthetische Lipopeptide, wie die Pam₂Cys-Derivate (EP 0519327).

Z.B. wird von Mühlradt et al. ein diacyliertes Dihydroxypropylcystein-Peptid mit einem von der Spezies *Mycoplasma fermentans* abgeleiteten Peptid (MALP-2) für verschiedene Anwendungen in der Immunologischen Medizin beansprucht (WO 1998/27110, WO 1999/59610, WO 2002/028887, WO 2003/084568, WO 2004/108145).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden bereits verschiedene Medikamente und Impfstoffe, die Zusätze von acylierten Lipopeptiden als Adjuvantien enthalten, zur Verwendung im Rahmen von immunmodulatorischen Therapien entwickelt. Typischerweise werden die Lipopeptide, bevorzugt Pam₃Cys- und Pam₂Cys-Derivate als TLR 2 targetierende Substanz, hierzu mit einer antigenen Komponente für B-Lymphozyten oder für zytotoxische T-Zellen sowie weiteren Hilfsstoffen vermischt, um synergistische Effekte zu induzieren (WO 2007/103322, WO 2006/104389, US 7,387,271). In WO 2006/040076 wird auch eine topische Applikation einer solchen Wirkstoff-Formulierung beschrieben.

Auch Formulierungen als Liposomen oder Virus Like Particles, die neben Antigenen und gegebenenfalls Zytostatika auch Lipopeptide, bevorzugt Pam₃Cys, enthalten, werden für die Behandlung von verschiedenen Erkrankungen und Allergien beansprucht (WO 2005/063201, WO 2005/063288).

Ebenfalls werden Konjugate aus Pam₂Cys- bzw. Pam₃Cys-Derivaten und Antigenen als Impfstoffe beschrieben, um die Antigene spezifisch an die immunkompetenten Zellen zu binden bzw. in diese einzuschleusen; so in WO 2007/078879 eine Kombination aus einem Membranproteinen des Influenza-Virus und einem Pam₃Cys-Derivat, in WO 2009/046498 eine DNA-

Vakzine, die durch polare Aminosäuren an ein Pam₂Cys-Derivat gekoppelt ist, in WO 2007/079448 ein lineares Tandem-Molekül aus einem B-Zell-Epitop, einem T-Zell-Epitop und Pam₃Cys oder in WO 2004/014956 und WO 2004/014957 ein Molekül aus einem B-Zell- bzw. CTL-Epitop und einem Helfer-T-Zell-Epitop, die durch ein Pam₃Cys-Lipopeptid miteinander
5 verbrückt sind. Bereits Borges et al. (1994) beschreiben den immunverstärkenden Effekt durch die direkte Kopplung von Pam₂Cys- und/oder Pam₃Cys-Derivaten mit CTL- und/oder Helfer-T-Zell-Epitopen.

Im Zusammenhang mit partikulären Biotransportern für Lipopeptide sind sehr wenige konkrete Anwendungen bekannt. Schwerpunkt diesbezüglicher Patentanmeldungen ist die
10 Beschaffenheit der Partikel. In der Regel sind die Wirkstoffkomponenten nicht näher spezifiziert. Lipopeptide werden unter einer Vielzahl möglicher Verbindungen als Immunzellen-targetierende Substanzen erwähnt. Eine Anwendung lipid-ähnlicher Strukturen sind nanoskalige Fett- und fettähnliche Tröpfchen als Wirkstoffträger (EP 0605497). Heuking et al. 2009 beschreiben ein System aus Pam₃Cys-PEG gekoppelt an Chitosan (Partikel) als
15 potentielles Drug Delivery System, wobei das Lipopeptid als Ankermolekül zur Zielsteuerung der Chitosan-Biotransporter fungiert. Durch das Lipopeptid als TLR-Ligand sollen die Wirkstoffträger spezifisch an die immunkompetenten Zellen gebunden werden, um eine intensive Wechselwirkung bzw. Aufnahme in die Zelle zu ermöglichen.

Aufgabenstellung

20 Ausgehend von den dargestellten Vor- und Nachteilen derzeit verfügbarer Vakzinierungsverfahren besteht ein Bedarf an weiteren Vakzinierungsstrategien für Prophylaxe und/oder Therapie, die die Vorteile einer topischen Vakzinierung gegenüber der bisher dominanten systemischen und invasiven Applikationsform nutzen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neue trägerbasierte und topisch applizierbare prophylaktische und/oder therapeutische Vakzine zur Verfügung zu stellen, welche
25 eine effektive und zugleich einfache wie schmerzarme Immunisierung ohne Nebenwirkungen und Risiken ermöglichen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein topisch applizierbares Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin wie es in Anspruch 1 definiert ist. Dieses Vakzin kann zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung bei Infektionen, Krebs, Autoimmunerkrankungen sowie entzündlichen und allergischen Leiden eingesetzt werden. Ein Vakzin gemäß der vorliegenden Erfindung ist
30 typischerweise in der Lage, mit den DCs die Sensorzellen des Immunorgans Haut direkt durch den Haarfollikel als Eintrittspforte zu adressieren und zusätzlich durch ein TLR-basiertes Adjuvans zu stimulieren.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Offenbarung betrifft ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin, im Folgenden auch als eine Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine bezeichnet, sowie Verwendungen und Verfahren, die auf diesem Vakzin beruhen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue topische Vakzine, die mit Hilfe eines Partikel-basierten Trägersystems gezielt die dendritischen Zellen (DC) der Haut über den Haarfollikel als Eintrittspforte adressieren und damit eine effektive prophylaktische und/oder therapeutische T-Zell-vermittelte Immunität induzieren.

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Zusammensetzung eines solchen Vakzins aus Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen und Helfer-T-Zellen sowie die Verwendung von synthetischen Analoga bakterieller Lipopeptide als TLR-basierte Adjuvantien für die Verstärkung der spezifischen Immunantwort.

- 15 Eine Kombination der Vakzinkomponenten wird an mikro- und/oder nanoskaligen Trägerpartikeln immobilisiert, nach Auftragen auf die Haut durch diese in einem aktiven Transportprozess in die Haarfollikel befördert und dort temporär deponiert. Die unter den physiologischen Bedingungen im Haarfollikel freigesetzten Wirkstoffe diffundieren zu den Zielstrukturen in der Haut, stimulieren die Zelloberflächenrezeptoren der DCs und induzieren eine gezielte Vakzinantigen-spezifische T-zelluläre Immunantwort.

- 20 Das neue topische Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine und dessen Formulierungen eignet/eignen sich als Arzneimittel einerseits zur Vorbeugung und andererseits zur Behandlung von Erkrankungen wie Infektionen, Krebs, Autoimmunkrankheiten, chronischen Entzündungen und Allergien bei Mensch und Tier.

- 25 In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin bereit. Das Vakzin weist Grundkomponenten als einzelne Moleküle oder Konjugate auf. Das Vakzin weist eine erste Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen handelt. Das Vakzin weist eine zweite Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für Helfer-T-Zellen handelt. Ferner weist das Vakzin eine dritte Grundkomponente auf, bei der es sich um einen oder mehrere Immunmodulatoren zur Aktivierung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen handelt. Die Vakzinkomponenten sind an mikro- und/oder nanoskalige Trägerpartikel gekoppelt. Die mikro- und/oder nanoskaligen Trägerpartikel sind so gestaltet, dass sie nach topischer Applikation auf die Hautoberfläche aktiv in die Haarfollikel transportiert und dort temporär deponiert werden. Dadurch induzieren die Vakzinkomponenten über die Stimulierung der dendritischen Zellen der Haut eine T-Zell-vermittelte Immunität.
- 30

In einigen Ausführungsformen ist das Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin gemäß dem ersten Aspekt ein Vakzin zur medizinischen Verwendung. Das Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin ist in einigen Ausführungsformen zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Verwendung. In einigen Ausführungsformen ist das Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin ein Vakzin zur Verwendung in einem therapeutischen und/oder prophylaktischen Verfahren.

In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein prophylaktisches und/oder therapeutisches Verfahren bereit, bei dem ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin eingesetzt wird. Das Verfahren umfasst Induzieren einer T-Zell-vermittelte Immunität. Das Induzieren einer T-Zell-vermittelten Immunität erfolgt durch Stimulieren der dendritischen Zellen der Haut durch das Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin. Das Vakzin weist Grundkomponenten als einzelne Moleküle oder Konjugate auf. Das Vakzin weist eine erste Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen handelt. Das Vakzin weist eine zweite Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für Helfer-T-Zellen handelt. Ferner weist das Vakzin eine dritte Grundkomponente auf, bei der es sich um einen oder mehrere Immunmodulatoren zur Aktivierung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen handelt. Die Vakzinkomponenten sind an die mikro- und/oder nanoskaligen Trägerpartikel gekoppelt. Typischerweise ist das Vakzin ein Vakzin gemäß dem ersten Aspekt. Das Verfahren umfasst des Weiteren typischerweise ein topisches Applizieren des Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins auf die Hautoberfläche eines Subjekts. Das Verfahren umfasst ferner, dass zugelassen wird, dass die mikro- und/oder nanoskaligen Partikel aktiv in die Haarfollikel transportiert werden. Darüber hinaus umfasst das Verfahren, dass zugelassen wird, dass die mikro- oder nanoskaligen Partikel in den Haarfollikeln temporär deponiert werden. Dadurch induzieren die Vakzinkomponenten über die Stimulierung der dendritischen Zellen der Haut eine T-Zell-vermittelte Immunität.

Das Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt ist typischerweise ein Verfahren zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung einer Erkrankung eines Subjekts, d.h. einer Erkrankung bei Mensch und/oder Tier. In einigen Ausführungsformen ist das Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt ein Verfahren zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung einer Erkrankung bei Mensch und/oder Tier, die mit Infektionen, Krebs, einer Autoimmunerkrankung oder einem entzündlichen und/oder allergischen Leiden in Zusammenhang steht. In einigen Ausführungsformen ist das Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt ein Verfahren zur prophylaktischen spezifischen Immunisierung gegen und/oder zur therapeutischen Vakzinierung bei einer Erkrankung. In einigen Ausführungsformen ist das Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt ein Verfahren zur Unterstützung einer konventionellen Impfung. In einigen Ausführungsformen ist das Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt ein

Verfahren zur Verstärkung der Immunantwort nach einer durch konventionelle Impfverfahren durchgeführten Vakzinierung.

In einem verwandten dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Impfen eines Subjekts bereit. Das Verfahren umfasst, einem Subjekt eine pharmazeutisch akzeptable Qualität einer Mikro- und/oder Nanopartikel-Zusammensetzung zu verabreichen. Das Verfahren umfasst typischerweise ein topisches Applizieren der Mikro- und/oder Nanopartikel-Zusammensetzung auf die Hautoberfläche eines Subjekts. Typischerweise ist das Verabreichen der Mikro- und/oder Nanopartikel-Zusammensetzung ausreichend, um eine Immunantwort des Subjekts auszulösen. Die Mikro-/Nanopartikel-Zusammensetzung weist Mikro- und/oder Nanopartikel auf. An die Mikro- und/oder Nanopartikel sind Grundkomponenten der Mikro- und/oder Nanopartikel-Zusammensetzung gekoppelt. Die Grundkomponenten liegen als einzelne Moleküle oder als Konjugate vor. Die Mikro-/Nanopartikel-Zusammensetzung weist eine erste Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen handelt. Die Mikro- und/oder Nanopartikel-Zusammensetzung weist eine zweite Grundkomponente auf, bei der es sich um eine oder mehrere Antigen-Determinanten für Helfer-T-Zellen handelt. Ferner weist die Mikro-/Nanopartikel-Zusammensetzung eine dritte Grundkomponente auf, bei der es sich um einen oder mehrere Immunmodulatoren zur Aktivierung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen handelt. Typischerweise ist die Mikro-/Nanopartikel-Zusammensetzung ein Vakzin gemäß dem ersten Aspekt. Das Verfahren umfasst ferner, dass zugelassen wird, dass die Mikro- und/oder Nanopartikel aktiv in die Haarfollikel transportiert werden. Darüber hinaus umfasst das Verfahren, dass zugelassen wird dass die Mikro- und/oder Nanopartikel in den Haarfollikeln temporär deponiert werden. Dadurch können die Grundkomponenten der Mikro-/Nanopartikel-Zusammensetzung über die Stimulierung der dendritischen Zellen der Haut eine T-Zell-vermittelte Immunität induzieren.

In einem vierten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein pharmazeutisches Präparat bereit. Das pharmazeutische Präparat enthält ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin gemäß dem ersten Aspekt allein oder in Kombination. Das Präparat liegt in einer zur topischen Applikation geeigneten Formulierung vor. Typischerweise enthält das pharmazeutische Präparat eine therapeutisch effektive Menge des Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins.

In einigen Ausführungsformen liegt das pharmazeutische Präparat gemäß dem vierten Aspekt als Paste, Salbe, Creme, Lotion, Emulsion, Gel, Hydrogel, Suspension, Lösung, Spray oder Pflaster vor. Ein solches Präparat enthält in einigen Ausführungsformen weitere Bestandteile wie anderweitig therapierelevante pharmazeutische Wirkstoffe und Adjuvantien sowie weitere pharmazeutisch geeignete Inhaltsstoffe. Beispiele weiterer pharmazeutisch geeigneter Inhaltsstoffe umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Trägersubstanzen, Hilfs- und/oder Zusatz-

stoffe wie z.B. Detergentien, Stabilisatoren und Konservierungsmittel. Derartige weitere Bestandteile, die im Präparat enthalten sein können, können gemischt, gelöst oder mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert sein.

In einem fünften Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins gemäß dem ersten Aspekt oder eines pharmazeutischen Präparates gemäß dem vierten Aspekt für eine medizinische Indikation.

Eine solche medizinische Indikation kann eine Erkrankung wie z.B. eine Infektion, Krebs, eine Autoimmunerkrankung oder ein entzündliches und/oder allergisches Leiden sein. In einigen Ausführungsformen betrifft die Verwendung eines Mikro-/Nanopartikel-Vakzins oder eines pharmazeutischen Präparates gemäß dem fünften Aspekt eine prophylaktische spezifische Immunisierung gegen eine Erkrankung und/oder die therapeutische Vakzinierung bei einer Erkrankung. In einigen Ausführungsformen betrifft die Verwendung die Verstärkung der Immunantwort nach einer durch konventionelle Impfverfahren durchgeführten Vakzinierung.

In einigen Ausführungsformen betrifft die Verwendung die Herstellung eines Arzneimittels für Mensch und/oder Tier zur Immunisierung. Eine solche Immunisierung kann eine prophylaktische spezifische Immunisierung gegen eine Erkrankung sein. Eine solche Immunisierung kann auch eine therapeutische Vakzinierung bei einer Erkrankung sein. Des Weiteren kann eine solche Immunisierung zur Verstärkung der Immunantwort nach einer durch ein konventionelles Impfverfahren durchgeführten Vakzinierung sein.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 Prinzip der pH-Wert getriggerten Adsorption und Desorption der durch einen Ladungs-Tag polarisierten Vakzinkomponenten auf einem im LBL[®]-Verfahren mit geladenen Polymeren beschichteten Trägerpartikel. Die Freisetzung der Vakzinkomponenten erfolgt durch Umladung der obersten Polymerschicht in Abhängigkeit vom pH-Wert, in deren Folge die elektrostatische Anziehung aufgehoben wird.

Fig. 2 Abhängigkeit der Beladung der Trägerpartikel von der Reihenfolge der Zugabe der Vakzinkomponenten und der Verweildauer in der Beladungslösung bei sequentieller Zugabe (GILG = GILGFVFTL-KKKKK-Fluoreszein, SEQ-ID-NO: 11 gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein, P2C = Pam₂Cys-GDPKHPKSF-KKKKK-Tamra, SEQ-ID-NO: 9 gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Tamra, Cha = aK-L-Cha-VAAWTLKAAa-Aca-C-KKKKK-Cy5, SEQ-ID-NO: 10 gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy5).

- Fig. 3 Freisetzungskinetik der drei Vakzinkomponenten GILGFVFTL-KKKKK-Fluoreszein (GILG), Pam₂Cys-GDPKHPKSF-KKKKK-Tamra (P2C) und aK-L-Cha-VAAWTLKAAa-Aca-C-KKKKK-Cy5 (Cha) nach Überführung in eine 10 mM Acetatpuffer-Lösung pH 5 mit Zusatz von 0,1 M Natriumchlorid (1%-ige Suspension).
- 5 Fig. 4 Schematische Zeichnung eines mit den einzelnen Vakzinkomponenten beladenen Trägerpartikels. Die Zahl der Komponenten, die Beladung der Partikel sowie die realen stöchiometrischen Verhältnisse sind entsprechend dem Wirkspektrum der Vakzine variabel einstellbar (beispielhaft für die Antigen-Determinanten sind die Epitope dargestellt).
- 10 Fig. 5 Schematische Zeichnung eines mit einem Konjugat der Vakzinkomponenten beladenen Trägerpartikels. Die Beladung der Partikel ist entsprechend dem Wirkspektrum der Vakzine variabel einstellbar (beispielhaft für die Antigen-Determinanten sind die Epitope dargestellt).
- 15 Fig. 6 Penetration der Mikro-/Nanopartikel-Vakzine in den Haarfollikel des Schweineohr-Modells (Laser-Scan-Mikroskopische Aufnahme der Kryoschnitte) 60 min nach Auftragen auf die Haut. Das mit Rhodamin markierte Epitop GILGFVFTL-K₄ dringt nach Ablösen von einem Silika-Trägerpartikel (mit Cy5 markiert) weiter in den Haarfollikel ein.
- 20 Fig. 7 Penetrationstiefe der Silika-Trägerpartikel in Abhängigkeit von der Partikelgröße im Vergleich zur Länge der Terminalhaar-/Vellushaar-Follikel. Die Zielregion Infundibulum ist bei ca. 600 µm Tiefe erreicht.
- Fig. 8 Anreicherung und Aufenthaltsdauer der Silika-Trägerpartikel in den Haarfollikeln und im *Stratum corneum*.
- 25 Fig. 9 Auswirkung der Oligoaminosäure-Tags auf die immunologische Aktivität des CTL-Epitops GILGFVFTL im Zytotoxizitäts-Assay mit der humanen CD8-T-Zelllinie 10-21A und der B-lymphoblastoiden Zielzelllinie JY (Titration im Radiochromfreisetzung-Assay). Im Insert sind die nach Clark transformierten Werte dargestellt. Die funktionellen Aviditätswerte in der Tabelle geben die Peptidkonzentration für halbmaximale Zytolyse an. Die Faktoren für die Aktivitätsverluste sind auf die funktionelle Avidität
- 30 des ungetagten Peptids bezogen.
- Fig. 10 Vergleich der immunologischen Aktivität der Partikel-gebundenen und der freien Einzelkomponenten im ELISpot-Assay auf IFN-γ mit humanen CD8-T-Zellen.

Fig. 11 Titration der immunologischen Aktivität von Gemischen der Partikel-gebundenen und der freien Vakzinkomponenten im ELISpot-Assay auf IFN- γ mit humanen CD8-T-Zellen (Ordinate: optische Einheiten der densitometrischen Messung).

5 Fig. 12 Differenzierung und Reifung von DCs unter Verwendung von Gemischen unterschiedlich beladener Trägerpartikel anhand der Expression der kostimulatorischen Zelloberflächenmoleküle CD80 (A) und CD86 (C) sowie des DC-Aktivierungsmarkers CD83 (B). Komponenten in Klammern wurden zusammen an einen Silika-Trägerpartikel gekoppelt.

10 Fig. 13 Aktivierung von DCs unter Verwendung von Gemischen unterschiedlich beladener Trägerpartikel anhand der Expression der kostimulatorischen Zelloberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 und HLA-DR sowie des DC-Aktivierungsmarkers CD83. Komponenten in Klammern wurden zusammen an einen Trägerpartikel gekoppelt. TNF- α , IL-1- β und IL-6 ist ein inflammatorischer Zytokin-Cocktail als Positiv-Kontrolle.

15 Fig. 14 Differentielle biologische Effekte bei der Induktion von T-Zellen und Zusammenwirken des Helfer-T-Zell-Epitops PADRE und des Immunmodulators P2C bei der Proliferation und Differenzierung von naïven T-Zellen durch mit Mikro-/Nanopartikel-Vakzinen aktivierte DCs. TNF, IL-4 und IL-6 ist ein inflammatorischer Zytokin-Cocktail als Positiv-Kontrolle (oben: Anteil gebildeter Gedächtnis-T-Zellen, unten: Proliferationsrate).

20 Fig. 15 Differentielle biologische Effekte bei der Induktion von T-Zellen und Zusammenwirken des Helfer-T-Zell-Epitops PADRE und des Immunmodulators P2C bei der Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch mit Mikro-/Nanopartikel-Vakzinen aktivierte DCs. TNF, IL-4 und IL-6 ist ein inflammatorischer Zytokin-Cocktail als Positiv-Kontrolle (Proliferationsrate).

25 Fig. 16 Induktion Antigen-spezifischer T-Zellreaktionen durch verschiedene Kombinationen der Vakzinkomponenten auf Silika-Partikeln am Beispiel des CMV-Epitops NLVPMVATV (SEQ ID NO: 6), nachgewiesen anhand der rekombinanten tetramersierten MHC-Peptidkomplexe.

30 Fig. 17 Induktion Antigen-spezifischer T-Zellreaktionen durch verschiedene Kombinationen der Vakzinkomponenten auf Silika-Partikeln am Beispiel des Influenza-Epitops GILGFVFTL, nachgewiesen anhand der rekombinanten tetramersierten MHC-Peptidkomplexe.

Detaillierte Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin sowie dessen Anwendung. Dieses Vakzin umfasst ein Mikro- oder Nanopartikel, an das immunologisch aktive Komponenten gekoppelt sind. Das Vakzin kann auch sowohl ein Mikro- als auch ein Nanopartikel aufweisen, an das immunologisch aktive Komponenten gekoppelt sind. In einigen Ausführungsformen handelt es sich bei dem Vakzin um ein Nanopartikel, an das drei im Folgenden näher definierte Grundkomponenten gekoppelt sind. Typischerweise weist da Vakzin eine Mehrzahl an Mikro- und/oder Nanopartikeln, an das immunologisch aktive Komponenten gekoppelt sind.

Der Begriff „Mikropartikel“ wie hier verwendet bezeichnet jedes Partikel, das in einer oder mehr Dimensionen eine Ausdehnung von etwa 5000 nm oder weniger hat, wie beispielsweise eine Ausdehnung, z.B. einen Durchmesser, im Bereich von etwa 500 nm bis etwa 3000 nm, im Bereich von etwa 500 nm bis etwa 2000 nm, im Bereich von etwa 500 nm bis etwa 1000 nm, im Bereich von etwa 700 nm bis etwa 1500 nm, im Bereich von etwa 500 nm bis etwa 800 nm oder im Bereich von etwa 600 nm bis etwa 900 nm. Der Begriff „Nanopartikel“ wie hier verwendet bezeichnet jedes Partikel mit einer Ausdehnung in einer oder mehr Dimensionen, z.B. einen Durchmesser, von etwa 500 nm oder weniger, wie von etwa 400 nm oder weniger, von etwa 300 nm oder weniger, beispielsweise im Bereich von etwa 1 nm bis etwa 500 nm, von etwa 5 nm bis etwa 450 nm, von etwa 1 nm bis etwa 250 nm oder von etwa 10 nm bis etwa 150 nm. Ein solches Mikro- und ein solches Nanopartikel ist geeignet dimensioniert, um zu Haarfolikeln transportiert werden zu können (s.u.).

Ein Partikel, das in einem Vakzin gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten ist, weist typischerweise in einer oder mehr Dimensionen eine Ausdehnung von etwa 5000 nm oder weniger hat, wie beispielsweise eine Ausdehnung, z.B. einen Durchmesser, von etwa 3000 nm oder weniger, einen Durchmesser von etwa 1000 nm, einen Durchmesser von etwa 700 nm oder weniger, von etwa 500 nm oder weniger, von etwa 250 nm oder weniger, etwa 100 nm oder weniger, etwa 80 nm oder weniger, etwa 60 nm oder weniger, etwa 50 nm oder weniger, etwa 35 nm oder weniger oder etwa 35 nm oder weniger. Beispielsweise kann ein Mikro- oder Nanopartikel eine maximale Ausdehnung im Bereich von etwa 1 nm bis etwa 1000 nm haben wie etwa 1 nm bis etwa 500 nm oder etwa 1 nm bis etwa 100 nm. Zu Beispielen von Nanopartikeln zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, ein Nanokristall, eine Nanosphäre, ein Nanostab, eine Nanoschale (engl. Nanocup) oder ein Nanofilament wie eine Nanoröhre oder ein Nanodraht. Typischerweise ist ein Nanopartikel, ebenso wie ein Mikropartikel gemäß der Erfindung ein anorganisches Partikel. Ein Mikro- und/oder Nanopartikel kann jedes geeignete Material enthalten – oder daraus bestehen – wie z.B. Kohlenstoff, ein

Halbmetall wie Bor, Germanium oder Silizium, oder ein Metall wie Gold, Silber oder Kupfer, inklusive einer Legierung daraus oder ein Polymer.

Ein entsprechendes Mikro- und/oder Nanopartikel kann von beliebiger Oberflächenbeschaffenheit sein. Beispielsweise kann ein Mikro- und/oder Nanopartikel eine polare oder eine unpolare Oberfläche aufweisen und somit hydrophil oder hydrophob sein. Hydrophobes Material ist wasserabweisend bzw. zeigt die Tendenz, sich von Wasser zu trennen. Typischerweise hat hydrophobes Material eine gleichmässige Elektronendichteverteilung. Hydrophobes Material enthält demgegenüber Moleküle oder Bereiche, die mit Wassermolekülen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eingehen können und die somit eine hohe Benetzbarkeit für Wasser haben.

Eine Verwendung oder ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, das auf dem Einsatz der Mikro- und/oder Nanopartikel basiert, kann an jedem Subjekt, wie z.B. an einem Säugetier erfolgen bzw. durchgeführt werden. Zu Beispielen eines geeigneten Säugetiers zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, eine Maus, ein Kaninchen, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Hamster, ein Hund, eine Kuh, ein Schwein, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Rhesusaffe, ein Schimpanze, ein Gorilla oder ein Mensch. Eine Verwendung oder ein Verfahren nach der Erfindung adressiert direkt die Sensorzellen eines der wichtigsten Organe des Immunsystems, nämlich die DCs der Haut einschließlich der Langerhans-Zellen.

DCs haben in ihrer Rolle als Vermittler der Immunität zwei zeitlich voneinander klar abgrenzbare Schlüsselfunktionen. Als unreife Zellen sind sie zuständig für die Aufnahme und Verarbeitung von Antigenen. Nur wenig später nach der Aktivierung sorgen sie dann als reife Zellen für die Stimulierung hauptsächlich von T-Zellen und indirekt über die T-Zellen auch von B-Zellen, indem sie diesen das prozessierte Antigen in Form von MHC-Peptid-Komplexen, zusammen mit kostimulierenden Molekülen, an ihrer Oberfläche präsentieren und gleichzeitig Zytokine freisetzen, welche die Immunantworten unterstützen und stabilisieren. Gleichsam als Wachposten und Alarmgeber des Immunsystems üben sie somit eine übergeordnete Kontrollfunktion über die eigentlichen Akteure der zellulären Immunantwort aus. Hierbei ist nur eine DC notwendig, um 100 bis 3.000 Antigen-spezifische T-Zellen zu aktivieren.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Immunantworten zu induzieren, zu verstärken sowie ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, sind die DCs ein wichtiges zelluläres Hilfsmittel für die Immuntherapie geworden. Durch neue Ansätze für die vollständige Aktivierung und Differenzierung dieser immunkompetenten Zellen kann die Effizienz prophylaktischer und therapeutischer Vakzine entscheidend erhöht werden, da nur gereifte DCs eine spezifische T-Zell-basierte zytotoxische Immunantwort sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine

auslösen können. Gleichzeitig sind reife DCs in der Lage, die Wirkung durch Tumore gebildeter immunsuppressiver Faktoren aufzuheben.

Eine spezielle Form der DCs sind die Langerhans-Zellen. Es handelt sich hierbei um noch inaktive antigenpräsentierende Zellen, die in der Epidermis der Haut ein durchgängiges Netzwerk bilden. Nach Kontakt mit dem Antigen erfolgt ihre Aktivierung und Differenzierung zu reifen DCs, die die Antigene in die regionären Lymphknoten transportieren und dort an die T-Lymphozyten präsentieren.

Vor diesem Hintergrund sind die DCs der Haut ideale Zielstrukturen für eine topische Vakzinierung.

Als Eintrittspforte für die topischen Vakzine ist der Haarfollikel besonders gut geeignet, da die Epidermis in diesem Bereich mit einem besonders dichten Netz immunkompetenter Zellen durchzogen ist, das der Überwachung und Abwehr von durch die im Haarfollikel nicht geschlossene Hautbarriere eindringenden Fremdstoffe dient.

Mit den üblichen Verfahren zur topischen Vakzinierung ist es bisher jedoch nicht gelungen, diese Strukturen für die Überwindung der Hautbarriere zu nutzen. Alle bisher bekannten Verfahren basieren auf einer Penetration der Wirkstoffe direkt durch die Hornschicht der Haut oder auf der Penetration von mikro- oder nanoskaligen partikulären Antigenen direkt in die DCs der Haut, in den meisten Fällen nach chemischer oder physikalischer Vorschädigung oder Quellung der Haut. Für solide Partikel konnte zwar eine Penetration in die Haarfollikel nachgewiesen werden. Für den Durchtritt in den Bereich der lebenden Zellen ergaben sich jedoch keine Hinweise (Lademann et al. 2009).

Um so überraschender ist es, dass es mit dem System der erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine erstmals gelungen ist, Träger-gebundene Wirkstoffe durch gezielte Ausnutzung eines natürlichen Transportmechanismus in den Haarfollikel und damit in die tieferen Schichten der Epidermis, wie z.B. das *Stratum spinosum*, zu befördern. In dieser Hinsicht sind die Mikro- und/oder Nanopartikel eines Vakzins der vorliegenden Erfindung typischerweise so konfiguriert, dass es nach Verabreichen durch Auftragen auf die Hautoberfläche zugelassen werden kann, dass die Nanopartikel in die Haarfollikel transportiert werden. An die Mikro- und/oder Nanopartikel gekoppelte Bestandteile des Vakzins erreichen somit ebenfalls den Haarfollikel. Ferner kann in Ausführungsformen der Erfindung zugelassen werden, dass die Mikro- und/oder Nanopartikel für einen bestimmten Zeitraum im Haarfollikel verbleiben (s.u.).

In dieser Region befindet sich die höchste Dichte an immunkompetenten Zellen der Haut, sodass die Vakzinkomponenten in unmittelbare Nähe zu den Zielstrukturen gelangen und nach Ablösung vom Trägerpartikel nur ein kurzes Stück diffundieren müssen.

Den Trägerpartikeln kommt dabei typischerweise eine vierfache Funktion zu. Erstens ermöglichen sie als Vektoren für eine effiziente Zielfindung der Vakzine den aktiven Transport in die Haarfollikel unter Nutzung eines biomimetischen Prinzips. Zweitens organisieren sie als multifunktionale Träger die molekularen Einzelkomponenten der Vakzine in hoch-wirksamer räumlicher Nähe zueinander. Drittens fungieren sie nach erfolgtem Transport als Modulatoren der gezielten Freisetzung der Vakzin-komponenten. Viertens verstärken sie durch die multivalente Organisation der Vakzinkomponenten deren Wirkung. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festzulegen, konnte in den Untersuchungen überraschend gefunden werden, dass durch die Bewegung des Haares im Haarfollikel eine Art Pumpmechanismus in Gang gesetzt wird, der den Transport von Partikeln in den Haarfollikel bewirkt. Es wird angenommen, dass für diesen rein mechanischen Effekt die partikuläre Struktur der Trägermaterialien sowie das Einmassieren essentiell sind. Der Transportmechanismus ist umso effektiver, je besser die Partikelgröße und die Schuppendichte des Haares aufeinander abgestimmt sind. Es wird angenommen, dass die Struktur und die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel einen geringeren Einfluss haben.

Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festzulegen, wird angenommen, dass zum Erreichen einer immunologisch relevanten Tiefe in den Haarfollikel insbesondere die Dimension des/der Mikro-/Nanopartikel bedeutend ist/sind. Es konnte gezeigt werden, dass ein oder mehrere Partikel, insbesondere ein oder mehrere sphärische(s) Partikel, in einem Größenbereich von 100 nm - 3.000 nm, beispielsweise 300 nm - 1.500 nm (supra), besonders gut geeignet ist/sind, um die verschiedenen Vakzinkomponenten durch den beschriebenen Pumpmechanismus an die optimale Position im Haarfollikel zu transportieren, wobei die Penetrationstiefe über die Partikelgröße eingestellt werden kann (Fig. 7). Bereits nach 1 h ist das Infundibulum in 600 µm Tiefe erreicht, wo sich beim menschlichen Terminalhaar die höchste Dichte an DCs der Haut befindet. Eine weitere Penetration innerhalb der folgenden 24 h ist unwesentlich für den Vakzinierungserfolg.

Außerdem konnte überraschend gefunden werden, dass zusätzlich zu dem Transport in den Haarfollikel eine Langzeitspeicherung der Trägerpartikel erfolgt (Fig. 8). Erst nach einem Zeitintervall von ca. 5 - 10 Tagen werden die Trägerpartikel typischerweise durch Sebumsekretion und Haarwuchs wieder aus dem Haarfollikel heraustransportiert, während die im *Stratum corneum* liegenden Partikel durch die kontinuierliche Abschilferung der Hornzellen relativ schnell wieder abgestoßen werden. Dies ermöglicht die Entwicklung retardierender topischer Formulierungen. Gleichzeitig ist über natürliche Prozesse garantiert, dass die Trägerpartikel wieder aus dem Haarfollikel heraustransportiert werden.

Die Möglichkeit einer transfollikulären Penetration der Partikel durch die Barriere des Haarfollikels in den Bereich der lebenden Zellen ist nicht auszuschließen, konnten aber bisher nicht

nachgewiesen werden. Ein solcher Übergang wurde nur nach Vorschädigung der Hautstruktur, beispielsweise durch Cyanacrylat-Abriss und für Partikelgrößen unterhalb 50 nm beobachtet. Lediglich die freigesetzten Wirkstoffe diffundieren in das Körpergewebe, wo sie die DCs als Zielstrukturen erreichen und eine spezifische Immunantwort auslösen.

- 5 Für die effektive Beladung der Trägerpartikel mit den Vakzinkomponenten, deren stabile Bindung und sicheren Transport in den Haarfollikel sowie die gezielte Freisetzung der weiterhin uneingeschränkt wirksamen Wirkstoffe an den Zielstrukturen, kann ein reversibler Kopplungsmechanismus auf der Basis physikalischer oder chemischer Wechselwirkungen genutzt werden.
- 10 In einigen Ausführungsformen kann hierbei eine reversible Adsorption auf der Grundlage von elektrostatischer Wechselwirkungen, van-der Waals-Bindungen, hydrophoben Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen. Beispielsweise kann zwischen einer polarisierten Oberfläche von Trägerpartikeln und geladenen Bereichen der Vakzinkomponenten eine Wechselwirkung eintreten, die zur Adsorption führt. Falls erforderlich, lassen sich
- 15 Bereiche mit negativer oder positiver Nettoladung in Vakzinkomponenten in Form von einem oder mehreren zusätzlichen molekularen Anhängseln, sogenannten Tags, einfügen.

Als Triggerung für die Freisetzung der Vakzinkomponenten am Zielort kann vorteilhafterweise der pH-Shift innerhalb des Haarfollikels genutzt werden. Es wurden Partikel konstruiert, deren Oberflächenpotential (ζ -Potential) sich in Abhängigkeit vom pH-Wert in der Weise ändert,

20 dass die Vakzinkomponenten während der Beladung und des Transports stabil an den Trägerpartikel binden und unter den physiologischen Bedingungen in den Haarfollikeln wieder desorbieren.

Dazu wurden in exemplarischen Ausführungsformen Partikel im Layer-by-Layer (LBL) Verfahren beschichtet. Die LBL[®]-Technologie nutzt die elektrostatische Wechselwirkung

25 zwischen geladenen Polymeren (Polyelektrolyten) und Oberflächen. Durch Adsorption von einem oder mehreren Polymeren an entgegengesetzt geladenen Partikeloberflächen, in der vorliegenden Erfindung beispielsweise an Silika-Partikeln mit negativem Oberflächenpotential, findet eine Umladung der Partikel statt, wodurch sich die abgeschiedene Polymermenge von selbst auf eine Dicke von etwa 2 - 7 nm einreguliert. Für eine zweite Schicht lässt sich der

30 Vorgang entsprechend mit einem entgegengesetzt geladenen Polymer wiederholen. Auf diese Weise lassen sich beliebig viele Schichten auf Substraten aufbauen.

Es kann jedes biologisch verträgliche Polymer eingesetzt werden. Für die gegebene Anwendung haben sich als kationische Polymere Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH), Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDA) und Poly(acryloyloxyethyltrimethylammoniumchlorid)

(PAOET) sowie als anionische Polymere die Natriumsalze von Poly(vinylsulfat) (PVS), Sulfoethylcellulose und Polystyrolsulfonat (PSS) als besonders geeignet erwiesen.

In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können LBL[®]-Oberflächen mit 2 bis 20 Schichten eingesetzt werden, wobei für mindestens die äußerste Schicht ein schwaches Polyanion- bzw. Polykation verwendet wird, welches seine Ladung in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert, wie z.B. Chitosan, Polyvinylpyridin, Polyvinylcarbazol, Polyacrylat (PAA) oder Polymethacrylat (PMAA). Auch natürliche Proteine sind in Abhängigkeit von ihrem isoelektrischen Punkt als pH-schaltbare Materialien geeignet.

Für die Polarisierung der Vakzinkomponenten können diese mit einem Tag, d.h. einem Anhängsel, versehen werden, das geladene Molekülbereiche wie etwa Aminosäuren aufweist. Aminosäuren sind als organische Moleküle bekannt, die eine Carbonsäuregruppe (Carboxylgruppe) und eine Aminogruppe aufweisen. typischerweise α - oder β -Aminosäuren. Beispielsweise kann ein Anhängsel etwa zwei bis 20, etwa drei bis 15 oder etwa 4 - 10 geladene α -Aminosäuren aufweisen oder aus solchen Aminosäuren aufgebaut sein. Es lassen sich beliebige Aminosäuren einsetzen, inklusive natürlich vorkommenden Aminosäuren und Isomeren davon. Ein Anhängsel, das unter physiologischen Bedingungen über eine positive oder negative Ladung verfügt, wird im Folgenden auch als Ladungs-Tag bezeichnet. In einigen Ausführungsformen ist ein solches Anhängsel über ein Peptidsegment mit einer Länge bis zu etwa 8 Aminosäuren, z.B. 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 Aminosäuren, an eine Vakzinkomponente gekoppelt. Ein entsprechendes Peptidsegment kann auch als Spacer bezeichnet werden. Ein solcher Ladungs-Tag enthält eine oder mehrere Aminosäuren, die eine Seitenkette aufweisen, die unter physiologischen Bedingungen über eine positive oder negative Gesamtladung verfügen oder besteht aus solchen Aminosäuren. Eine chemische Gruppe oder eine Aminosäure mit einer positiven Gesamtladung unter physiologischen Bedingungen wird auch als basische Gruppe bzw. Aminosäure bezeichnet. Eine chemische Gruppe oder eine Aminosäure mit einer negativen Gesamtladung wird auch als saure Gruppe bzw. Aminosäure bezeichnet.

In einigen Ausführungsformen können die basischen Aminosäuren Lysin-, 5-Hydroxy-Lysin, Pyrrolysin, Hypusine(N6-(4-Amino-2-hydroxybutyl)-lysin), Histidin, Ornithin und/oder Arginin als unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Aminosäuren eingesetzt werden. Die Gegenwart solcher Aminosäure-Einheiten können für eine positive Polarisierung dienen. Glutaminsäure- Asparaginsäure- oder Sulfotyrosin-Einheiten sind illustrative Beispiele für Aminosäuren, die für eine negative Polarisierung zum Einsatz kommen können. Sie können gewährleisten, dass sich die Vakzinkomponenten in Analogie zu den Polymeren an den entgegengesetzt geladenen Partikeln anlagern und bei pH-bedingter Umladung der Partikeloberfläche wieder desorbiert werden.

Die Länge und Zusammensetzung der Ladungs-Tags sowie ein gegebenenfalls einzufügender Spacer müssen individuell auf die jeweilige Vakzinkomponente zugeschnitten werden, da diese Moleküle sterisch behindert sein oder weitere Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen, mit den Polymeroberflächen eingehen können. Zudem sind die Kapazität und die Effektivität des Beladungsvorganges sowie die Ablösekinetik durch Modifikation der Ladungs-Tags individuell einstellbar.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung haben sich (PAH/PSS)₂PAH/PMAA-beschichtete Silika-Partikel als besonders geeignet erwiesen. Während die Beladung der LBL[®]-Partikel in einigen Ausführungsformen unter basischen Bedingungen stattfindet, erfolgt die Desorption der Vakzinkomponenten in solchen Ausführungsformen typischerweise nach dem Transportprozess im sauren Milieu des Haarfollikels und umgekehrt. Durch die erhöhte Wasserstoffionen-Konzentration kommt es unterhalb von etwa pH7 zur Protonierung der PMAA⁻-Gruppen, wodurch sich die äußere LBL[®]-Schicht entlädt bzw. durch die darunter gelegene PAH-Schicht wieder kationisch auflädt. Das führt zur Abstoßung der positiv polarisierten Vakzinkomponenten von der Partikeloberfläche (Fig. 1). Einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Freisetzung der Vakzine hat die erhöhte Salzkonzentration im Haarfollikel.

Mit diesem Verfahren ließen sich typischerweise zwischen 20 µg und 150 µg der einzelnen, mit entsprechenden Oligoaminosäure-Tags modifizierten Vakzinkomponenten pro 1 mg von Silika-Trägerpartikeln adsorbieren. Mit der zugegebenen Menge, der Adsorptionszeit, der Tag-Länge sowie der Tag-Struktur kann die Beladung für jede Vakzinkomponente individuell eingestellt werden. Dadurch ist die stöchiometrische Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins entsprechend der individuellen medizinischen Indikation, der Applikationsform und des Wirkungsgrades der Vakzinkomponenten einstellbar (Ausführungsbeispiel B).

Neben der sortenreinen Beladung konnten für das erfindungsgemäße Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin auch die gleichzeitige Beladung eines Trägerpartikels mit verschiedenen, unterschiedlich wechselwirkenden Vakzinkomponenten in einem definierten molaren Verhältnis, sowie deren simultane und gleichmäßige Freisetzung am Wirkort, am Beispiel einiger Wirkstoffkombinationen realisiert werden.

Somit konnte mit den in den Ausführungsbeispielen beispielhaft beschriebenen LBL[®]-Partikeln ein System gefunden werden, welches die stabile, effektive und gleichmäßige Adsorption der Vakzinkomponenten sowie deren gleichmäßige Freisetzung im Haarfollikel ermöglicht. Insbesondere die Ausbeuten der im Haarfollikel freigesetzten Wirkstoffe in der Größenordnung von 30 - 90% der adsorbierten Menge, liegen in einer für die Vakzinierung ausreichenden Größenordnung. Unerwünschte Aggregationseffekte konnten durch entspre-

chende Beladungsverfahren, die Auswahl der Beschichtungsmaterialien sowie die Reihenfolge der Polymerschichten verhindert werden.

Durch die direkte Adressierung der immunkompetenten Zellen der Haut mit der Möglichkeit, zusätzlich zur Antikörper-vermittelten Immunität eine T-Zell-vermittelte Immunität zu induzieren, kann die Zusammensetzung der erfindungsgemäßen, typischerweise topischen, Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins auf ein Mindestmaß an Komponenten und geringste Mengen an Wirkstoffen beschränkt werden.

Für die in den Ausführungsbeispielen angeführten exemplarischen Untersuchungen wurde ein synthetisches Minimalvakzin eingesetzt, das zur Adressierung verschiedener synergistisch wirkender Targets, aus den folgenden essentiellen Grundkomponenten besteht:

- (i) Epitop für zytotoxische Effektor-T-Zellen (CTL),
- (ii) Epitop für Helfer-T-Zellen, beispielsweise ein Pan-DR-Epitop und
- (iii) bakterielles Lipopeptid als Immunmodulator.

Allgemein kann ein Vakzine gemäß der vorliegenden Erfindung sind diese Komponenten entsprechend der medizinischen Indikation austausch- und in beliebigem Verhältnis kombinierbar. Anstatt einzelner Epitope könnten beliebige Antigen-Determinanten für T-Zellen, wie z.B. mehrere Peptide, Polyepitope, Biopolymere oder auch andere Träger antigenen Information, wie eine Nukleinsäure, z.B. DNA oder RNA, ein Lipid und/oder ein Oligo- oder Polysaccharid, eingesetzt werden. Der Begriff „Antigen-Determinante“ bezeichnet eine oder mehrere Bereiche eines Antigens oder Haptens, die von einem Immunglobulin, einem T-Zell-Rezeptor oder einem Bindungsreagenz wie z.B. einem Lipocalinmucin gebunden werden kann. Eine Antigen-Determinante weist mindestens ein Epitop auf (s.u.). Die Antigen-Determinanten für CTL-Epitope werden entsprechend der gewünschten Immunisierung ausgewählt. Das Helfer-T-Zell-Epitop Pan-DR-E ist universell für alle HLA-DR-Allotypen, muss jedoch artspezifisch angepasst werden. Es kann vorteilhaft sein, wenn ein Vakzin eine Mehrzahl an Antigen-Determinanten/Epitopen enthält, um einen ausreichenden Impfschutz in einer immungenetisch heterogenen Population erreichen zu können.

Der Begriff „Nukleinsäure“ betrifft, wenn hier verwendet, jedwede Nukleinsäure in jeder möglichen Konfiguration, wie z.B. einzelsträngig, doppelsträngig oder eine Kombination daraus. Zu Nukleinsäuren zählen DNA-Moleküle, z.B. genomische DNA oder cDNA, RNA-Moleküle wie z.B. mRNA, Analoga von DNA oder RNA, die mittels Nukleotidanaloga oder durch chemische Nukleinsäuresynthese hergestellt sind, sowie z.B. PNA (engl. protein nucleic acid). Eine Nukleinsäure kann natürlich nicht vorkommende Nukleotidanaloga enthalten oder an eine Affinitätsanhangsel („Tag“) oder Label gekoppelt sein. Zahlreiche Nukleotidanaloga, die enthalten sein können, sind dem Fachmann bekannt. Ein Nukleotidanalogen ist

ein Nukleotid, das eine Modifikation an beispielsweise der Basen-, der Zucker- und/oder der Phosphatgruppe aufweist. Zur Veranschaulichung sei als Beispiel genannt, dass bekanntermaßen eine Substitution von 2'-OH-Resten von siRNA mit 2'-F-, 2'-O-Me- oder 2'-H-Resten die *in vivo*-Stabilität der betreffenden RNA erhöht. Zu Modifikationen an der Basengruppe zählen natürliche und synthetische Modifikationen von A, C, G und T/U, verschiedenen Purin- oder Pyrimidinbasen wie Uracil-5-yl, Hypoxanthin-9-yl, und 2-Aminoadenin-9-yl, sowie Nicht-Purin- oder Nicht-Purin-Basen. Andere Nukleotidanaloga dienen als universelle Basen. Zu universellen Basen zählen beispielsweise 3-Nitropyrrol und 5-Nitroindol. Universelle Basen sind in der Lage, mit jeder Base ein Basenpaar zu bilden. Oft können Basenmodifikationen mit beispielsweise einer Zuckermodifikation, z.B. 2'-O-methoxyethyl, kombiniert werden, beispielsweise um einzigartige Eigenschaften wie eine verbesserte Duplexstabilität zu erreichen.

Die dritte Grundkomponente eines Vakzins der vorliegenden Erfindung ist ein Immunmodulator, d.h. eine Verbindung, die die Immunantwort eines Subjekts aktiviert oder bremst bzw. hemmt. Ein Beispiel für einen Immunmodulator ist Immunstimulator-Lipopolysaccharid (LPS).

Ein anderes Beispiel für einen Immunmodulator ist ein kationisches Lipid und Lipid-Protamin-DNA, die in U.S. 7,303,881 offenbart ist. Ein weiteres Beispiel für einen Immunmodulator ist ein synthetisches bakterielles Lipopeptid. Lipopeptide sind Bestandteil der bakteriellen Zellwand und werden durch die Toll-Like-Rezeptoren TLR 1, 2, 6 und 10 der dendritischen und anderer immunkompetenter Zellen erkannt. Über eine biochemische Signalkaskade wird in den TLR-Trägerzellen ein entsprechender intrazellulärer Mechanismus, meist die Expression bestimmter, der Antigen-spezifischen Abwehr von Krankheitserregern dienender Gene, ausgelöst, der zur Differenzierung Erreger-spezifischer T-Zellen führt. Infolgedessen wird in der ersten Stufe der Infektionsabwehr die unspezifische Immunantwort initiiert, der im weiteren Verlauf die Reaktion durch das erworbene Immunsystem, mit der Bildung spezifischer Antikörper, folgt. Beispiele für ein synthetisches Analogon eines bakteriellen Lipopeptids mit immunstimulatorischer Wirkung sind z.B. in der deutschen Patentanmeldung DE 102009034779 A1 offenbart.

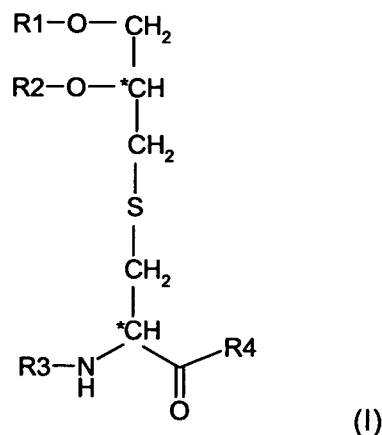
Der Einsatz des Lipopeptid-Immunmodulators kann besonders vorteilhaft sein, da mit einem erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin speziell die DCs der Haut adressiert werden, die über eine hohe Dichte aller TLR und in ihrer Wächterfunktion für die Eintrittspforte Haut über besonders effektive Mechanismen als erste Abwehrkette des angeborenen Immunsystems verfügen. Zudem sind die TLR für die Lipopeptide auf den Oberflächen der Zellen exprimiert sodass die Lipopeptide direkt, ggf. auch partikelgebunden auf die Zellen wirken können, ohne vorher aufgenommen zu werden.

Ein weiteres Beispiel eines Immunmodulators ist Murabutid (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamin-alpha-n-butyl-ester), ein Derivat des bakteriellen Muramyldipeptids. Zwei illustrative

und gut bekannte Beispiele für Immunmodulatoren, bei denen es sich um Immunsuppressoren handelt, sind Cyclosporin und Methotrexat. Zwei weitere hemmender Immunmodulatoren sind 4-(3-Chlorophenyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidin-2-amin (VAF347) und Fingolimod (FTY720, 2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propan-1,3-diol).

- 5 Durch die direkte Kopplung der Antigen-spezifischen Vakzinkomponenten mit dem immunmodulatorisch wirksamen Adjuvans, lässt sich eine hochgradig fokussierte Aufhebung des konditioniert immunsuppressiven Zustandes der Haut und damit eine deutliche Steigerung der durch das erfindungsgemäße Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin induzierten T-Zell-basier-
- 10 ten, spezifischen Immunantwort, erzielen. Dadurch wird die Möglichkeit immunologischer Nebenwirkungen weiter minimiert.

In einigen Ausführungsformen weist ein Lipopeptid-Immunmodulator gemäß der vorliegenden Erfindung folgende allgemeine Struktur (I) auf:



In der Strukturformel (I)

- 15 stehen R1 und R2, die gleich oder verschieden sein können, für einen gesättigten oder ungesättigten Acyl-Rest mit etwa 6 bis 28 C-Atomen oder etwa 7 bis etwa 25, wie z.B. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 C-Atomen, beispielsweise für einen gesättigten Acyl-Rest mit 16 C-Atomen,

- steht R3 für einen gesättigten oder ungesättigten Acyl-Rest mit etwa 6 bis 28 C-Atomen oder
 20 etwa 7 bis etwa 25, wie z.B. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 C-Atomen, beispielsweise für einen gesättigten Acyl-Rest mit 16 C-Atomen, oder H und

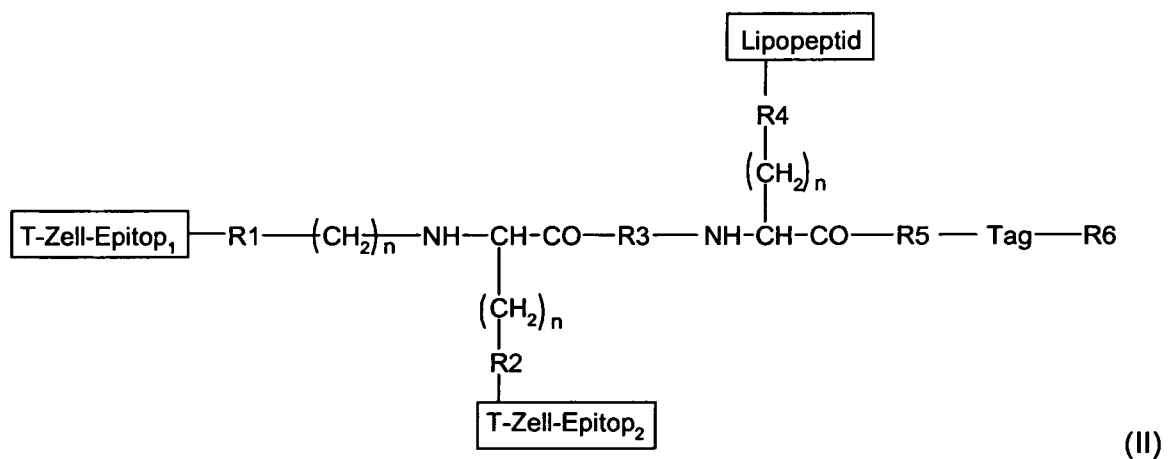
- steht R4 für ein aus 1 bis 25 Aminosäure-Resten, wie z.B. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 Aminosäure-Resten bestehendes, physiologisch verträgliches und in der behandelten Spezies nicht per se immunogenes Peptid,
 25 beispielsweise mit der Aminosäuresequenz GDPKHPKSF (SEQ ID NO: 1). Der Begriff „behandelte Spezies“ betrifft die Spezies, der das Subjekt angehört, das behandelt wird oder

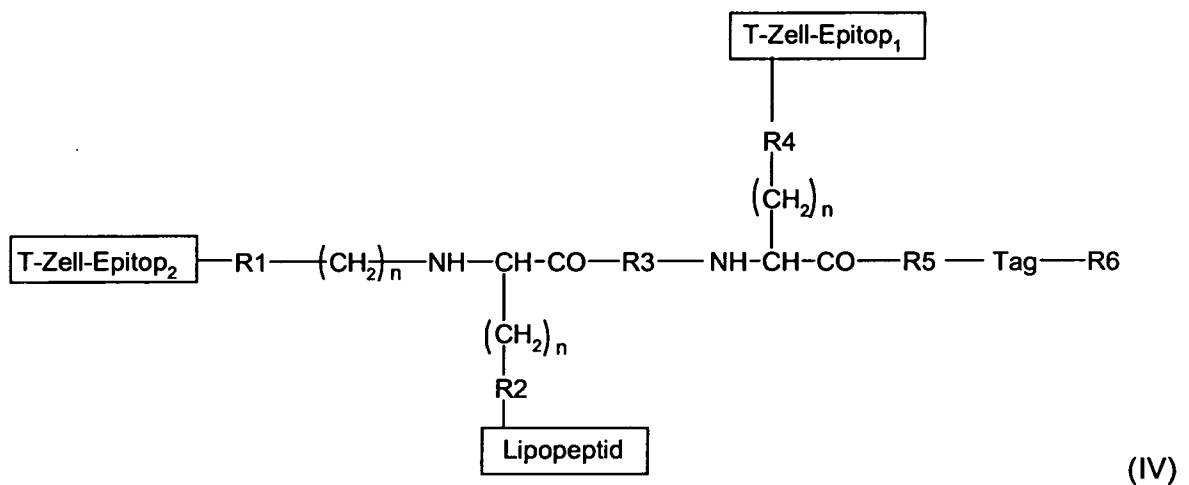
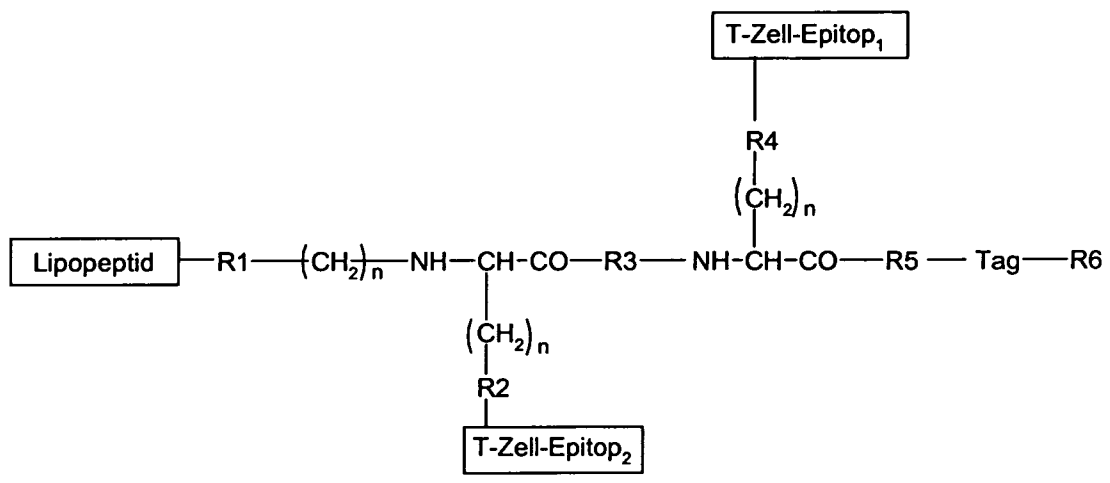
zu behandeln beabsichtigt ist, In diesem Zusammenhang ist auch der Einsatz anderer bekannter Adjuvantien, wie z.B. Squalen oder Aluminiumoxid, nicht ausgeschlossen.

Die Induktion der gewünschten immunologischen Reaktion ist grundsätzlich von der gleichzeitigen Gabe aller drei Komponenten abhängig, die jedoch je nach Situation und Antigen auf demselben oder verschiedenen Trägerpartikeln gekoppelt sein sollten (Ausführungsbeispiel D). In letzteren Fall besteht das Vakzin der Erfindung aus einer Mehrzahl an Mikro-/Nanopartikeln.

Zur gleichzeitigen Beladung eines Trägerpartikels mit mehreren Vakzinkomponenten kann jede Komponente über einen eigenen Ladungs-Tag an der polarisierten Partikeloberfläche gebunden werden (Fig. 4).

In einigen Ausführungsformen, beispielsweise wo peptidische Vakzinkomponenten vorliegen, sind zwei oder mehr Vakzinkomponenten durch eine kovalente Verknüpfung zu Konjugaten verbunden. Beispiele solcher Konjugate sind die folgenden allgemeinen Strukturen (II), (III) oder (IV).





In diesen Strukturformeln steht n jeweils für eine natürliche Zahl von 0 bis 8, beispielsweise 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7. R1, R2, R3, R4, R5 und R6 sind molekulare Einheiten, die gleich oder verschieden sein können. Typischerweise sind R1, R2, R3, R4, R5 und R6 unabhängig voneinander ausgewählte Peptidbereiche mit Aminosäuresequenzen, die eine Länge von 0 bis etwa 8 Aminosäuren aufweisen, wie etwa 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 Aminosäuren. Jeder derartige Peptidbereich kann als molekularer Abstandhalter dienen und kann dementsprechend als Aminosäure-Spacer bezeichnet werden. T-Zell-Epitop₁ und T-Zell-Epitop₂ stehen für eine Aminosäure-Sequenz eines Epitops für zytotoxische Effektor-T-Zellen oder eines Epitops für Helfer-T-Zellen. T-Zell-Epitop₁ und T-Zell-Epitop₂ können gleich oder verschieden sein.

Ein „Epitop“ ist antigenisch und kann somit als eine „antigenische Struktur“ oder eine „antigenische Determinante“ definierend aufgefasst werden. Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren können ein Epitop erkennen und binden. Ein Epitop ist auch ein Bereich eines Antigens, an das ein Immunglobulin, ein T-Zell-Rezeptor oder ein Bindungsreagenz wie z.B. ein Lipocalin-mutein binden kann. Ein Epitop ist ein Bereich eines Moleküls, der linear sein kann, d.h. eine Aminosäuresequenz enthält beispielsweise, in linear zusammenhängender Form, das vom

Immunoglobulin oder T- Zell-Rezeptor erkannte Epitop auf. Ein lineares Epitop enthält im Allgemeinen wenigstens drei, und typischerweise wenigstens etwa 5, z.B. 8 bis 10 Aminosäuren. Ein Epitop kann auch ein konformationsabhängiges Epitop sein, bei dem im Gegensatz zu einem linearen Epitop die primäre Aminosäuresequenz nicht die einzige Komponente des erkannten Epitops darstellt, da sie beispielsweise nicht als solche von einem Immunoglobulin oder T-Zell-Rezeptor erkannt werden kann. Ein Immunoglobulin, ein T-Zell-Rezeptor oder ein Bindungsreagenz wie z.B. ein Lipocalinmurein erkennen bei einem konformationsabhängigen Epitop eine dreidimensionale Struktur des Antigens. Ein konformationsabhängiges Epitop enthält typischerweise eine größere Anzahl an Aminosäuren als ein lineares Epitop. Ein konformationsabhängiges Epitop lässt sich beispielsweise durch Röntgenstrukturanalyse, zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Site-directed Spin Labeling und Elektronen-Paramagnetische Resonanzspektroskopie bestimmt werden.

In den Strukturformeln (II) bis (IV) steht Lipopeptid für einen Immunmodulator gemäß Formel (I), Tag steht für eine Folge von 4 bis 12, wie z.B. 4 - 10, inklusive etwa 5, etwa 6, etwa 7, etwa 8 oder etwa 9 basischen (positive Ladung) oder sauren (negative Ladung) Aminosäuren.

Ein solches Konjugat wird dann, wie in Fig. 5 dargestellt, über den Ladungs-Tag an dem polarisierten Trägerpartikel immobilisiert.

Für welche Vakzine solche oder ähnliche Konjugate vorteilhaft sind, ist abhängig von der medizinischen Indikation sowie den enthaltenen Vakzinkomponenten und Antigen-Determinanten. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die räumliche Nähe bestimmter Epitope in einigen Fällen vorteilhaft auf den Immunisierungserfolg auswirkt, in anderen Fällen aber keinen Einfluss hat.

Wie die Komponenten des Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins und dessen molare Verhältnisse, müssen auch die Form der Bindung an das Trägerpartikel (Ladungs-Tags, einzelne / gemischte Beladung) sowie die Art der Konjugation spezifisch eingestellt werden.

Ausgehend von diesen Untersuchungen konnte ein überraschend effektives System zur topischen Vakzinierung gefunden und gezeigt werden, dass die Vakzinkomponenten nach Applikation auf die Hautoberfläche mit Hilfe von mikro-/nanoskaligen Trägerpartikeln in einem aktiven Transportprozess und unter Nutzung eines biomimetischen Prinzips, in den Haarfollikel und somit in die unmittelbare Nähe der immunkompetenten Zellen der Haut gelangen, wo sie nach Diffusion zu den Zielstrukturen, den DCs der Haut, die gewünschte spezifischen T-zelluläre Immunantwort auslösen.

Dies überrascht um so mehr, als dass alle bisherigen topischen Impfstrategien von einer Notwendigkeit der direkten Penetration der Wirkstoffe durch die Haut ausgehen, teilweise

sogar den Transport durch die Haarfollikel als möglichen Weg zur Überwindung der Hautbarriere explizit ausschließen.

Weiter konnte überraschend festgestellt werden, dass durch die unmittelbare Anwesenheit des Lipopeptid-Immunmodulators in räumlicher Nähe zu den anderen Vakzinkomponenten, eine deutliche Steigerung der T-Zell-basierten spezifischen Immunantwort erzielt werden konnte.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin, das sich zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung eignet. Das Vakzin besteht mindestens aus den Grundkomponenten

- (i) eine oder mehrere Antigen-Determinanten für zytotoxische Effektor-T-Zellen (CTL-Epitope, Polyepitope, Biopolymere, Proteine, DNA, RNA, Polysaccharide, Glykolipide, Glykoproteine oder ähnliche Träger antigenen Informationen),
- (ii) eine oder mehrere Antigen-Determinanten für Helfer-T-Zellen, bevorzugt Pan-DR-Epitope als degenerierte Peptide für alle HLA-DR-Allotypen, und
- (iii) ein oder mehrere Immunmodulatoren zur Aktivierung der antigenpräsentierenden DCs, bevorzugt synthetische Analoga bakterieller Lipopeptide, als einzelne Moleküle oder Konjugate,

bei denen

- (a) die Vakzinkomponenten durch einen Ladungs-Tag reversibel an mikro-/nanoskalige Trägerpartikel gekoppelt sind,
- (b) die nach topischer Applikation auf die Hautoberfläche aktiv in den Haarfollikel transportiert und dort temporär deponiert werden, bei denen
- (c) die Vakzinkomponenten unter den dort herrschenden physiologischen Bedingungen gezielt freigesetzt werden und dann
- (d) durch Diffusion zu den Zielstrukturen, den DCs in der Epidermis der Haut, gelangen,
- (e) wo sie eine T-Zell-basierte Vakzinantigen-spezifische Immunreaktion auslösen,

sowie deren Verwendung für verschiedene medizinische Indikationen, wie beispielsweise zur prophylaktischen spezifischen Immunisierung gegen und/oder zur therapeutischen Vakzinierung bei Erkrankungen wie Infektionen, Krebs, Autoimmunerkrankungen und/oder entzündlichen und/oder allergischen Leiden, sowie zur Verstärkung der Immunantwort nach einer durch konventionelle Impfverfahren durchgeführten Vakzinierung in der Human- und Veterinärmedizin.

Das immunologische Potential der erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine wurde anhand von *in vitro* Experimenten mit Modellvakzinen, die die CTL-Epitope GILGFVFTL (SEQ ID NO: 5) aus dem Influenza-Matrixprotein M1 bzw. NLVPMVATV (SEQ ID NO: 6) aus

dem frühen Antigen pp65 des Zytomegalovirus CMV, das Helfer-T-Zell-Epitop Pan-DR-E (aK-L-Cha-VAAWTLKAAa-Aca-C) sowie Pam₂Cys-GDPKHPKSF als Immunmodulator enthielten, nachgewiesen (Ausführungsbeispiele C und D).

Im Einzelnen konnte in den weiterführenden Experimenten gezeigt werden, dass

- 5 (i) eine definiert einstellbare Beladung der Trägerpartikel und eine unter Beladungs-, Lagerungs- und Transportbedingungen stabile Bindung der Vakzinkomponenten an der polarisierten Oberfläche der Partikel möglich ist;
- (ii) ein zuverlässiger aktiver Transport der Vakzinkomponenten in den Haarfollikel bis zu ca. 600 µm Tiefe erfolgt;
- 10 (iii) die Trägerpartikel für ca. 5 - 10 Tage in den Haarfollikeln deponiert und durch einen natürlichen Reinigungsprozess wieder ausgeschieden werden;
- (iv) eine gleichmäßige und simultane Freisetzung der Vakzinkomponenten in der gewünschten Tiefe der Follikelstruktur erfolgt;
- (v) die freigesetzten Vakzinkomponenten zu den DCs der Haut (Langerhans-Zellen)
- 15 diffundieren und von diesen aufgenommen werden;
- (vi) die freigesetzten Vakzinkomponenten weiterhin uneingeschränkt immunologisch aktiv sind;
- (vii) die Partikel-gebundenen Vakzinkomponenten der Modellvakzine bei humanen Effektor-T-Zellen eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen, die qualitativ und
- 20 quantitativ vergleichbar zur Reaktion auf die ungebundenen Vakzinkomponenten ist und auch die Ladungs-Tags keinen nachteiligen Effekt auf die immunologische Wirksamkeit der Vakzinkomponenten haben;
- (viii) die Lipopeptide zur Aktivierung der antigenpräsentierenden DCs führen, was eine Steigerung der T-Zell-basierten spezifischen Immunantwort und eine deutliche Ver-
- 25 stärkung des Vakzinierungseffektes hervorruft;
- (ix) das Helfer-T-Zell-Epitop Pan-DR-E die T-Zellen und über die T-Zellen auch die DCs zusätzlich stimuliert;
- (x) der Vorteil der räumlichen Nähe der Vakzinkomponenten, speziell deren Konjugation mit dem Lipopeptid, individuell von den verwendeten Antigen-Determinanten für CTL-
- 30 Zellen abhängig ist;
- (xi) die Kombination von Helfer-T-Zell-Epitop Pan-DR-E und Lipopeptid-Immunmodulator die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen verstärkt oder erst möglich macht.

35 Toxische Effekte oder Unverträglichkeiten der erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine wurden bei den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Tests in den relevanten Konzentrationsbereichen, sowie bei Zytotoxizitätstests an RKO-Zellen nicht beobachtet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung der erfindungsgemäßen Vakzin-
komponenten sowie deren Modifizierung mit Ladungs-Tags (s.o.), wie in Ausführungsbei-
spiel A veranschaulicht.

5 Die Synthese der Epitope, wie auch der Ladungs-Tags, in einigen Ausführungsformen
bestehend aus einer Folge von 4-10 basischen (positive Ladung) oder sauren (negative
Ladung) Aminosäuren, kann in Lösungs- oder Festphasensynthese nach dem Fachmann
bekannten Verfahren der Schutzgruppenchemie erfolgen. Dabei werden die Ladungs-Tags,
die N- oder C-terminal, in einigen Ausführungsformen C-terminal, angefügt werden, bereits
10 beim Aufbau der Aminosäuresequenz berücksichtigt.

Wie bereits im Vorangehenden erläutert, können als basische Aminosäuren beispielsweise
Lysin-, Pyrrolysin, Histidin und/oder Arginin zum Einsatz kommen. Ein Ladungstag kann aus
einer Abfolge identischer Aminosäureeinheiten oder aus einer Abfolge unterschiedlicher Ami-
nosäureeinheiten bestehen. Typischerweise enthält ein Ladungstag negativ geladene, nicht
15 jedoch positiv geladene Aminosäureeinheiten oder positiv geladene, nicht jedoch negativ
geladene Aminosäureeinheiten oder besteht daraus. Neben geladenen Aminosäureeinheiten
kann ein Ladungstag in einigen Ausführungsformen auch nicht geladene Aminosäureeinhei-
ten aufweisen. Üblicherweise enthält allerdings ein Ladungstag mehr geladene als ungeladene
Aminosäureeinheiten. In einigen Ausführungsformen enthält ein Vakzin bzw ein Nano- oder
20 Mikropartikel der Erfindung ein Ladungstag, das eine Folge von vier, fünf, sechs oder sieben
Lysin-Einheiten, eine Folge von vier, fünf, sechs oder sieben Pyrrolysin-Einheiten, eine Folge
von vier, fünf, sechs oder sieben Histidin-Einheiten und/oder eine Folge von vier, fünf, sechs
oder sieben Arginin-Einheiten aufweist oder daraus besteht. In einigen Ausführungsformen
enthält ein Vakzin bzw ein Nano- oder Mikropartikel der Erfindung ein Ladungstag, das eine
25 Folge von vier, fünf, sechs oder sieben Sulfotyrosin-Einheiten, eine Folge von vier, fünf, sechs
oder sieben Aspartat-Einheiten und/oder eine Folge von vier, fünf, sechs oder sieben
Glutamat-Einheiten aufweist oder daraus besteht.

Für die Herstellung der synthetischen Analoga bakterieller Lipopeptide nach Formel (I) wird
typischerweise die ungewöhnliche Aminosäure N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hy-
30 droxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein (Fmoc-RS-Dhc-OH) in Lösung oder an fester Phase mit dem
an einem Synthese-Harz aufgebauten Seitenketten-geschützten Peptid verknüpft. Diese
Vorstufe kann nachfolgend an den Hydroxygruppen bisacyliert werden. Bei der Synthese des
Pam₃Cys-Derivates erfolgt zusätzlich die Acylierung der N-terminalen Aminogruppe.

Wird die Synthese der erfindungsgemäßen Lipopeptide mit dem Baustein N α -Fluorenylmeth-
35 oxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2R)-propyl]-[R]-cystein (Fmoc-RR-Dhc-OH) durchgeführt,

wird die Zielverbindung als stereochemisch definiertes Derivat erhalten, welches aus L-Aminosäuren, aus der modifizierten Aminosäure S-[2,3-di(hydroxy)-(2*R*)-propyl]-[*R*]-cystein sowie aus zwei oder drei Acyl-Resten aufgebaut ist und eine höhere biologische Aktivität aufweist.

5 Eine erfindungsgemäße Vakzinkomponente kann auch als sogenannte „Prodrug-Verbindung“, wie zum Beispiel als Prodrug-Ester, Prodrug-Peptide oder ähnliches modifiziert werden. Unter einer Prodrug-Verbindung wird ein Molekül verstanden, das in manchen Fällen selbst pharmakologisch inaktiv ist, jedoch *in vivo* im Körper eines Subjekt durch metabolische Umwandlung in ein pharmakologisch aktives Molekül überführt wird. In anderen Fällen ist
10 eine Prodrug-Verbindung weniger aktiv als ein daraus im Körper des Subjekts gebildeter pharmakologisch (voll) aktiver Wirkstoff. Eine Prodrug-Verbindung kann somit als ein Vorläufermolekül eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs verstanden werden. Eine Prodrug-Verbindung kann Reste enthalten, die *in vivo* vom Molekül abgespalten werden, beispielsweise durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion wie eine Hydrolyse oder eine
15 Oxidation. So kann eine in einer pharmakologisch aktiven Verbindung vorhandene Hydroxygruppe in einer Prodrug-Verbindung in Form eines Esters vorliegen, ein Amin kann in Form eines Amids vorliegen oder eine Carboxylgruppe kann in Form eines Esters oder eines Amids vorliegen. Eine in einer pharmakologisch aktiven Verbindung vorhandene Carboxylgruppe kann auch als Hydroxygruppe vorliegen, die *in vivo* oxidiert werden kann. In
20 bestimmten Fällen kann durch die Kopplung von die Zellpenetration fördernden Molekülen, wie z.B. Biotin oder Maleimidopropionsäure, optional über geeignete Spacermoleküle, an die primäre Aminogruppe oder die Acylierung der Aminogruppe die Bioverfügbarkeit und damit die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen verbessert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates für
25 Mensch und/oder Tier für eine medizinische Anwendung. Eine solche Anwendung kann die prophylaktische spezifische Immunisierung gegen und/oder für die therapeutische Vakzinierung bei einer Erkrankung sein, wie eine Infektion, Krebs, eine Autoimmunerkrankung oder ein entzündliches und/ oder allergisches Leiden sowie für die Unterstützung einer
30 konventionellen Impfung.

Eine solche immunstimulatorisch wirksame Zusammensetzung, enthaltend eine therapeutisch effektive Menge wenigstens eines erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins, kann weiterhin ein oder mehrere die immunologische Wirkung verstärkende Adjuvantien, pharmazeutisch geeignete Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wie z.B. Detergentien,
35 Lösungsvermittler, Stabilisatoren oder Konservierungsmittel, sowie gegebenenfalls anderweitig therapierelevante Wirkstoffe oder Hautpflegeprodukte enthalten.

Pharmazeutisch geeignete Materialien sind die im Bereich der Pharmazie und Lebensmitteltechnologie sowie in angrenzenden Gebieten bekanntermaßen verwendbaren Stoffe, insbesondere die in den einschlägigen Arzneibüchern gelisteten, deren Eigenschaften einer physiologischen Anwendung nicht entgegenstehen.

5 Die Effekte, die durch ein erfindungsgemäßes Mikro-/Nanopartikel-Vakzin hervorgerufen wird, ist auch abhängig von dessen Formulierung. Ein entsprechendes pharmazeutisches Präparat sollten die direkte Applikation des Arzneimittels auf die unbehandelte Haut ermöglichen. Zur topischen Applikation geeigneten Formulierungen für die erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine können beispielsweise Pasten, Salben, Cremes, Lotionen, Emulsionen,
10 Gele, Hydrogele, Suspensionen, Lösungen, Sprays oder Pflaster, oder beispielsweise wässrige oder ethanolische Gele sowie Suspensionen oder Öl-Wasser-Emulsionen sein.

Aufgrund der Langzeitspeicherung (Depotwirkung) eines typischen erfindungsgemäßen Mikro-/Nanopartikel-Vakzins im Haarfollikel bietet sich auch eine Retard-Formulierung an, die nach dem Fachmann bekannten Methoden der pharmazeutischen Galenik hergestellt
15 werden kann.

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparats erfolgt in üblicher Weise nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie in den einschlägigen Arzneibüchern beschrieben, wobei die Bestandteile miteinander vermischt, gelöst oder mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert sein können. Ein erfindungsgemäßes
20 pharmazeutisches Präparat kann zusätzlich sterilisiert werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins oder eines diese enthaltenden pharmazeutischen Präparates zur Behandlung und Vorbeugung von einer oder mehreren Erkrankungen bei Mensch und Tier, die mit Infektionen, Krebs, Autoimmunerkrankungen oder entzündlichen und allergischen
25 Leiden in Zusammenhang stehen.

Hierzu trägt man einem Subjekt, also einer Person oder einem Tier, die oder das einer derartigen Behandlung bedarf, eine therapeutisch effektive Menge eines erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins oder eines erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparates direkt auf die unbehandelte Haut auf. Anschliessend kann die Formulierung mit
30 dem Finger oder gegebenenfalls mit einem Massageapplikator einmassiert werden. Zur exakten Dosierung können zusätzlich Schablonen für die Größe des behandelten Haut-Areals verwendet werden. Die Auftragsmenge kann durch die Verpackungseinheit vorgegeben werden.

Durch eine Vorbehandlung des zu behandelnden Haut-Areals durch Stripping oder einen
35 Cyanacrylat-Abriss, bei der bereits abgestorbene Hornhautzellen, abgestorbene Korneozyten

und getrocknetes Sebum aus der Öffnung der Haarfollikel entfernt werden, kann gegebenenfalls die Effektivität der Aufnahme des Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins erhöht werden. Okklusivverbände oder Pflaster sind weitere Möglichkeiten, die Wirkstoffapplikation vorzunehmen.

5 Die erfindungsgemäßen Mikro-/Nanopartikel-Vakzine und pharmazeutischen Präparate können allein, in Kombination mit anderen, in der vorliegenden Erfindung enthaltenen, Mikro-/Nanopartikel-Vakzinen bzw. pharmazeutischen Präparaten oder in Kombination mit einem oder mehreren Wirkstoffen, die für die jeweilige medizinische Indikation relevant sind, angewendet werden. Die zeitliche Abfolge der Applikation ist dabei nicht eingeschränkt. Sie kann
10 entweder zeitgleich, vor oder nach den anderen Wirkstoffen, als separates Arzneimittel oder Kombinationspräparat und auf demselben oder unterschiedlichen Applikationswegen verabreicht werden. Auch die Applikation verschiedener Vakzine oder Teilen davon an unterschiedlichen Stellen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten entspricht dem Gegenstand der Erfindung.

15 Die exakte therapeutisch effektive Menge für ein zu behandelndes Subjekt sowie die molare Zusammensetzung der Vakzine oder Vakzinkombination hängt von verschiedenen Faktoren, unter anderem von Art und Verlauf der Erkrankung, von Größe, Statur, Alter und Gesundheitszustand des Patienten, vom Applikationsweg, von den angewandten konkreten Antigen-Determinanten und gegebenenfalls von den weiteren verwendeten Arzneimitteln ab. Somit ist es
20 zum jetzigen Zeitpunkt nicht sinnvoll, die exakte Menge zu spezifizieren. Jedoch kann man prinzipiell von einer 1- bis 3-fachen Applikation der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate über einen Zeitraum von wenigen Wochen bis zu einem halben Jahr ausgehen. Die eingesetzte Wirkstoffmenge sollte üblicherweise im Bereich von 0,5 µg bis 2,0 mg pro Applikation und Vakzinkomponente liegen. Die genaue Spezifikation der Dosierung ist
25 abhängig von der konkreten Anwendung und Zusammensetzung des Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins und erfordert weitere Untersuchungen in den klinischen Studien.

Die wesentlichen Vorteile eines Vakzins und eines Verfahrens bzw. einer Anwendung der vorliegenden Erfindung, bei der dieses eingesetzt wird, bestehen in der nicht-invasiven Applikation, dem direkten Transport der Vakzinkomponenten durch den Haarfollikel zu den
30 Zielstrukturen und der Verstärkung der Immunreaktion durch die Lipopeptid-Immunmodulatoren.

Mit den DCs der Haut wird eine ideale Zielstruktur adressiert.

Durch Einbeziehen der synthetischen Analoga bakterieller Lipopeptide als Modulatoren für das angeborene Immunsystem ist eine deutliche Steigerung der Effektivität der Immuni-
35 sierung möglich. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Verstärkung des Immunisierungserfolges

von konventionell verabreichten Vakzinen durch die zusätzliche Applikation eines Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins.

Die topische Applikationsform eines erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins ist einfach und flexibel handhabbar und als solche unabhängig von medizinischem Personal. Die mit der parenteralen Applikation verbundenen Nebenwirkungen und Risiken, wie z.B. Sekundärinfektionen, können vermieden, bei enteraler Gabe übliche Metabolismen umgangen werden.

Die Beschränkung auf ein Mindestmaß und geringste Mengen von Vakzinkomponenten, vermindert das potentielle Risiko von Unverträglichkeiten bei dennoch guter immunstimulatorischer Wirkung. Negative Einflüsse wurden in den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Modellen nicht beobachtet.

Damit ist die topische Vakzinierung mit einem erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin der bisher dominanten systemischen und invasiven Applikationsform überlegen.

Ein Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin gemäß der Erfindung eignet sich einerseits zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten. Aufgrund des unspezifischen Ansatzes der erfindungsgemäßen Vakzinierungsstrategie kann durch die Auswahl und Kombination der T-Zell-Epitope und Antigene für B-Zellen, eine große Breite bekannter Infektionskrankheiten abgedeckt werden.

Einsatzgebiete sind vor allem Impfkampagnen gegen weit verbreitete Infektionskrankheiten, Pandemien sowie Schutzimpfungen vor allem in der Pädiatrie. Auch die therapeutische Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen wie Infektionskrankheiten, Krebs, Autoimmunkrankheiten, chronischen Entzündungen und Allergien sind erfolgversprechende Anwendungsfelder für das dargestellte Prinzip der topischen Vakzinierung.

Nicht zuletzt weist ein erfindungsgemäßes Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin entscheidende Vorteile bei der Selbstmedikation chronisch Kranker und der Immunisierung bei Impfstoff-Unverträglichkeiten auf. Ebenso ist die topische Vakzinierung für die Schutzimpfung von Kindern außerordentlich vorteilhaft, da sie den Kindern die mit der Injektion verbundenen schmerzhaften Erfahrungen erspart.

Zudem reduziert das nicht-invasive Prinzip der Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine das Infektionsrisiko bei Vakzinationen erheblich und vermeidet erhebliche Mengen an klinischen Abfällen.

Mit einem erfindungsgemäßen Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin wird eine neue Dimension der Vakzinentwicklung eröffnet, die anhand des bekannten immunologischen Wissens und durch die spezifische Auswahl der Epitope ein rationales Vakzindesign erlaubt.

5 Das der Erfindung zugrundeliegende Prinzip zur Überwindung der Hautbarriere ist auch für die Weiterentwicklung als allgemeines Prinzip für topisch applizierbare Drug Delivery Systeme offen.

Näheres zu einzelnen Ausführungsformen sowie weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen, wobei die vorstehend genannten und nachstehend noch zu
10 erläuternden individuellen Merkmale jeweils für sich und in beliebigen Kombinationen miteinander beansprucht sind. Die folgenden Ausführungsbeispiele sind rein illustrativ und schränken die Reichweite der Erfindung nicht ein.

Literatur

- 15 Barry BW (2002) Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev* 54 (Suppl.1):31-40.
- Borges E, Wiesmüller KH, Jung G, Walden P (1994) Efficacy of synthetic vaccines in the induction of cytotoxic T lymphocytes. Comparison of the costimulating support provided by helper T cells and lipoamino acid. *J Immunol Methods* 173(2):253-263.
- 20 Brown LE, Jackson DC (2005) Lipid-based self-adjuvanting vaccines. *Curr Drug Deliv* 2(4):383-393.
- Chen D, Endres RL, Erickson CA, Weis KF, McGregor MW, Kawaoka Y, Payne LG (2000) Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice. *Nat Med* 6(10):1187-1190.
- 25 Chen D, Payne LG (2002) Targeting epidermal Langerhans cells by epidermal powder immunization. *Cell Res* 12(2):97-104.
- Chen YS, Hung YC, Lin WH, Huang GS (2010) Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. *Nanotechnology* 21(19):195101.
- 30 Choi AH, Smiley K, Basu M, McNeal MM, Shao M, Bean JA, Clements JD, Stout RR, Ward RL (2007) Protection of mice against rotavirus challenge following intradermal DNA immunization by Biojector needle-free injection. *Vaccine* 25(16):3215-3218.
- Combadière B, Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Hadam S, Bonduelle O, Sterry W, Staszewski S, Schaefer H, van der Werf S, Katlama C, Autran B, Blume-Peytavi U (2010) Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated
35 influenza vaccine: a randomized phase I trial. *PLoS One* 5(5):e10818.
- Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LM, Alpar HO, Almeida AJ (2010) Surface modified polymeric nanoparticles for immunisation against equine strangles. *Int J Pharm* 390(1):25-31.

- Glenn GM, Flyer DC, Ellingsworth LR, Frech SA, Frerichs DM, Seid RC, Yu J (2007) Transcutaneous immunization with heat-labile enterotoxin: development of a needle-free vaccine patch. *Expert Rev Vaccines* 6(5):809-819.
- 5 Heuking S, Iannitelli A, Di Stefano A, Borchard G (2009) Toll-like receptor-2 agonist functionalized biopolymer for mucosal vaccination. *Int J Pharm* 381(2):97-105.
- Huang Y, Park YS, Moon C, David AE, Chung HS, Yang VC (2010) Synthetic skin-permeable proteins enabling needleless immunization. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(15):2724-2727.
- Lademann J, Meinke M, Sterry W, Patzelt A (2009) How safe are nanoparticles? *Hautarzt* 60(4): 305-309.
- 10 Mitragotri S (2006) Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nat Rev Drug Discov* 5(7):543-548.
- O'Hagan DT, Rappuoli R (2004) Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm Res* 21(9):1519-1530.
- 15 Patlolla RR, Desai PR, Belay K, Singh MS (2010) Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. *Biomaterials* 31:5598-5607.
- Prausnitz MR, Langer R (2008) Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* 26(11):1261-1268.
- Sullivan SP, Koutsonanos DG, Del Pilar Martin M, Lee JW, Zarnitsyn V, Choi SO, Murthy N, Compans RW, Skountzou I, Prausnitz MR (2010) Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med* [Epub ahead of print doi:10.1038/nm.2182].
- 20 Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, Lademann J (2005) Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 125:264-269.
- Vogt A, Combadière B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H, Autran B, Sterry W, Blume-Peytavi U (2006) 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol* 126(6): 1316-1322.
- 25

Ausführungsbeispiele

Beispiel A - Herstellung und Modifizierung der Vakzinkomponenten

In diesem Ausführungsbeispiel wird die allgemeine Methodik zur Herstellung der erfindungsgemäßen Vakzinkomponenten, insbesondere der peptidischen Epitope und der synthetischen Analoga bakterieller Lipopeptide, sowie deren Modifizierung mit den peptidischen Ladungs-

a) Synthese der Aminosäuresequenzen mit automatisierter Festphasensynthese

Die Synthese der Peptide erfolgt nach klassischen, literaturbekannten Techniken in Lösung oder in einem automatisierten Verfahren an der festen Phase. Die Verfahrensschritte für die Synthese an fester Phase sind für nahezu alle Aminosäure-Sequenzen gleich. Aus diesem Grund wird in dem Beispiel lediglich der prinzipielle Syntheseablauf beschrieben, ohne auf Besonderheiten einzelner Peptide einzugehen.

Die Peptide werden mit einem Syntheseroboter ausgehend von einem mit Fmoc-L-Lys(Boc) beladenen Synthese-Harz nach der Fmoc-Peptidsynthese-Methode aufgebaut. Werden andere Aminosäuren für den C-terminalen Ladungs-Tag verwendet, beginnt man in analoger Weise mit den entsprechenden Fmoc-geschützten Derivaten.

Dazu wird das beladene Tritylchlorid-Polystyrol-Harz (8 mg; 7 μ mol) in einen Reaktor eingewogen. Die Aminosäuren werden in einer 1-Hydroxybenzotriazol-Lösung (0,5 M in N,N-Dimethylformamid) zu 0,5 molaren Lösungen gelöst. Anschließend werden die befüllten Reaktoren und Vials auf die vorgesehenen Positionen des Syntheseroboters gestellt. Im ersten Syntheseschritt erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach dem in Tab. 1 dargestellten Programmablauf.

Tab. 1: Zyklus zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Syntheseschritt		Reagenzien	Volumina [μ L]	Dauer [min]
Start	Harz quellen	N,N-Dimethylformamid	800	2
1.	Deblockierung	30% Piperidin in N,N-Dimethylformamid	200	5
2.	Waschen, 3 x	N,N-Dimethylformamid	300	1
3.	Deblockierung	30% Piperidin in N,N-Dimethylformamid	200	10
4.	Waschen, 7 x	N,N-Dimethylformamid	300	1

Anschließend wird das entsprechende Peptid, beginnend vom C-terminalen Ende aufgebaut. Dies erfolgt durch die schrittweise Verknüpfung der jeweiligen Aminosäuren. Unmittelbar nach jeder Kupplung wird die Fmoc-Schutzgruppe der soeben gekoppelten Aminosäure abgespalten, um die Anbindung der nächsten Aminosäure an der freigewordenen Amino-

gruppe zu ermöglichen.

Der Programmablauf des Syntheseroboters ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 2: Zyklus zur Synthese der Peptide.

Syntheseschritt	Reagenzien	Volumina [μ L]	Dauer [min]
1. Kupplung	3 M N,N-Diisopropylethylamin 3 M N,N-Diisopropylcarbodiimid in N,N-Dimethylformamid, Aminosäure-Lösung	25 25 100	120
2. Waschen, 3 x	N,N-Dimethylformamid	300	1
3. Deblockierung	30% Piperidin in N,N-Dimethylformamid	200	5
4. Waschen, 3 x	N,N-Dimethylformamid	300	1
5. Deblockierung	30% Piperidin in N,N-Dimethylformamid	200	10
6. Waschen, 7 x	N,N-Dimethylformamid	300	1
7. weiter bei Schritt 1.			

b) Synthese von N,N-Bis(fluorenylmethoxycarbonyl)-[R]-cystein-bis-tert.-butylester (Fmoc-Cys-OtBu)₂ als Baustein für die Lipopeptid-Komponente

L-Cystein-bis-tert.-butylester (5,5 g; 13 mmol) und Fmoc-N-hydroxysuccinimidylester (7,04 g; 21 mmol) werden in Tetrahydrofuran (15 mL) gelöst. Unter Rühren wird N-Ethylmorpholin (3,83 g; 4,2 mL; 30 mmol) in Tetrahydrofuran (7,5 mL) dazugegeben.

Die Reaktionslösung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Hilfe des Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingedampft.

Der Rückstand wird in Ethylacetat (100 mL) gelöst und im Scheidetrichter mit Kaliumhydrogensulfat-Lösung (5%; 3 x 80 mL) sowie Wasser (3 x 80 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird die organische Phase am Rotationsverdampfer eingedampft und als Rückstand ein Öl erhalten.

Dieser Rückstand wird mit Hilfe eines Ultraschallbades in Dichlormethan/Methanol (1:4; 385 mL) gelöst und umkristallisiert (18 h; -20°C). Der erhaltene farblose Niederschlag wird über eine Filternutsche abfiltriert, mit tert.-Butylalkohol/2-Propanol (1:1; 2 x 100 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute (Fmoc-Cys-OtBu)₂: 7,48 g (72%); [M+H]⁺: 797

c) Synthese von N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein-*tert.*-butylester (Fmoc-RS-Dhc-OtBu): Einführung von Dhc

Das (Fmoc-Cys-OtBu)₂ (4,96 g; 6,2 mmol) wird in Dichlormethan (39 mL) gelöst. Anschließend
5 werden Zink (2,84 g; 43,4 mmol) sowie eine Lösung aus Methanol, Salzsäure (32%) und Schwefelsäure (98%) (100:7:1; 20,7 mL) unter starkem Rühren zugegeben. Nach 15 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird RS-2,3-Epoxy-1-propanol (45,9 g; 41,3 mL; 62 mmol) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Das Ganze wird im Ölbad (5 h; 40°C) weiter gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer auf das halbe Volumen eingedampft,
10 mit Kaliumhydrogensulfat-Lösung (5%; 5,2 mL) versetzt und 16 h bei -2°C aufbewahrt. Das Produkt wird mit Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird die organische Phase am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft.

Ausbeute (Fmoc-RS-Dhc-OtBu): 5,67 g (96%); [M+H]⁺: 474

Wird bei der Synthese, wie oben beschrieben, der außergewöhnlichen Aminosäure S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein (Dhc) der racemische Synthesebaustein RS-2,3-Epoxy-1-propanol verwendet, erhält man ein Diastereomeren-Gemisch der Zielverbindung. Durch
15 Einsatz des Enantiomers R-2,3-Epoxy-1-propanol wird in analoger Weise das immunmodulatorisch aktivere RR-Stereoisomer von Dhc erhalten.

d) Synthese von N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein (Fmoc-RS-Dhc-OH): Hydrolyse des *tert.*-Butylesters

Fmoc-RS-Dhc-OtBu (5,67 g; 12 mmol) wird in Trifluoressigsäure (99%; 142 mL) gelöst und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird anschließend am Rotationsverdampfer eingedampft, mit N-Hexan (50 mL) und Diethylether (30 mL) versetzt und wieder am Rotationsverdampfer eingedampft. Der zähflüssige, ölige Rückstand wird
25 anschließend in *tert.*-Butylalkohol / Wasser (80%; 100 mL) gelöst und lyophilisiert (64 h).

Ausbeute (Fmoc-RS-Dhc-OH): 3,03 g (60%); [M+H]⁺: 418

e) Synthese von N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyI-GDPKHPKSF-KKKK: Kopplung der Aminosäuresequenz

Ein mit dem Seitenketten-geschützten Peptid GDPKHPKSF-KKKK (SEQ ID NO: 2) beladenes
30 Synthese-Harz (5,22 μ mol) wird mit N,N-Dimethylformamid (100 μ L) versetzt und 5 min in einem Reaktor quellen gelassen. Nach dem Abfiltrieren des N,N-Dimethylformamid-Überstandes werden N,N-Diisopropylethylamin (3 M in N,N-Dimethylformamid; 12,2 μ L; 36,6 μ mol; 7 Äquivalente), N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-

[R]-cystein (15,5 mg in 100 µL einer 0,5 M 1-Hydroxybenzotriazol-Lösung in N,N-Dimethylformamid; 36,6 µmol; 7 Äquivalente) und N,N-Diisopropylcarbodiimid (3 M in N,N-Dimethylformamid; 12,2 µL; 36,6 µmol; 7 Äquivalente) zu dem Harz pipettiert. Die Harz-Suspension wird anschließend für 2 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Danach wird das Harz mit N,N-Dimethylformamid (3 x 600 µL) und Dichlormethan (3 x 600 µL) gewaschen.

f) Veresterung von N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK mit Palmitinsäure

Das mit N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-di(hydroxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK beladene Harz (5,22 µmol) wird mit N,N-Dimethylformamid (100 µL) versetzt und 5 min in einem Reaktor quellen gelassen. Nach dem Abfiltrieren des N,N-Dimethylformamid-Überstandes werden N,N-Diisopropylethylamin (3 M in N,N-Dimethylformamid; 24,4 µL; 73,2 µmol; 14 Äquivalente), Palmitinsäure (1 M in N,N-Dimethylformamid/Dichlormethan (1:1); 104 µL; 104 µmol; 20 Äquivalente) und N,N-Diisopropylcarbodiimid (3 M in N,N-Dimethylformamid; 24,4 µL; 73,2 µmol; 14 Äquivalente) zu dem Harz pipettiert. Nach 5 min wird 4-Dimethylaminopyridin (1 M in N,N-Dimethylformamid; 30 µL; 30 µmol; 5,7 Äquivalente) zugegeben. Die Harz-Suspension wird anschließend für 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Danach wird das Harz mit N,N-Dimethylformamid (3 x 600 µL) und Dichlormethan (3 x 600 µL) gewaschen.

Die Veresterung wird ein weiteres Mal unter den gleichen Versuchsbedingungen wiederholt.

g) Abspaltung der Fmoc- sowie der Seitenketten-Schutzgruppen

Das mit N α -Fluorenylmethoxycarbonyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK beladene Harz (5,22 µmol) wird mit Dichlormethan (100 µL) versetzt und 5 min in einem Reaktor quellen gelassen. Nach dem Abfiltrieren des Dichlormethan-Überstandes wird Piperidin (30 % in N,N-Dimethylformamid; 200 µL) zum Harz pipettiert und die Mischung 10 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wird das Harz mit N,N-Dimethylformamid (3 x 600 µL) gewaschen. Anschließend wird nochmals Piperidin (30% in N,N-Dimethylformamid; 200 µL) zu dem Harz pipettiert und die Suspension 20 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wird das Harz mit N,N-Dimethylformamid (3 x 600 µL), Dichlormethan (3 x 600 µL) und Diethylether (4 x 600 µL) gewaschen.

Die Vollständigkeit der Reaktion wird mit Hilfe des Ninhydrin-Testes kontrolliert.

In analoger Weise erfolgt die Abspaltung der Fmoc- sowie der Seitenketten-Schutzgruppen von den Aminosäuresequenzen der Epitop-Peptide.

h) Abspaltung des Lipopeptides S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-[*R*]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK bzw. der Epitop-Peptide vom Synthese-Harz

Die Abspalllösung Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (92,5:5:2,5; 300 µL) wird zu dem Harz (2,6 µmol) pipettiert und die Suspension 2 h bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird die Abspalllösung mit Druckluft in ein Reagenzglas filtriert. Nachfolgend werden weitere 200 µL Abspalllösung zu dem Harz pipettiert und die Suspension nochmals 30 min bei Raumtemperatur belassen. Nach erneuter Filtration der Abspalllösung mit Druckluft wird das Harz mit Dichlormethan (200 µL) gewaschen. Die Filtrate und die Waschlösung werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird mit Diethylether (3 x 300 µL) digeriert und anschließend zentrifugiert. Das Sediment wird in tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1; 2 mL) aufgenommen und gefriergetrocknet (18 h).

Ausbeute (Pam₂-(2*RS*)-Dhc-GDPKHPKSF-KKKK) [(SEQ ID NO: 3)]: 5,5 mg (97%);
M: 2179; [M+2H]²⁺: 1091; [M+3H]³⁺: 727

i) Acylierung von S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-[*R*]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK mit Palmitinsäure

Das mit S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-[*R*]-cysteinyl-GDPKHPKSF-KKKK (SEQ ID NO: 3) beladene Harz (2,6 µmol) wird mit N,N-Dimethylformamid (100 µL) versetzt und 5 min in einem Reaktor quellen gelassen. Nach dem Abfiltrieren des N,N-Dimethylformamid-Überstandes werden N,N-Diisopropylethylamin (3 M in N,N-Dimethylformamid; 12,2 µL; 36,6 µmol; 7 Äquivalente), Palmitinsäure (1 M in N,N-Dimethylformamid/Dichlormethan (1:1); 52 µL; 52 µmol; 10 Äquivalente) und N,N-Diisopropylcarbodiimid (3 M in N,N-Dimethylformamid; 12,2 µL; 36,6 µmol; 7 Äquivalente) zu dem Harz pipettiert. Die Harz-Suspension wird anschließend für 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Danach wird das Harz mit N,N-Dimethylformamid (3 x 600 µL) und Dichlormethan (3 x 600 µL) gewaschen.

Die Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgt nach dem unter h) beschriebenen Verfahren.

Ausbeute (Pam₃-(2*RS*)-Dhc-GDPKHPKSF-KKKK) [(SEQ ID NO: 4)]: 5,6 mg (89%);
M: 2417; [M+2H]²⁺: 1210; [M+3H]³⁺: 807

Beispiel B - Reversible Immobilisierung der Vakzinkomponenten an den Trägerpartikeln

Silika-Partikel mit einem Durchmesser von 1.000 nm wurden mittels LBL[®]-Technologie mit der Schichtsequenz PAH/PSS/PAH/PSS/PAH/PMAA beschichtet und nach mehrfachem Waschen mit 10 mM TRIS-Puffer auf pH 8 gebracht. Sodann wurde eine sequentielle Beladung mit jeweils 20%-igen DMSO-Lösungen der verschiedenen Vakzinkomponenten durchgeführt,

wobei die adsorbierte Menge je Komponente durch die Reihenfolge und Menge der zugegebenen Vakzinkomponenten sowie die Inkubationszeit definiert wurde.

Zur Kalibrierung der Beladungsmenge wurden die Vakzinkomponenten mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt und die Abnahme der Färbung im Überstand der Beladungs-
 5 lösungen mit UV/Vis- bzw. Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle sowie Fig. 2 dargestellt.

Tab. 3: Prozentualer Anteil der bei pH 8 auf den Trägerpartikeln adsorbierten und bei pH 5 desorbierten Masse der Vakzinkomponenten bezogen auf die Masse der Trägerpartikel. (GILG = GILGFVFTL-KKKKK-Fluoreszein, SEQ-ID-NO: 11 gekoppelt an
 10 den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein, P2C = Pam₂Cys-GDPKHPKSF-KKKKK-Tamra, SEQ-ID-NO: 9 gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Tamra, Cha = aK-L-Cha-VAAWTLKAAa-Aca-C-KKKKK-Cy5, SEQ-ID-NO: 10 gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy5).

auf Partikeln adsorbierte Menge		GILG [%]	P2C [%]	Cha [%]
Zugabe GILG,	30 min	2,0	–	–
Zugabe GILG,	120 min	2,09	–	–
Zugabe P2C,	30 min	17,6	16,6	–
Zugabe P2C,	120 min	16,7	15,3	–
Zugabe Cha,	30 min	12,4	12,0	6,3
Zugabe Cha,	120 min	8,3	9,5	8,4
Desorption in 10 mM Acetat		3,2	4,4	2,5
Desorption in 10 mM Acetat + 0,1 M NaCl		2,2	3,6	1,1
Desorption in 10 mM Acetat + 20% DMSO		1,9	6,1	3,2

15 Mit den beladenen Trägerpartikeln wurden Freisetzungsversuche in wässriger Lösung durchgeführt, wobei verschiedene Freisetzungsmedien simuliert wurden. Einerseits wurden die Vakzinkomponenten in einer 10 mM wässrigen Acetatpuffer-Lösung bei pH 5 freigesetzt. Zur Simulation von potentiellen Löslichkeitsvermittlern in den Haarfollikeln, wie Lipiden oder Salzen, wurden der Lösung auch NaCl bzw. 20% DMSO zugesetzt.

20 Die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen, dass der Freisetzungsgrad und damit das Verhältnis der freigesetzten Vakzinkomponenten stark von der Zusammensetzung des Freisetzungsmediums und der Zusammensetzung des Mikro-/ Nanopartikel-Vakzins abhängen.

Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen zur Kinetik der Freisetzung der drei Vakzinkomponenten in 1%-igen Suspensionen der beladenen Trägerpartikel in 10 mM wässriger
 25 Acetatpuffer-Lösung mit Zusatz von 0,1 M NaCl bei pH 5, zeigen die unterschiedlichen Freisetzungskinetiken der Vakzinkomponenten (Fig. 3). Innerhalb von 20 min wurden jedoch

alle drei Komponenten zu mehr als 50% des Maximalwertes freigesetzt. 80% des Maximalwertes der Freisetzung wurden nach ca. 1 h erreicht.

Für die biologischen Tests wurden, in Analogie zu der jeweils optimierten Beladungsstrategie, die ungelabelten Vakzinkomponenten auf der Oberfläche der Trägerpartikel adsorbiert.

- 5 Zur Herstellung gebrauchsfertiger Muster für die Applikation wurden die Partikel bei pH 8 (10 mM TRIS-Puffer) in wässriges Agarose-Gel 0,5% eingearbeitet. Nach Zugabe eines Konservierungsmittels (Ethylparaben, Benzalkoniumchlorid, Hydrobenzoesäureethylester) wurden die fertigen und lagerstabilen Formulierungen bis zur Anwendung aufbewahrt.

Beispiel C - Transport des Mikro-/Nanopartikel-Vakzins in die Haarfollikel und zu den Zielstrukturen

In diesem Ausführungsbeispiel wird die Effektivität des Transportes der Vakzinkomponenten zu den Zielstrukturen in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Trägerpartikel beschrieben.

a) Steuerung der Penetrationstiefe über die Partikelgröße

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der im Haarfollikel erzielten Penetrationstiefe von der Größe und dem Material der Partikel erfolgten *in vitro* am Modellgewebe Schweineohr, welches sowohl in Struktur als auch bezüglich der physiologischen Eigenschaften der menschlichen Haut sehr ähnlich ist. Die Bestimmung der Penetrationstiefe erfolgte nach topischer Applikation von fluoreszenzmarkierten Trägerpartikeln, Entnahme von Stanzbiopsien und Auswertung der angefertigten Kryoschnitte mittels Laser-Scan-Mikroskopie.

Es konnte gezeigt werden, dass die Penetrationstiefe der Partikel durch die Partikelgröße steuerbar ist, wobei die Beschaffenheit der Partikel fast keine Rolle spielt. Während Partikel mit einem Durchmesser von ca. 500 nm bis 600 nm Penetrationstiefen von > 1000 µm erreichen, penetrieren kleinere und größere Partikel deutlich weniger tief (Fig. 7). Erklärung für dieses Phänomen ist ein hauptsächlich mechanischer Effekt. Da die Dicke der Haarschuppen ebenfalls etwa 500 nm beträgt, lässt sich ein Zahnrادpumpeneffekt vermuten, der durch die Bewegung des Haares im Haarfollikel in Gang gesetzt wird. Dieser ist umso deutlicher ausgeprägt, je ähnlicher Partikelgröße und Haarschuppendicke sind. *In vitro* kann dieser Effekt durch Massage simuliert werden.

Die Zielstrukturen des topischen Vakzins, die DCs, sind vor allem im Infundibulum-Bereich der Haarfollikel in besonders großer Anzahl vorhanden. Dieser ist in einer Tiefe von bis zu 600 µm lokalisiert und wird von den Vakzinkomponenten bereits nach 1 h erreicht. Innerhalb

der nächsten 24 h findet eine minimal weitere Diffusion statt, die für die Vakzinierung aber von geringer Bedeutung ist.

Für die Herstellung eines topischen Vakzins zur Anwendung beim Menschen haben sich deshalb sphärische Silika-Partikel mit einem Durchmesser von 300 nm - 1.500 nm als besonders gut geeignete Trägerpartikel erwiesen.

b) Langzeitspeicherung der Trägerpartikel im Haarfollikel

Zur Bestimmung der *in vivo* Aufenthaltsdauer der Trägerpartikel in der menschlichen Haut wurden fluoreszenzmarkierte Partikel auf die Wadenhaut freiwilliger Probanden appliziert. Anschließend wurde die Menge der im *Stratum corneum* bzw. in den Haarfollikeln eingelagerten Partikel mit Hilfe des Differentiellen Strippings (Teichmann et al. 2005) erfasst. Bereits nach einem Tag waren nahezu keine Partikel mehr in den oberen Hautschichten (*Stratum corneum*) nachweisbar, während noch etwa 80% der Ausgangsmenge im Haarfollikel wiedergefunden werden konnten. Auch nach 10 Tagen waren noch etwa 20% der Partikel im Haarfollikel nachweisbar (Fig. 8).

c) Kinetik der Freisetzung

Die Kinetik der Freisetzung wurde mit Cy5-gelabelten Silika-Partikeln, die mit Rhodamin-gelabelten Vakzinkomponenten beladen wurden, am Schweineohr-Modell untersucht. Es wurden erneut Kryoschnitte angefertigt und die Penetrationstiefen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Laser-Scan-Mikroskopisch untersucht.

Anhand der unterschiedlichen Penetrationstiefen konnte gezeigt werden, dass die Vakzinkomponenten im Haarfollikel freigesetzt werden und signifikant tiefer penetrieren als die transportierenden Partikel (Fig. 6).

d) Aufnahme der Vakzinkomponenten in die Langerhans-Zellen

Für diese Untersuchungen wurden doppelt gelabelte Mikro-/Nanopartikel-Vakzine auf menschliche exzidierte Haut topisch appliziert. Anhand der Fluoreszenz-Färbung von ca. 80% der untersuchten Langerhans-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Vakzinkomponenten in das Zellinnere der Langerhans-Zellen aufgenommen wurden. Dagegen konnte eine Aufnahme der Trägerpartikel durch die Langerhans-Zellen nicht beobachtet werden. Auch dies spricht für die effektive Freisetzung der Vakzinkomponenten in räumlicher Nähe zu den Zielstrukturen.

Beispiel D - Immunologische Aktivität der Mikro-/Nanopartikel-Vakzine und ihrer Komponenten

Die immunologische Aktivität einer Modell-Vakzine mit den Komponenten:

(i) GILGFVFTL (SEQ ID NO: 5) aus dem Influenza-Matrixprotein M1 (GILG) bzw.

NLVPMTATV (SEQ ID NO: 6) aus dem frühen Antigen pp65 des Zytomegalovirus CMV (NLVP)

als Modelle für ein Epitop für CD8-Effektor-T-Zellen,

(ii) Pan-DR-Epitop aK-L-Cha-VAAWTLKAAa-Aca-C (PADRE) [SEQ ID NO: 7], wobei „a“ für D-Alanin, „Cha“ für Cyclohexylalanin und „Aca“ für 6-Aminocapronsäure stehen,

als Modell für ein Epitop für Helfer-T-Zellen sowie

(iii) Pam₂Cys-GDPKHPKSF (P2C) [SEQ ID NO: 8]

als Modell für einen Immunmodulator,

wurde in *in vitro* Zellkulturen humaner Zellsysteme untersucht. Dabei kamen je nach spezifischer Fragestellung etablierte T-Zell-Klone, periphere weiße Blutzellen (PBMC), Subfraktionen dieser PBMC (Monozyten, CD8-T-Zellen, CD4-T-Zellen, naive T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen) oder aus diesen Zellen generierte differenzierte Zelltypen (unreife dendritische Zellen (iDC), reife dendritische Zellen (mDC)) zum Einsatz. Getestet wurden die Einzelkomponenten in freier wie in Partikel-gebundener Form sowie verschiedene Kombinationen dieser Komponenten auf den Trägerpartikeln.

a) Auswirkung der Modifizierung der Epitope mit Oligoaminosäure-Tags

In einem Radiochromfreisetzung-Assay wurde das Modellepitop GILG mit unterschiedlichen Varianten einer C-terminalen Verlängerung durch Histidin (H), Lysin (K) oder Glutamat (E) über 12 Größenordnungen titriert und die Induktion der zytolytischen Aktivität im humanen zytotoxischen T-Zell-Klon 10-21A gegen die B-lymphoblastoide Zelllinie JY getestet. Wie aus den in Fig. 9 dargestellten Ergebnissen zu erkennen ist, führt die Modifikation des C-Terminus des Epitops erwartungsgemäß zu einer Reduktion der stimulatorischen Kapazität. Das Epitop mit dem H₄-Tag ist 45-fach, das mit K₄-Tag 131-fach und das mit E₄-Tag 708-fach weniger potent als das unmodifizierte Epitop. Dieser Aktivitätsverlust ist angesichts der sehr hohen funktionellen Avidität des Epitops von 1,52 pM (Peptidkonzentration, die für halbmaximale Zytolyse erforderlich ist), zumindest bei dem H₄- und dem K₄-Tag tolerabel.

b) Immunologische Aktivität Partikel-gebundener Vakzinkomponenten

Zum Vergleich der immunologischen Aktivitäten der Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzine mit der der freien Vakzinkomponenten, wurden primäre humane T-Zellen aus peripherem Blut eines gesunden Spenders mit den freien Komponenten, Gemischen derselben, den einzeln

oder in Kombination an die Trägerpartikel gebundenen Komponenten sowie Gemischen beladener Partikel über 14 Tage inkubiert. Alle Komponenten waren mit einem K₄-Tag versehen. Die Induktion Vakzinantigen-spezifischer CD8-T-Zellen wurde im ELISpot-Assay auf IFN- γ quantifiziert.

- 5 Die erzielten Ergebnisse sind repräsentativ für den Erfolg von prophylaktischen Vakzinierungen, weil die T-zellulären Immunreaktionen im Zellkultursystem ohne vorherige *in vivo* Vakzinierung induziert werden. Es zeigte sich, dass das Partikel-gekoppelte Epitop GILG im Zellkultursystem gleichermaßen aktiv ist, wie das freie Peptid. D.h., dass die Trägerpartikel sowie die Ladungs-Tags die biologische Aktivität der Vakzinkomponenten nicht wesentlich beeinflussen (Fig. 10). Bei der Titration von Gemischen Partikel-gebundener und freier Vakzinkomponenten konnte eine höhere Aktivität für die Partikel-gebundene Vakzine gegenüber einem Gemisch der freien Komponenten nachgewiesen werden (Fig. 11).

c) Induktion der Reifung und Aktivierung von iDCs durch den Immunmodulator

- 15 Der Vakzinierungseffekt, d.h. die Stimulation des adaptiven Immunsystems und besonders der Effektor-T-Zellen, hängt von der erfolgreichen Induktion der Differenzierung der iDCs zu mDCs und deren Aktivierung zu potenten immunstimulatorischen Zellen ab. Dieser Prozess kann anhand der Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf den DCs verfolgt werden. CD80, CD86 und CD40, wie auch der DC-Aktivierungsmarker CD83, sollten hochreguliert werden.

- 20 Diese immunmodulierende Funktion der Mikro-/Nanopartikel-Vakzine wurde mit iDCs aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender untersucht. Hierzu wurden PBMC in Plastikgefäßen inkubiert und die adhärenenten Monozyten für 5 Tage in Zellkulturmedium mit IL-4 und GM-CSF kultiviert, wodurch sich diese zu nichtadhärenenten iDCs entwickelten. Diese wurden dann zur Reifung und Aktivierung mit unterschiedlich beladenen Trägerpartikeln inkubiert. Nach zwei
25 Tagen wurde die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und des Aktivierungsmarkers per Durchflusszytometrie untersucht.

- Diese Untersuchungen wurden in unabhängigen Experimenten mit PBMC von 10 Probanden durchgeführt, um die Variationen in humanen Populationen abzubilden. Die Daten belegen, dass der Partikel-gekoppelte Immunmodulator P2C allein oder in Kombination mit anderen
30 Vakzinkomponenten die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der iDCs induziert (Fig. 12 A-C). Durch das Helfer-T-Zell-Epitop PADRE wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und des DC-Aktivierungsmarkers CD83 induziert, jedoch nicht die von MHC-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR) und von CD40, einem kostimulatorischen Molekül auf DCs, das für die primäre Induktion von zytotoxischen Effektor-T-Zellen erforderlich ist.
35 Eine komplette Aktivierung der DCs wird dagegen mit P2C erreicht (Fig. 13).

d) Induktion von T-Zellen durch DCs, die mittels Mikro-/Nanopartikel-Vakzine aktiviert wurden

DCs, die wie unter c) beschrieben, mit Hilfe unterschiedlich beladener Trägerpartikel differenziert und aktiviert wurden oder die wegen des fehlenden Immunmodulators nicht oder nur unvollständig ausgereift waren, wurden mit T-Zellen des gleichen Spenders, aus dessen PBMC die DCs generiert worden sind, für 7 Tage inkubiert. Die T-Zellen wurden anschließend per Durchflusszytometrie hinsichtlich Proliferation und Differenzierung untersucht. Zur getrennten Erfassung der CD45RA-exprimierenden naiven T-Zellen und der CD45RO-exprimierenden Gedächtnis-T-Zellen wurden diese auf der Basis spezifischer Antikörper mittels Magnetseparation aus PBMC separiert und getrennt mit den DCs inkubiert.

Die Proliferation wurde mittels CFSE-Assay nachgewiesen. Bei diesem Assay werden die T-Zellen vor der Stimulation mit dem zellstabilen Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff 1:1 verdünnt, sodass sich anhand des Abfalls der zellassoziierten Fluoreszenz die Proliferationsrate bestimmen lässt. Die Differenzierung von naiven zu Gedächtnis-T-Zellen konnte mit Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden. Bei naiven T-Zellen (Fig. 14) induzieren DCs, die mit dem P2C-Immunmodulator beladenen Partikeln vorinkubiert worden waren, Proliferation aber kaum Differenzierung, ähnlich wie bei einem entzündlichen Zytokin-Cocktail (TNF + IL-4 + IL-6). Das Helfer-T-Zell-Epitop PADRE hat einen ähnlichen, jedoch deutlich schwächeren Effekt. Im Gegensatz dazu induzieren DCs, die mit P2C- und PADRE-tragenden Partikeln vorbehandelt wurden, sowohl eine starke Proliferation als auch die Differenzierung eines hohen Anteils der naiven T-Zellen und damit genau den immunologischen Effekt, der von einer prophylaktischen Vakzine erwartet wird.

Bei Gedächtnis-T-Zellen (Fig. 15) induzieren die DCs nach Inkubation mit dem Immunmodulator P2C oder dem Helfer-T-Zell-Epitop PADRE, ebenso wie mit dem Zytokin-Cocktail, eine Proliferation. Hier ist erwartungsgemäß keine qualitative Differenzierung zu beobachten, allerdings eine deutliche Verstärkung des Effektes, wenn PADRE- und P2C-tragende Partikel kombiniert werden. Dieser Effekt spiegelt die Situation einer therapeutischen Vakzinierung oder einer Revakzinierung von Immunindividuen wider.

e) Induktion Antigen-spezifischer T-Zell-Reaktionen durch das Mikro-/Nanopartikel-Vakzin

Zur Untersuchung der Induktion spezifischer Immunantworten durch die Mikro-/Nanopartikel-Vakzine wurden iDCs aus peripherem humanem Blut für zwei Tage mit Trägerpartikeln kultiviert, die mit den T-Zell-Epitopen NLVPMVATV [SEQ ID NO: 6] (Fig. 16) oder GILGFVFTL [SEQ ID NO: 5] (Fig. 17), dem Immunmodulator P2C oder Kombinationen davon beladen waren und anschließend mit CD8-T-Zellen zusammengegeben und für 7 Tage inkubiert.

Danach wurde in den Zellkulturen die Proliferation von Effektor-T-Zellen mit Spezifität für Influenza bzw. CMV über rekombinante tetramerisierte MHC-Peptidkomplexe (HLA-A2.1-Moleküle, die die jeweiligen Peptide GILG bzw. NLVP trugen) per Durchflusszytometrie untersucht. Die iDCs und Effektor-T-Zellen wurden dabei jeweils aus peripherem Blut derselben gesunden Spender generiert.

Gegen das CMV-Epitop konnten mit das Epitop allein tragenden Partikeln, schwache T-Zell-Reaktivitäten induziert werden. Von Partikeln, die mit dem Epitop und dem Immunmodulator gleichzeitig beladen waren, wurde eine deutliche stärkere Reaktion hervorgerufen. Dieser Effekt belegt, dass das CMV-Epitop und der Immunmodulator gekoppelt sein müssen, um eine optimale Wirksamkeit zu entfalten.

Im für das Influenza-Epitop gezeigten Beispiel hingegen wurde die stärkste Immunstimulation mit einer Mischung von Partikeln erreicht, die das Epitop und den Immunmodulator separat trugen. Hier liegt also keine Kopplungsanforderung vor. Ein Gemisch der Partikel ist vorteilhafter.

In jedem Fall ist die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen, wie bereits in den vorhergehenden Experimenten gezeigt, von der gleichzeitigen Gabe des spezifischen Epitops und des Immunmodulators abhängig, die je nach Situation und Antigen gekoppelt auf denselben Partikeln oder ungekoppelt vorliegen sollten. Die wenigen Tetramer- und CD8-postiven Zellen, die bereits in den T-Zell-Kulturen mit oder ohne iDCs nachgewiesen werden konnten, zeigen, dass die Spender in diesen Beispielen bereits längere Zeit zuvor mit den Viren, aus denen die Epitope stammen, Kontakt gehabt hatten. Die durchgeführten Experimente entsprechen damit der Situation einer therapeutischen oder Revakzinierung.

Beispiel E - Toxizität der Modellvakzine

In den Zellkultur-, Organkultur- und *in vivo* Untersuchungen ergaben sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 fM bis 500 µM für die Modell-Epitope Pan-DR-E, GILGFVFTL (SEQ ID NO: 5) und NLVPMVATV (SEQ ID NO: 6) sowie für die Lipopeptid-Adjuvantien keine Hinweise auf eine toxische Wirkung des erfindungsgemäßen Mikro-/Nanopartikel-Vakzins.

Bei Untersuchungen zur Zytotoxizität der Trägerpartikel auf RKO-Zellen konnte für 2%-ige Suspensionen unterschiedlich beschichteter Trägerpartikel keine Beeinflussung der Überlebensrate festgestellt werden.

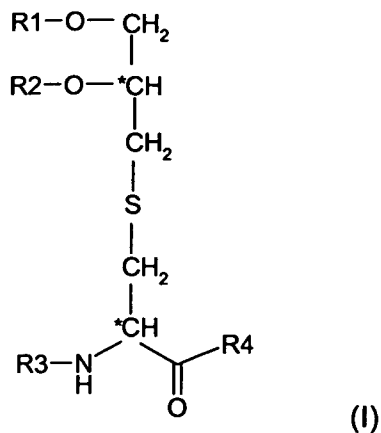
Auch im Tierexperiment am Schwein konnten nach Auftragen von 2 mL einer 1%-igen, in Agarose-Gel formulierten Mikro-/Nanopartikel-Vakzine, keine Nebenwirkungen beobachtet werden.

Insgesamt konnte in den experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die mit den Vakzinkomponenten beladenen Trägerpartikel effektiv in die Haarfollikel transportiert werden und dort für ca. 5 - 10 Tage verbleiben sowie dass die Wirkstoffe erst im Haarfollikel gezielt
5 freigesetzt werden, anschließend zu den DCs in der Epidermis der Haut diffundieren und von diesen aufgenommen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Partikel-gekoppelten Vakzinkomponenten eine zu den freien Wirkstoffen vergleichbare und teilweise effektivere spezifische T-Zell-Reaktion induzieren, die von den peptidischen Ladungs-Tags nicht beeinträchtigt wird.

Patentansprüche

1. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin, aufweisend die Grundkomponenten
 - (i) eine oder mehrere Antigen-Determinante(n) für zytotoxische Effektor-T-Zellen,
 - (ii) eine oder mehrere Antigen-Determinante(n) für Helfer-T-Zellen und
 - (iii) einen oder mehrere Immunmodulator(en) zur Aktivierung von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen,wobei die Vakzinkomponenten an ein mikro- und/oder nanoskaliges Trägerpartikel gekoppelt sind.
2. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 1, wobei das mikro- und/oder nanoskalige Trägerpartikel so gestaltet ist, dass es nach topischer Applikation auf die Hautoberfläche aktiv in die Haarfollikel transportiert und dort temporär deponiert wird, so dass die Vakzinkomponenten über die Stimulierung der dendritischen Zellen der Haut eine T-Zell-vermittelte Immunität induzieren.
3. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 1 oder 2, wobei das mikro- und/oder nanoskalige Trägerpartikel einen Durchmesser im Bereich von 100 nm bis 3.000 nm aufweist.
4. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 3, wobei das mikro- und/oder nanoskalige Trägerpartikel einen Durchmesser im Bereich von 300 nm bis 1.500 nm aufweist.
5. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die eine oder mehreren Antigen-Determinante(n) für zytotoxische Effektor-T-Zellen und/oder die eine oder mehreren Antigen-Determinante(n) für Helfer-T-Zellen eine Aminosäuresequenz eines geeigneten Epitops aufweist/aufweisen.
6. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die eine oder mehreren Antigen-Determinante(n) für zytotoxische Effektor-T-Zellen ein CTL-Epitop, ein Polyepitop, ein Biopolymer, ein Protein, DNA, RNA, ein Polysaccharid, ein Glykolipid und/oder ein Glykoprotein aufweist/aufweisen.
7. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Kopplung der Vakzinkomponenten an das mikro- und/oder nanoskaligen Trägerpartikel auf chemischen und/oder physikalischen Wechselwirkungen basiert.

8. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 7, wobei die chemischen und/oder physikalischen Wechselwirkungen eine kovalente Wechselwirkung, eine ionische Wechselwirkung, eine Van-der-Waals-Wechselwirkung, eine Wasserstoffbrückenbindung, eine adhäsive Bindung, eine elektrostatische Wechselwirkung und/oder eine magnetische Wechselwirkung aufweisen.
9. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 8, wobei eine oder mehrere Vakzinkomponenten Ladungs-Tags aufweisen und wobei die Kopplung der Vakzinkomponenten an das mikro- und/oder nanoskalige Trägerpartikel auf elektrostatischer Wechselwirkung zwischen der polarisierten Oberfläche eines mit einer Folge geladener Polymere beschichteten Kerns und dem Ladungs-Tag der Vakzinkomponente(n) basiert.
10. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 9, wobei das Ladungs-Tag eine Folge von 4 - 10 basischen oder sauren Aminosäuren aufweist.
11. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die eine oder mehreren Antigen-Determinante(n) für Helfer-T-Zellen ein Pan-DR-Epitop als degeneriertes Peptid für alle HLA-DR-Allotypen aufweist/aufweisen.
12. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der eine oder die mehreren Immunmodulator(en) zur Aktivierung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen ein synthetisches Analogon eines bakteriellen Lipopeptids aufweist/aufweisen.
13. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei zwei oder mehr der drei Grundkomponenten kovalent oder nicht-kovalent miteinander verbunden sind.
14. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Immunmodulator ein Lipopeptid mit der allgemeinen Struktur (I) ist,



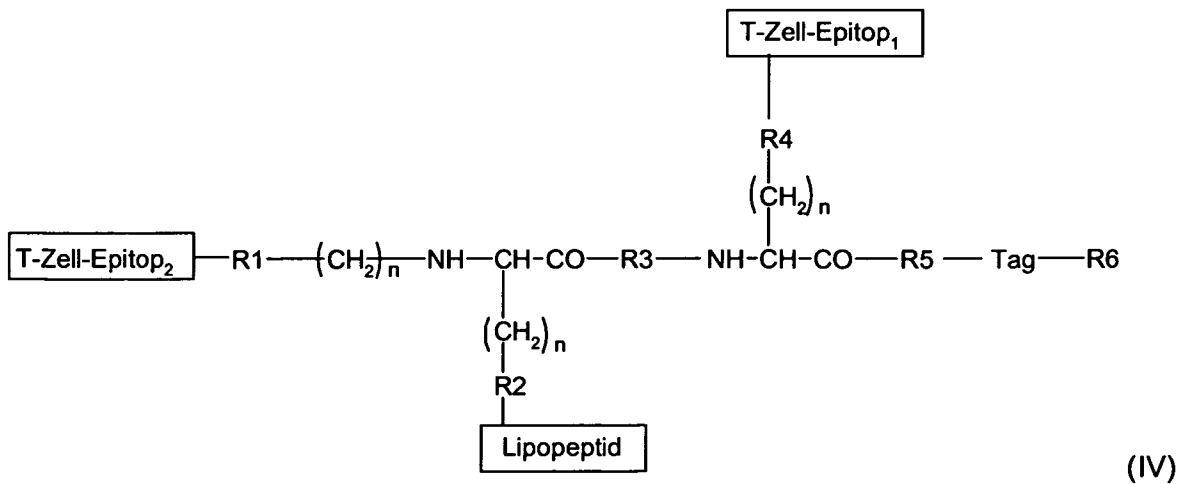
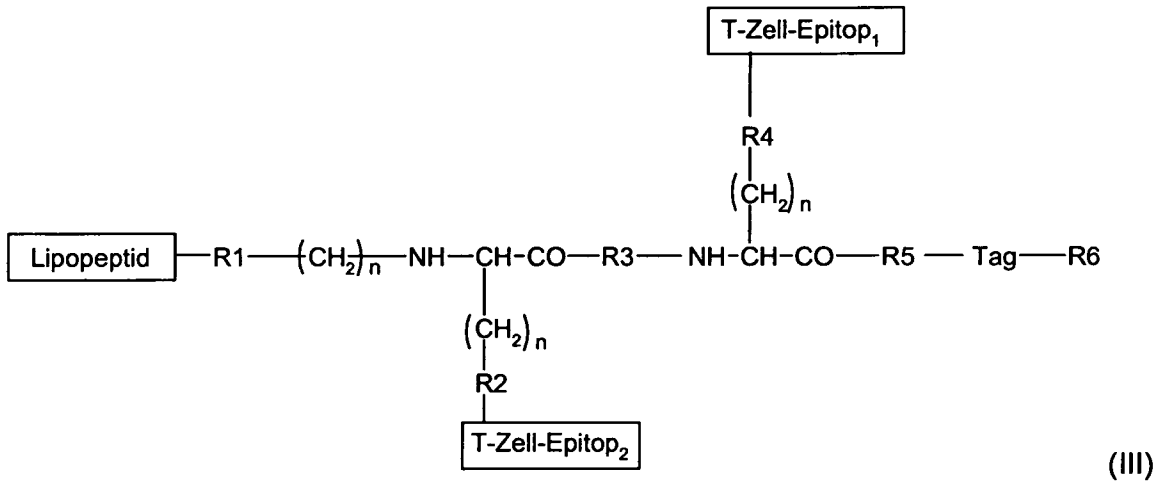
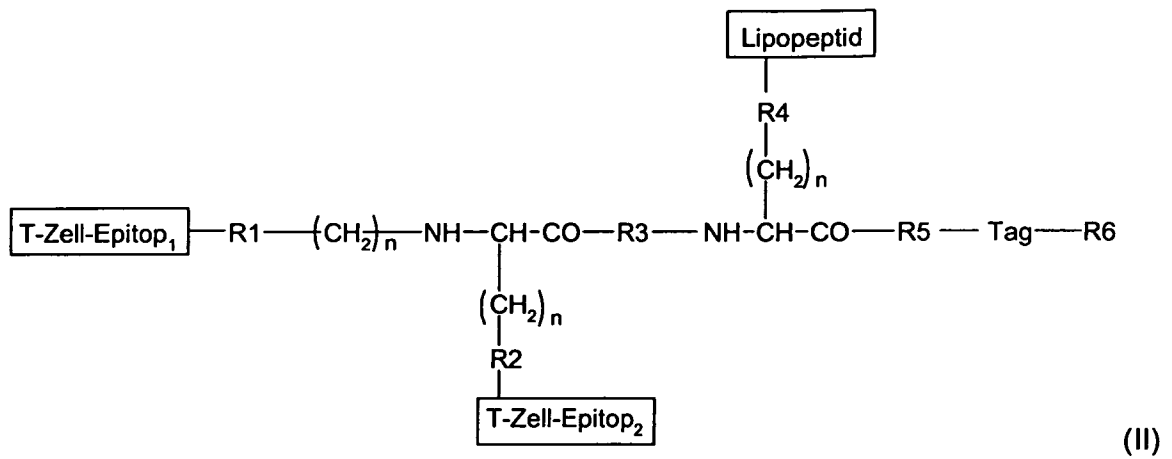
wobei

R1 und R2, die gleich oder verschieden sein können, für einen gesättigten oder ungesättigten Acyl-Rest mit 7 bis 25 C-Atomen,

R3 für einen gesättigten oder ungesättigten Acyl-Rest mit 7 bis 25 C-Atomen oder H und

R4 für ein aus 1 bis 25 Aminosäure-Resten bestehendes, physiologisch verträgliches und in der behandelten Spezies nicht per se immunogenes Peptid stehen, einschließlich der entsprechenden pharmazeutisch akzeptablen Salze, Tautomere, Stereoisomere, Stereoisomeren-Gemische, Prodrug-Ester oder Prodrug-Peptide.

15. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 14, wobei das Lipopeptid als *RR*-Stereoisomer des Dihydroxypropylcysteins vorliegt.
16. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 14 oder 15, wobei R1, R2 und/oder R3 für einen gesättigten Acyl-Rest mit 16 C-Atomen stehen.
17. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei R4 für ein Peptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 steht.
18. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jedes Trägerpartikel jeweils eine, mehrere oder alle Vakzinkomponenten in einem entsprechend dem Wirkspektrum des Vakzins definierten molaren Verhältnis trägt.
19. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 18, wobei die Vakzinkomponenten einzeln oder als Konjugat an das Trägerpartikel gekoppelt sind.
20. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Vakzinkomponenten zu einem Konjugat nach einer der folgenden allgemeinen Strukturen (II), (III) der (IV) verknüpft sind



wobei

n jeweils für eine natürliche Zahl von 0 bis 6,

R1, R2, R3, R4, R5 und R6, die gleich oder verschieden sein können,

für einen Aminosäure-Spacer mit einer Länge von 0 bis 6 Aminosäuren,

T-Zell-Epitop₁ und T-Zell-Epitop₂, die gleich oder verschieden sein können, für eine Aminosäure-Sequenz eines Epitops für zytotoxische Effektor-T-Zellen oder eines Epitops für Helfer-T-Zellen,

Lipopeptid für einen Immunmodulator gemäß Formel (I) nach einem der Ansprüche 14 und 15 und

Tag für eine Folge von 4 - 10 basischen oder sauren Aminosäuren stehen, einschließlich der entsprechenden pharmazeutisch akzeptablen Salze, Tautomere, Stereoisomere, Stereoisomeren-Gemische, Prodrug-Ester oder Prodrug-Peptide.

21. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der vorangehenden Ansprüche zur medizinischen Anwendung.
22. Pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine therapeutisch effektive Menge eines Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzins nach einem der vorhergehenden Ansprüche allein oder in Kombination, wobei das Präparat in einer zur topischen Applikation geeigneten Formulierung vorliegt.
23. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach Anspruch 21, wobei die medizinische Anwendung aufweist, dass die reversibel gekoppelten Vakzinkomponenten
 - (i) unter den im Haarfollikel herrschenden physiologischen Bedingungen gezielt freigesetzt werden,
 - (ii) durch Diffusion zu den Zielstrukturen, den dendritischen Zellen in der Epidermis der Haut, gelangen und
 - (iii) dort eine T-Zell-basierte Vakzinantigen-spezifische Immunreaktion auslösen.
24. Mikro- und/oder Nanopartikel-Vakzin nach einem der Ansprüche 21 oder 23 zur Anwendung in der prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Erkrankungen bei Mensch und Tier, die mit Infektionen, Krebs, Autoimmunerkrankungen oder entzündlichen und allergischen Leiden in Zusammenhang stehen bzw. zur Unterstützung einer konventionellen Impfung wobei die Behandlung bei dem behandelten Subjekt nach Applikation einer therapeutisch effektiven Menge einer oder mehrerer Vakzine durch Einmassieren in die Haut an einer oder mehreren räumlich getrennten Stellen sowie zum gleichen oder unterschiedlichen Zeitpunkten, eine für die eingesetzten Antigen-Determinanten spezifische Immunantwort hervorrufen.

1/17

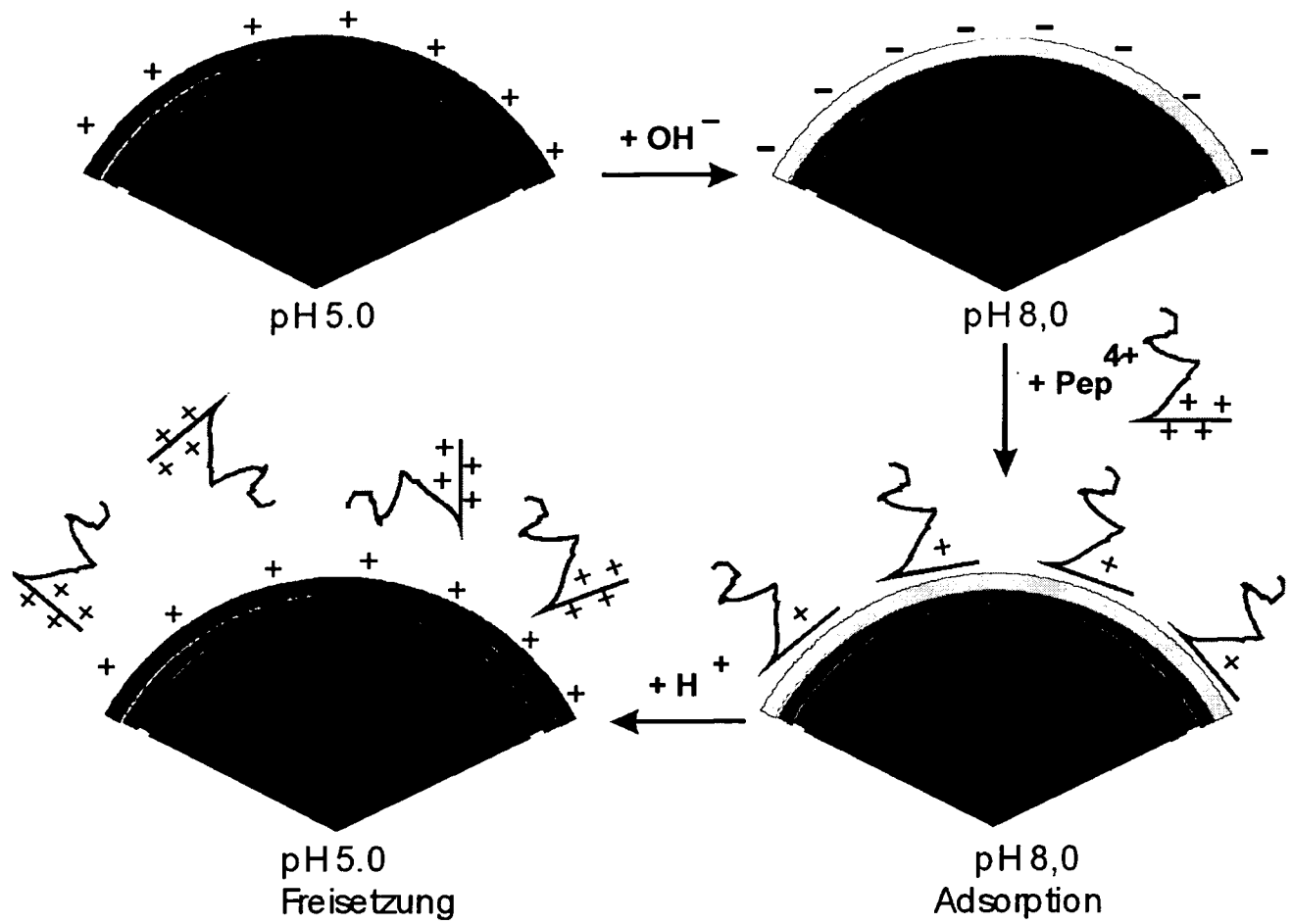
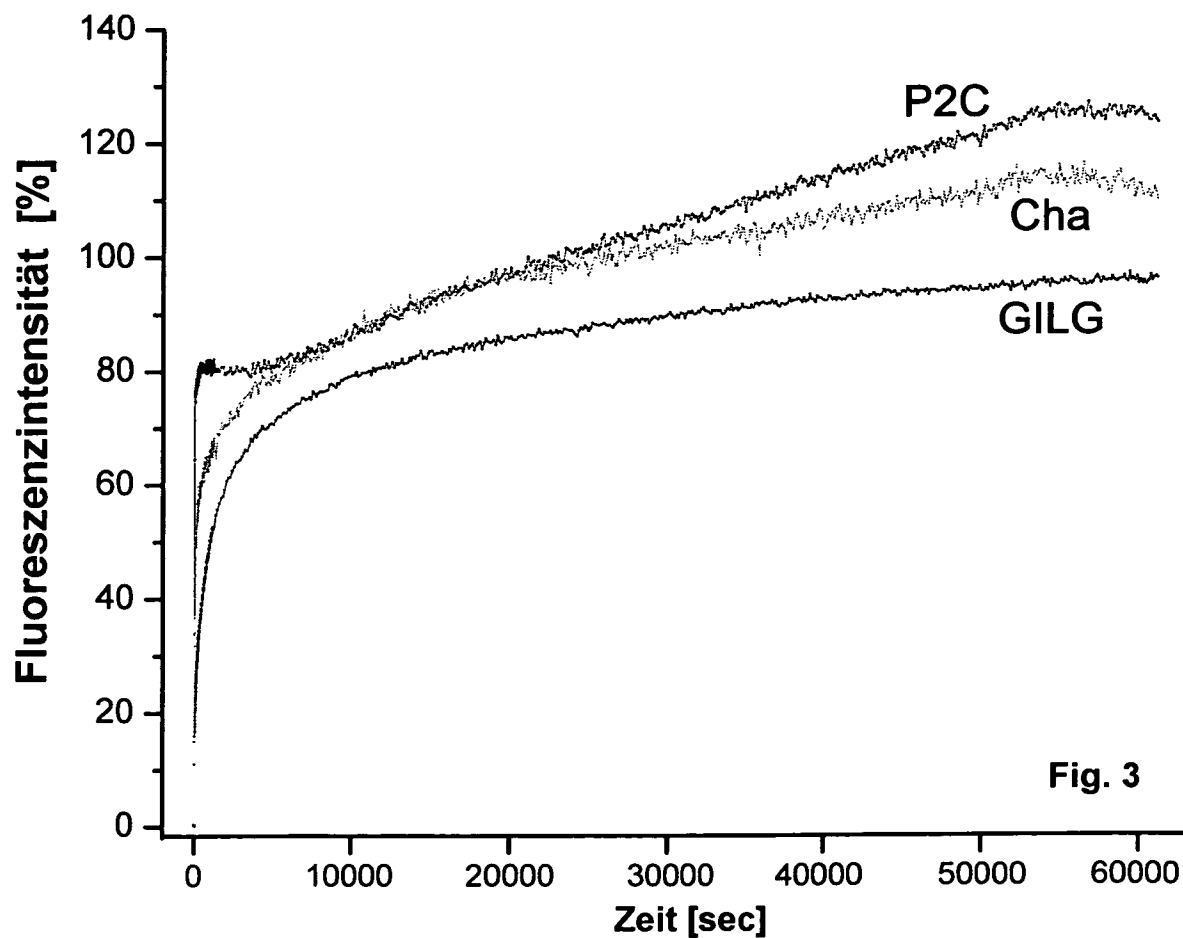
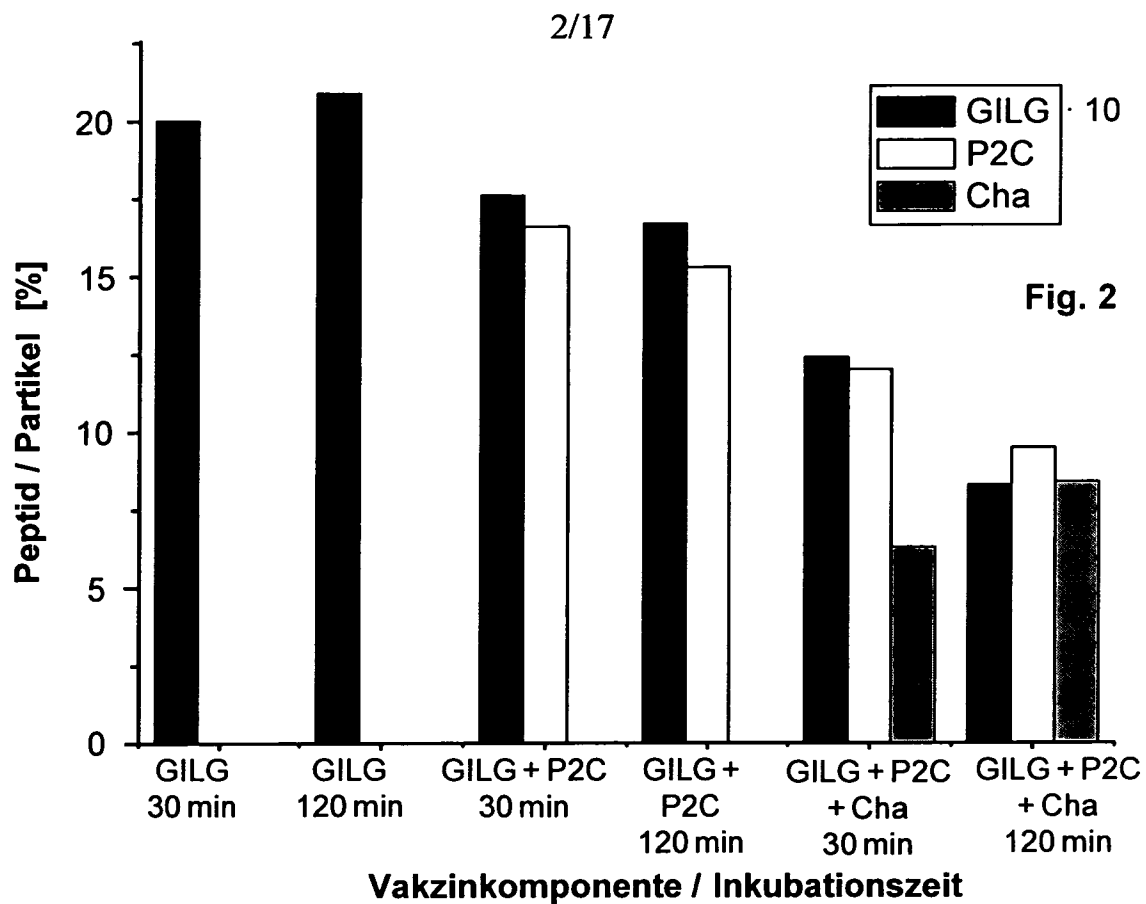


Fig. 1



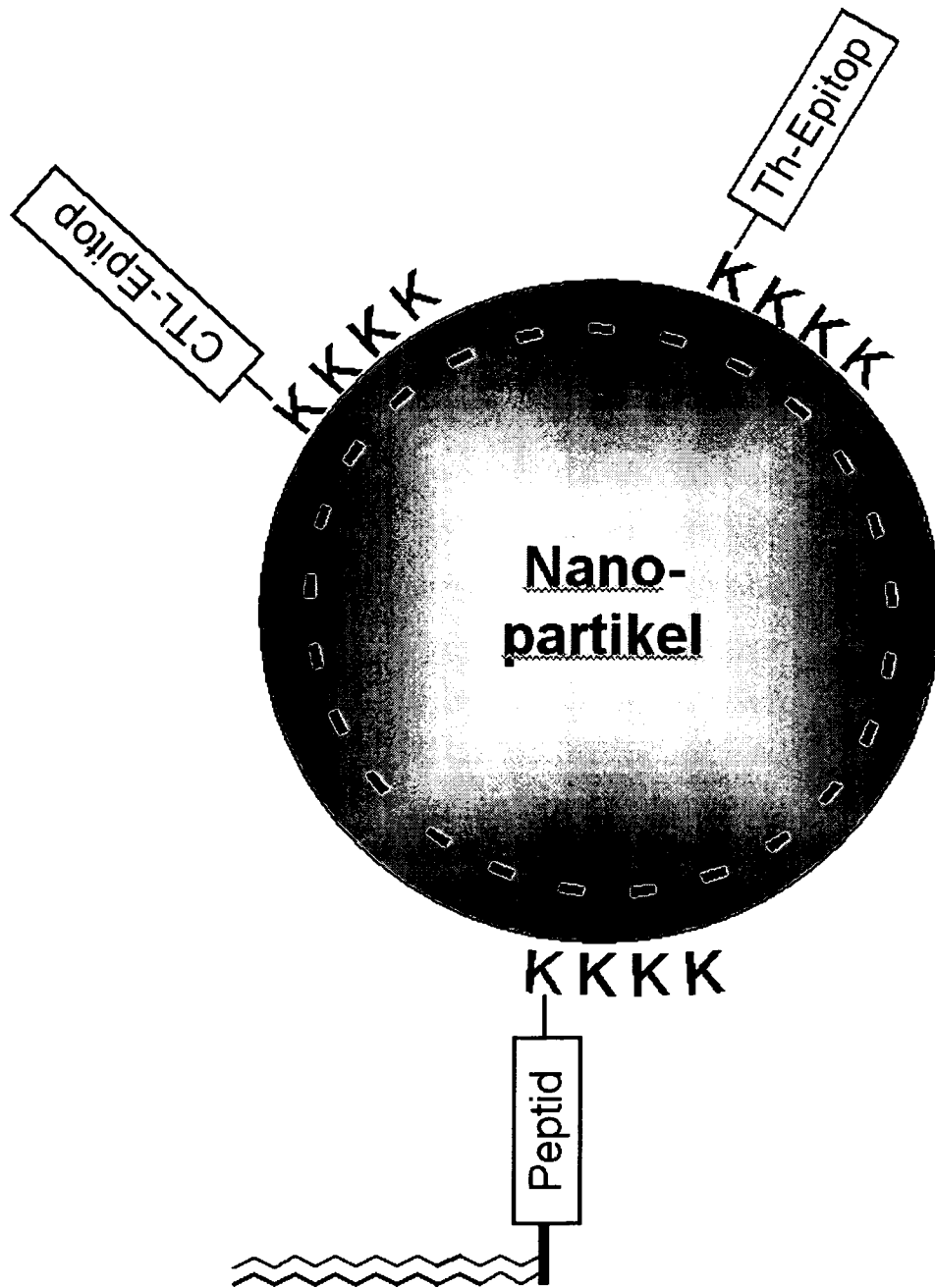


Fig. 4

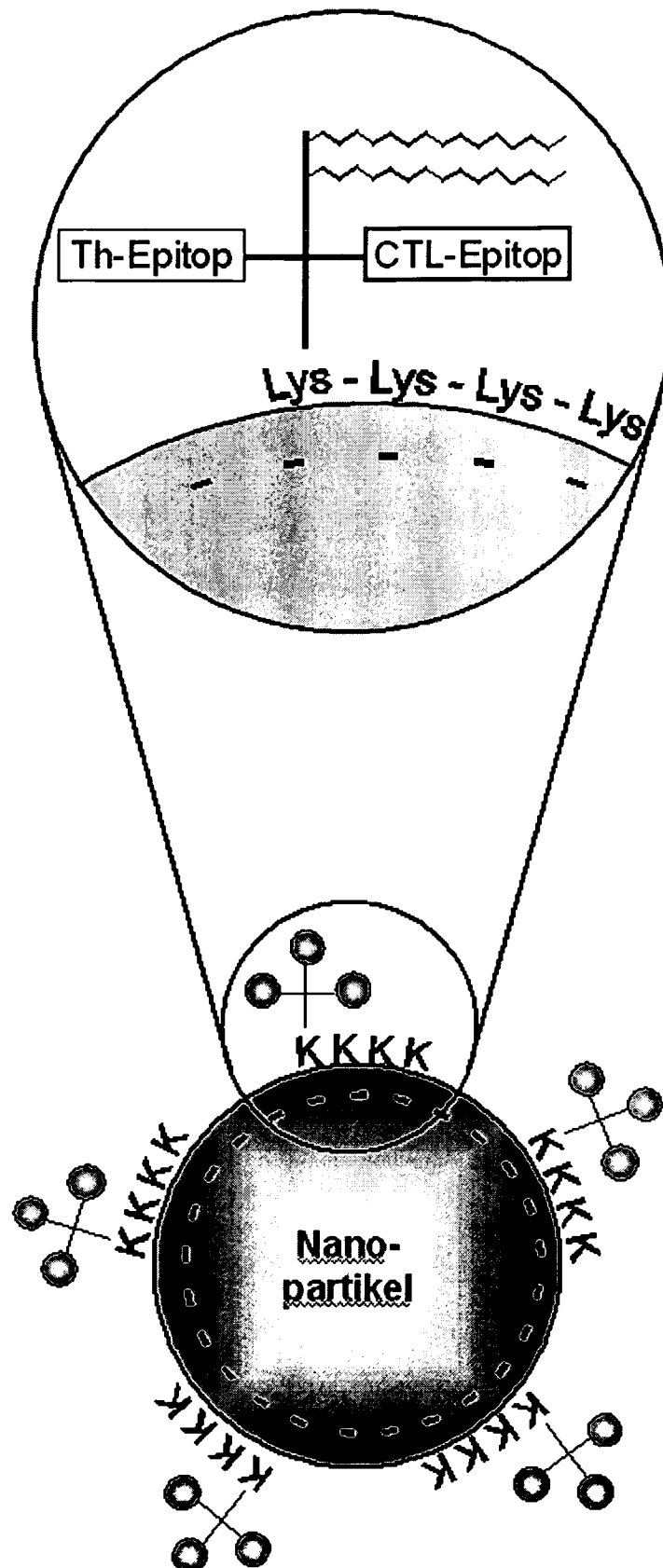


Fig. 5

5/17

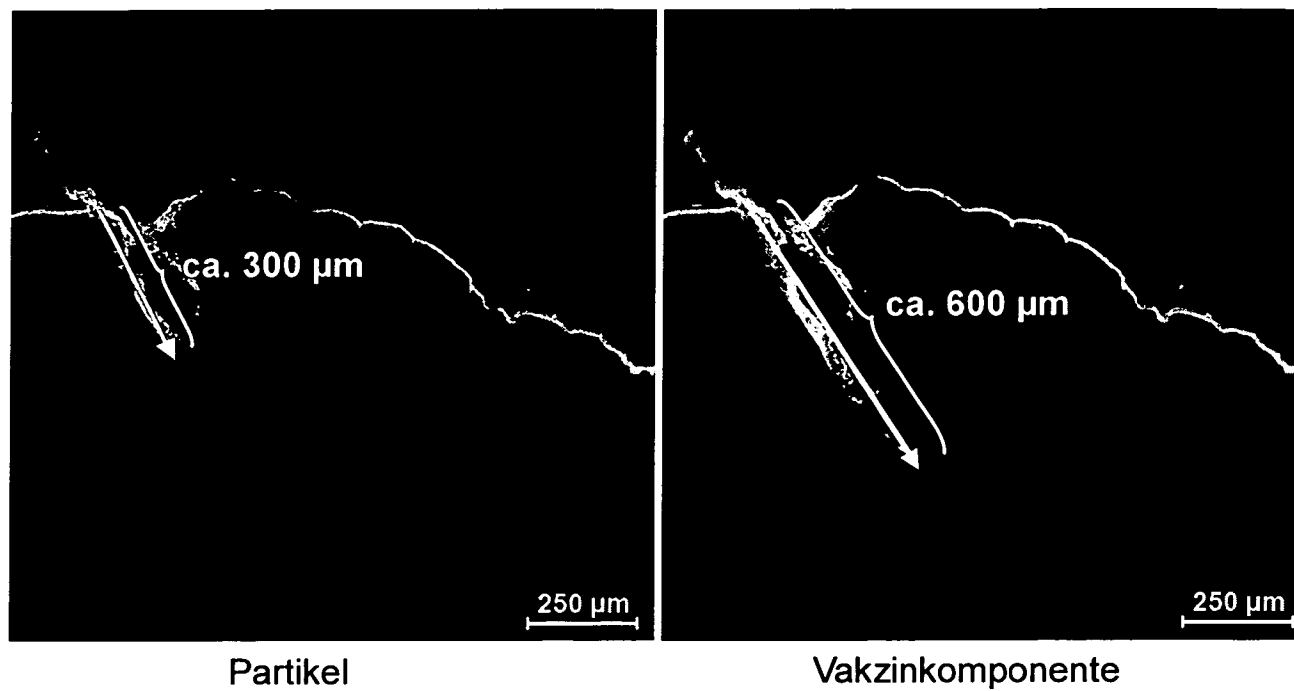


Fig. 6

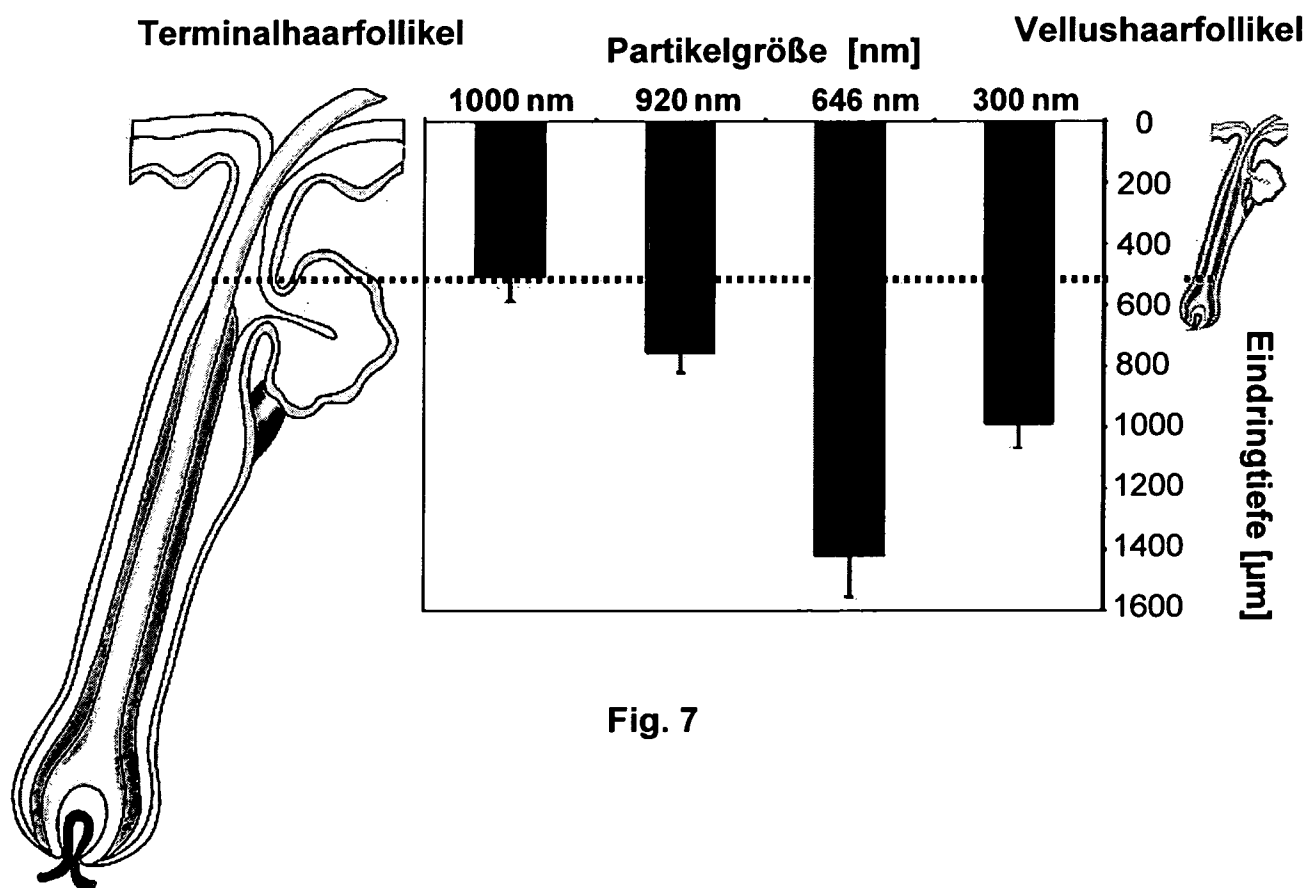


Fig. 7

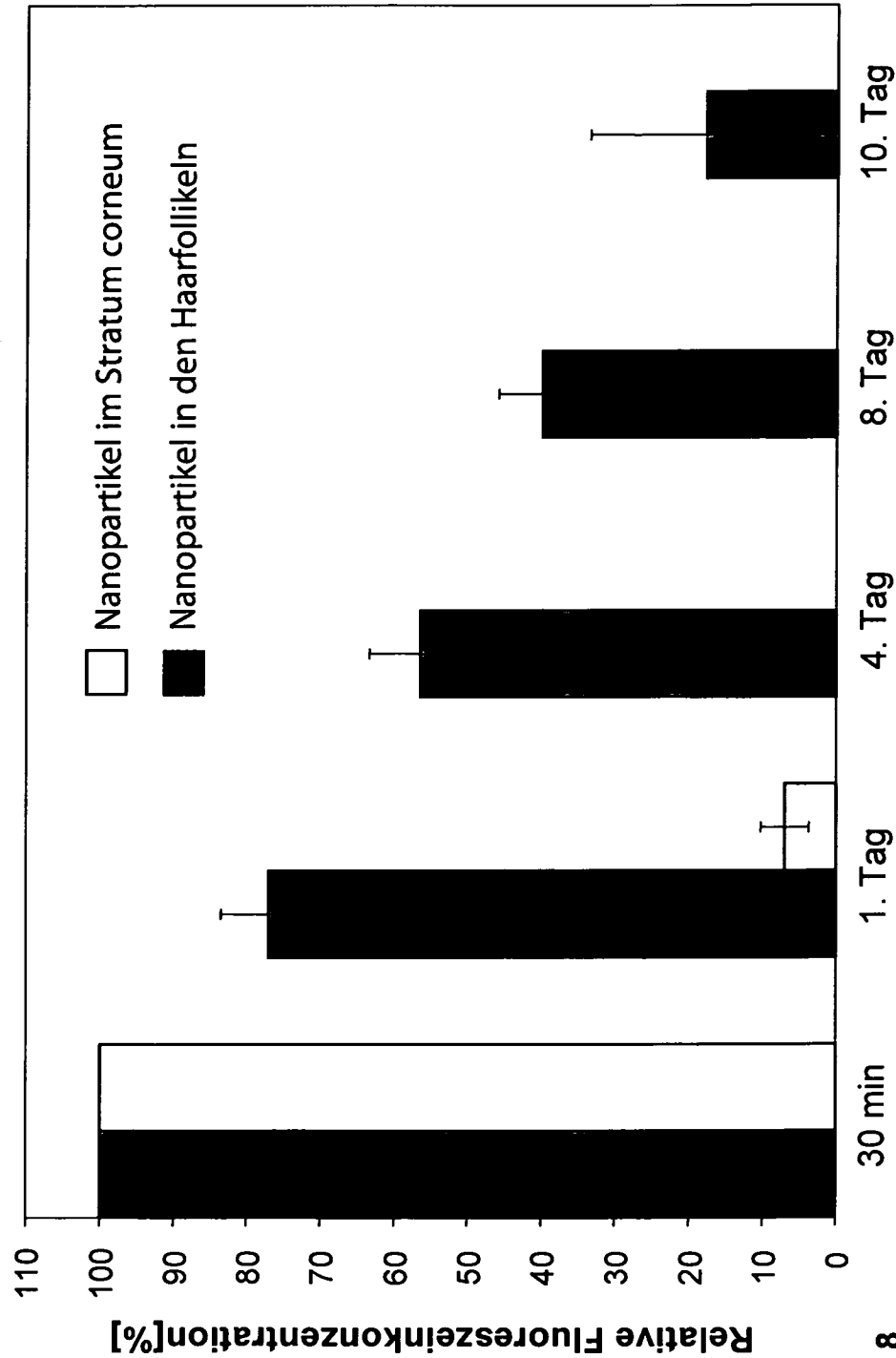


Fig. 8

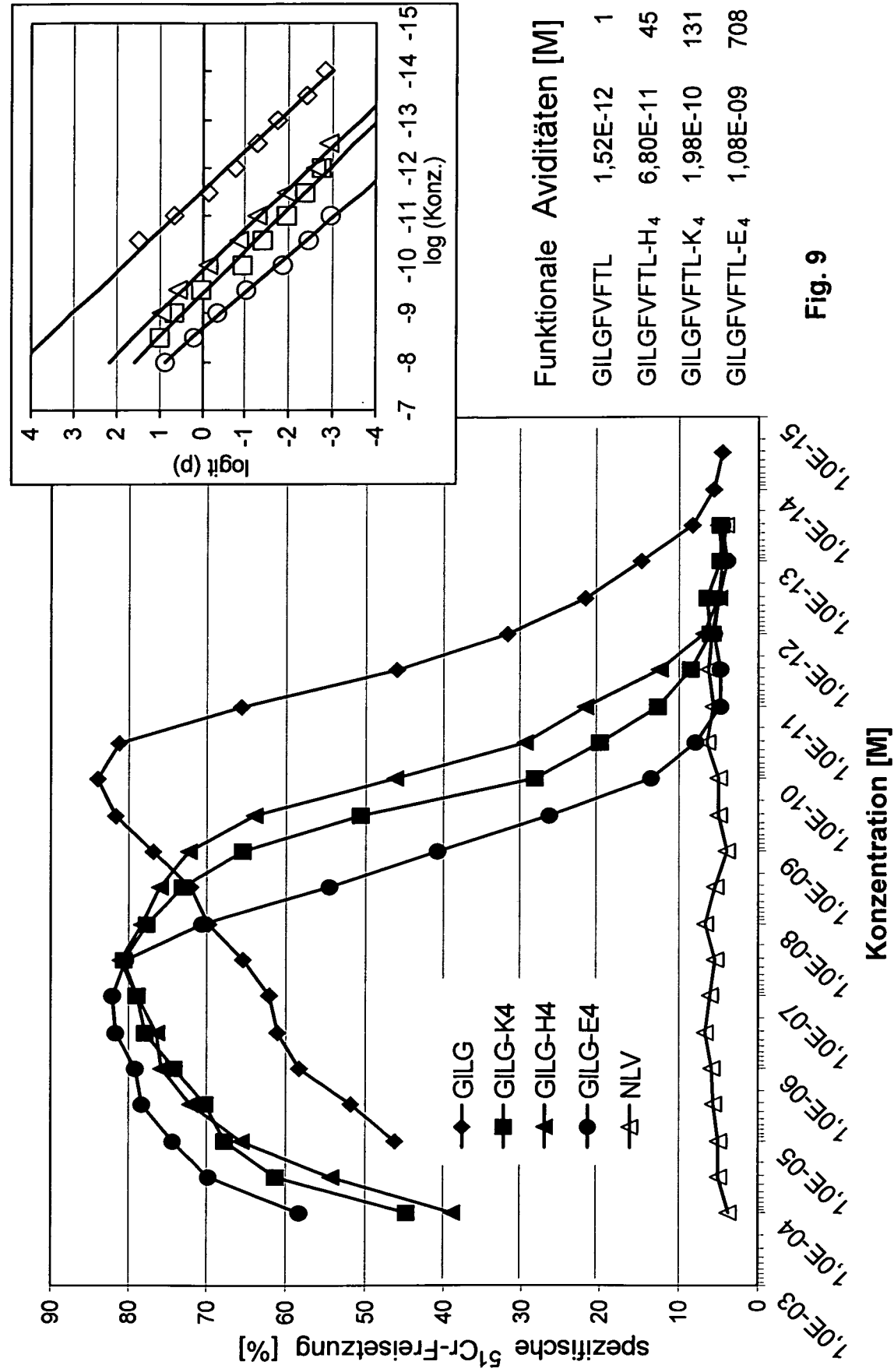


Fig. 9

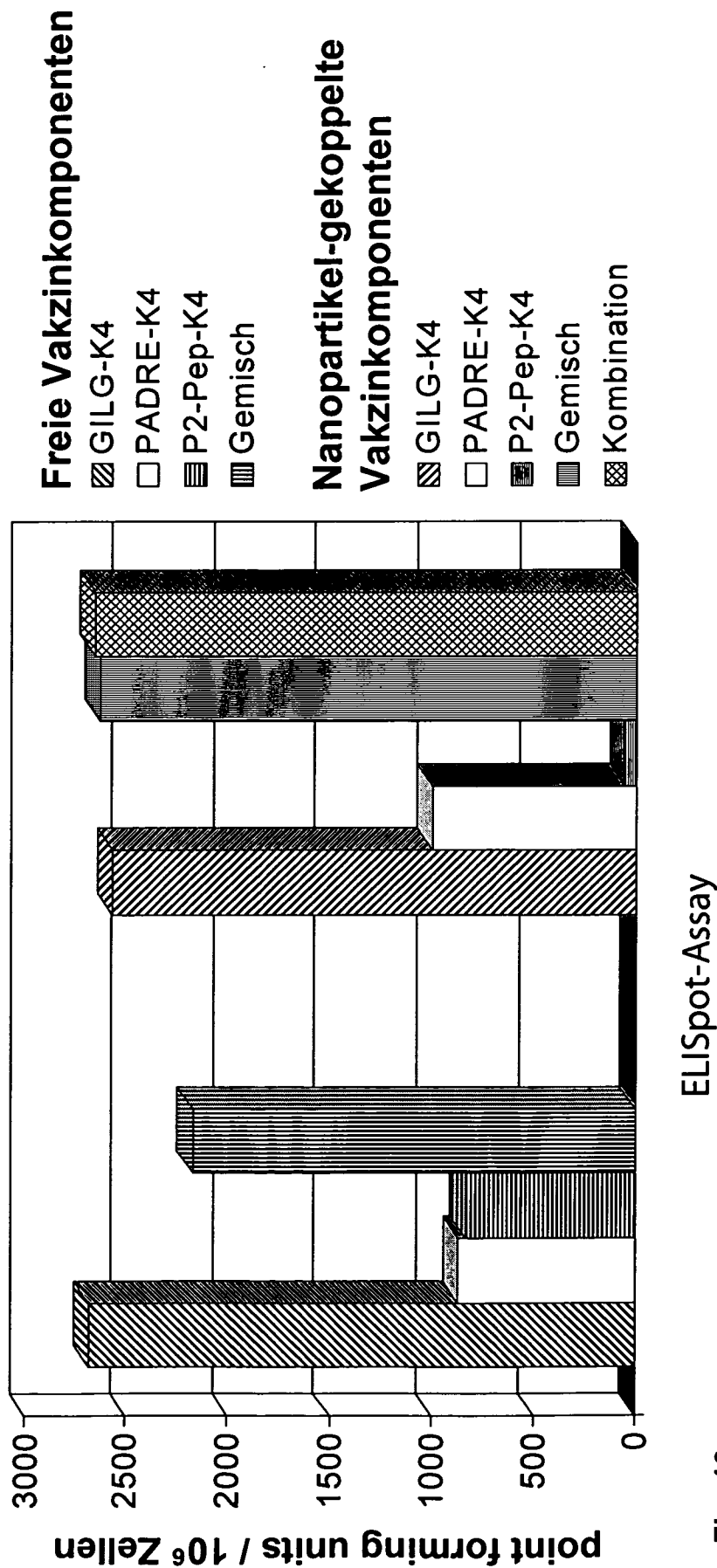
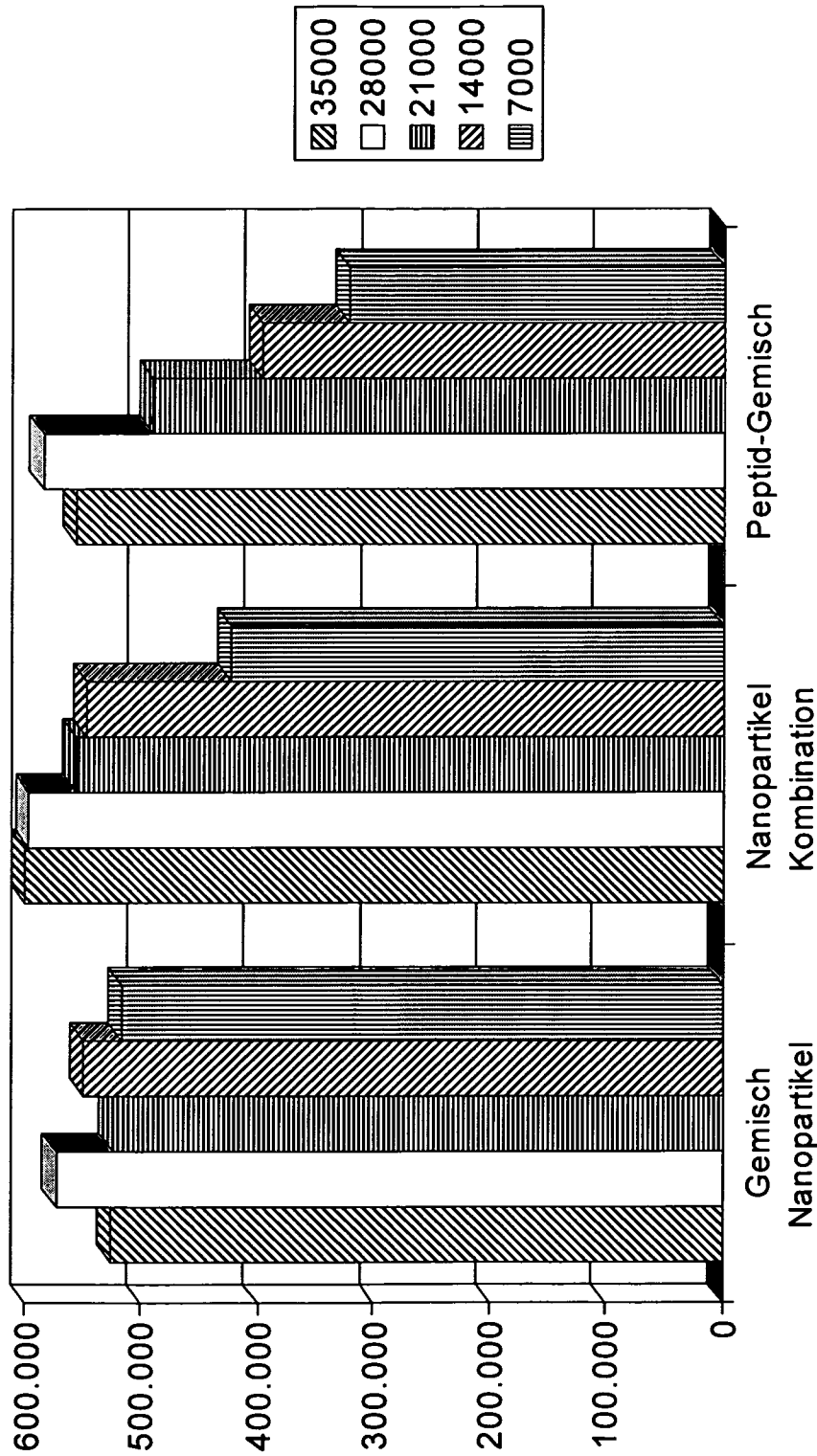
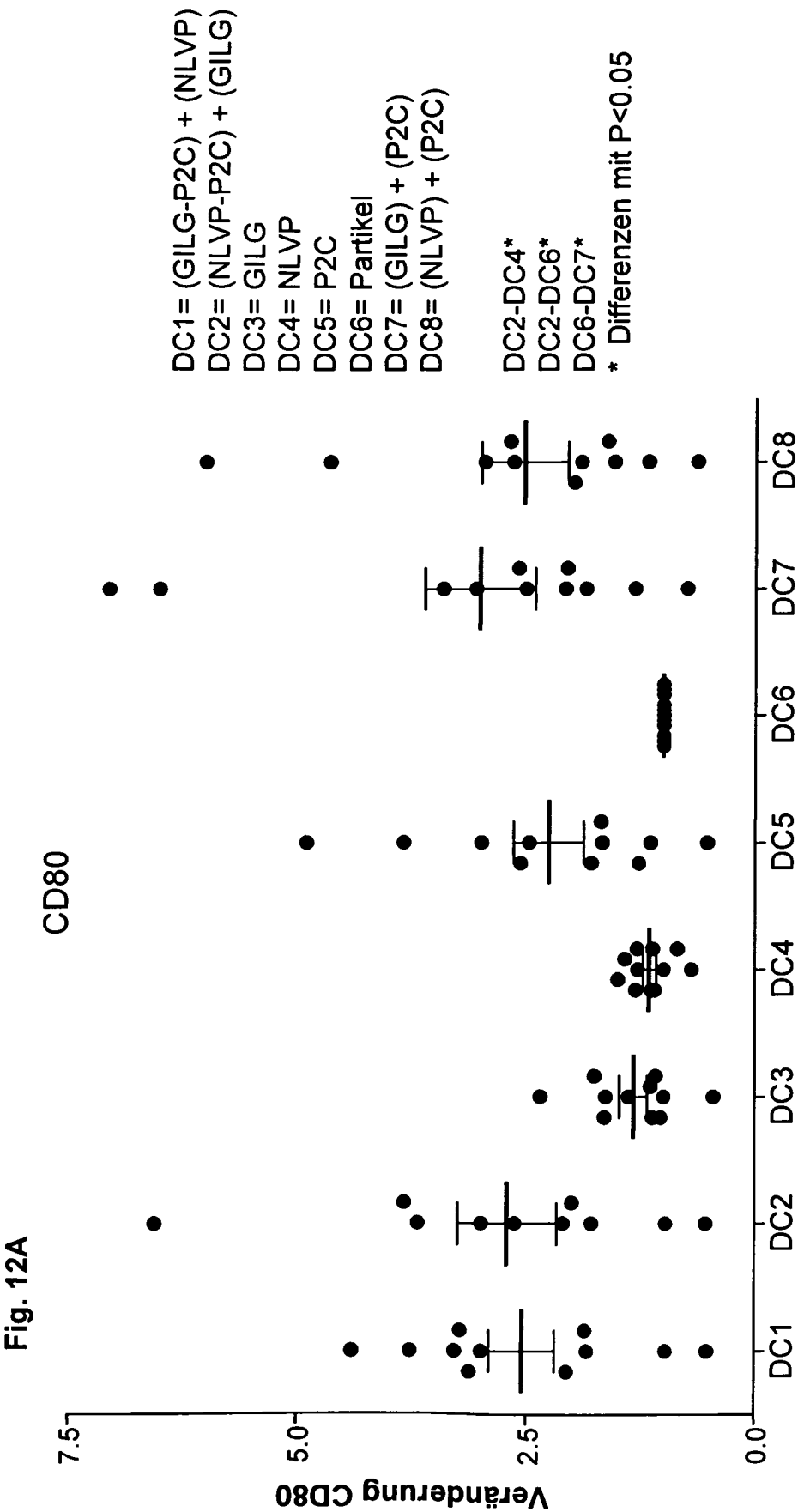


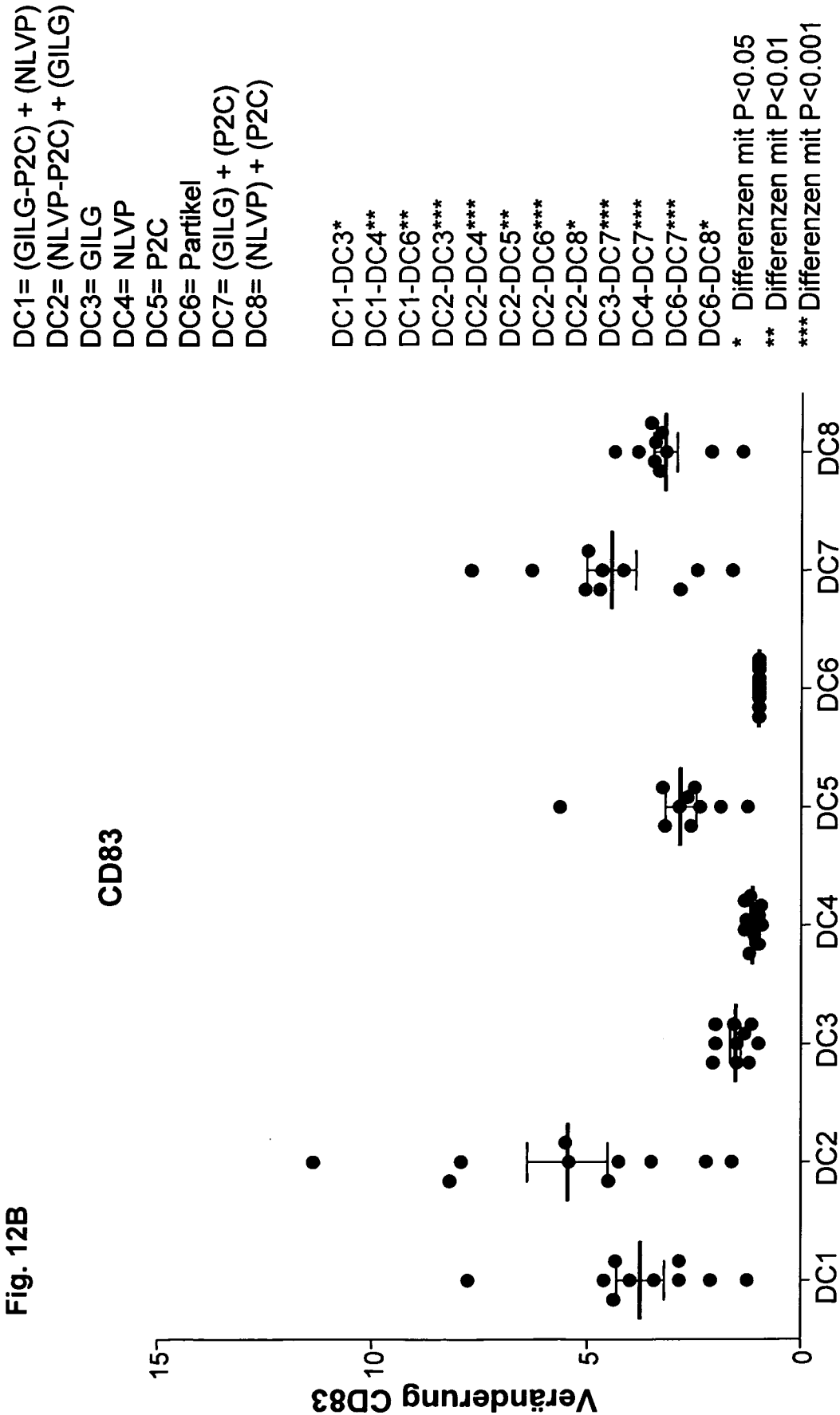
Fig. 10



ELISpot-Assay

Fig. 11





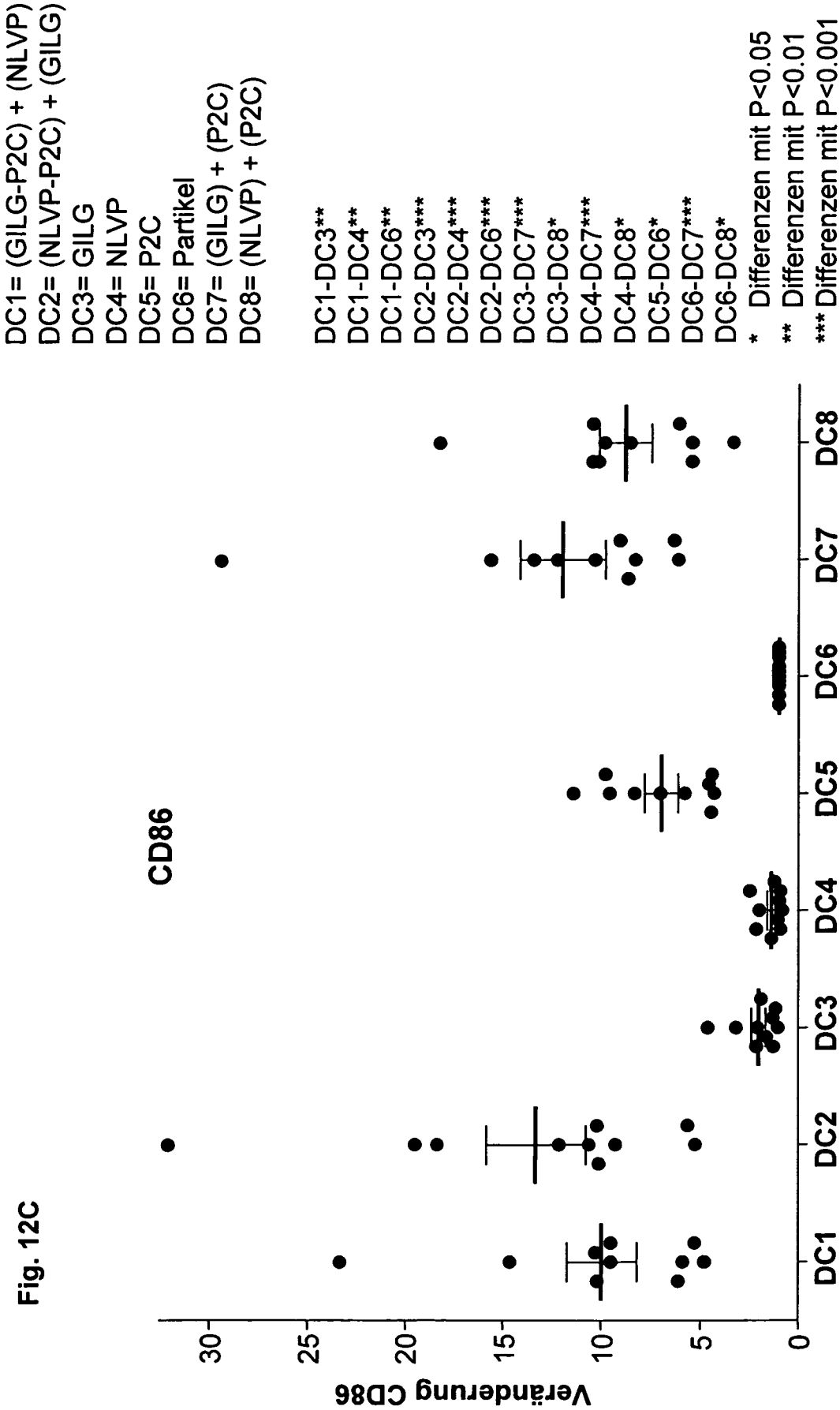
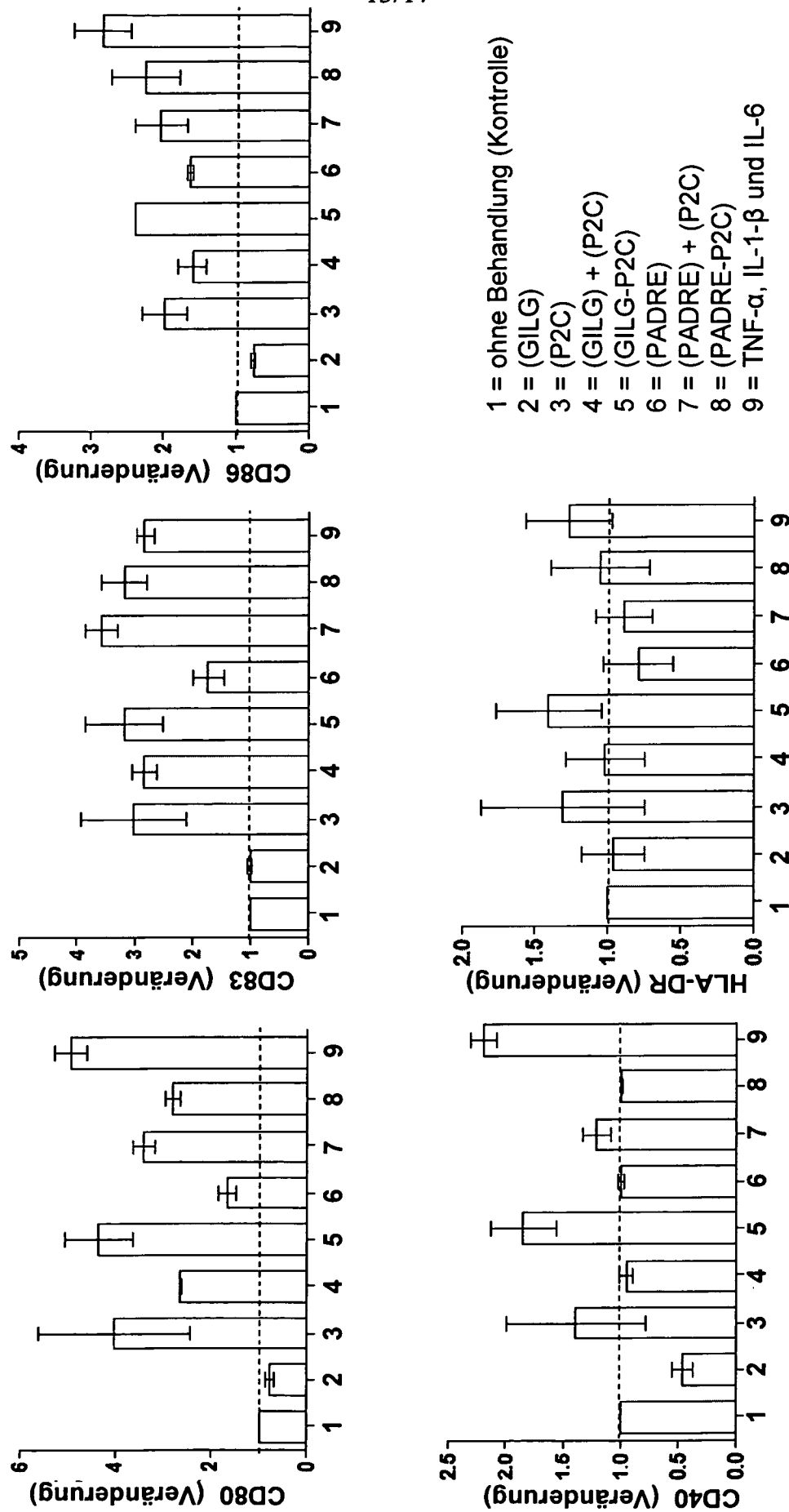


Fig. 13



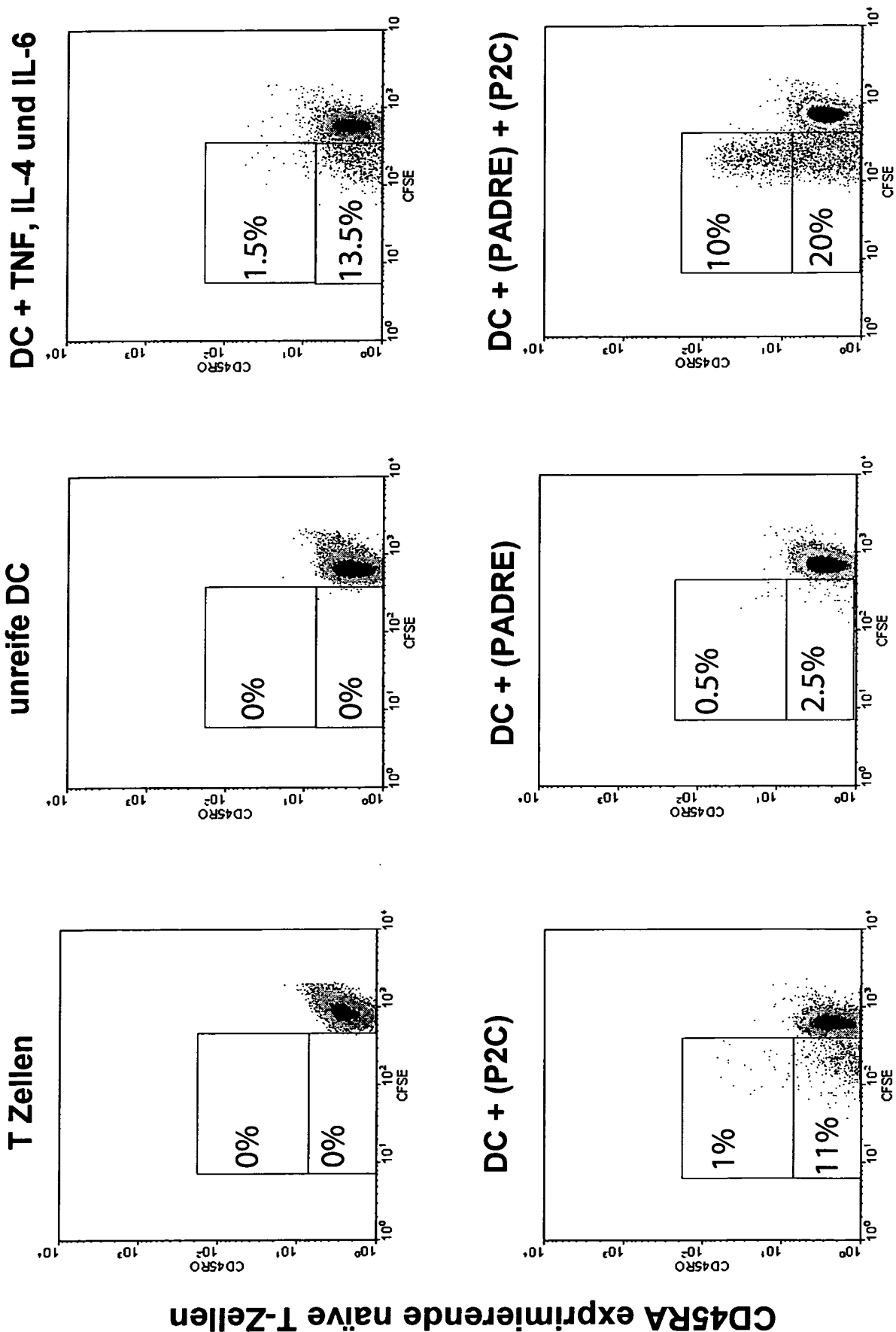


Fig. 14

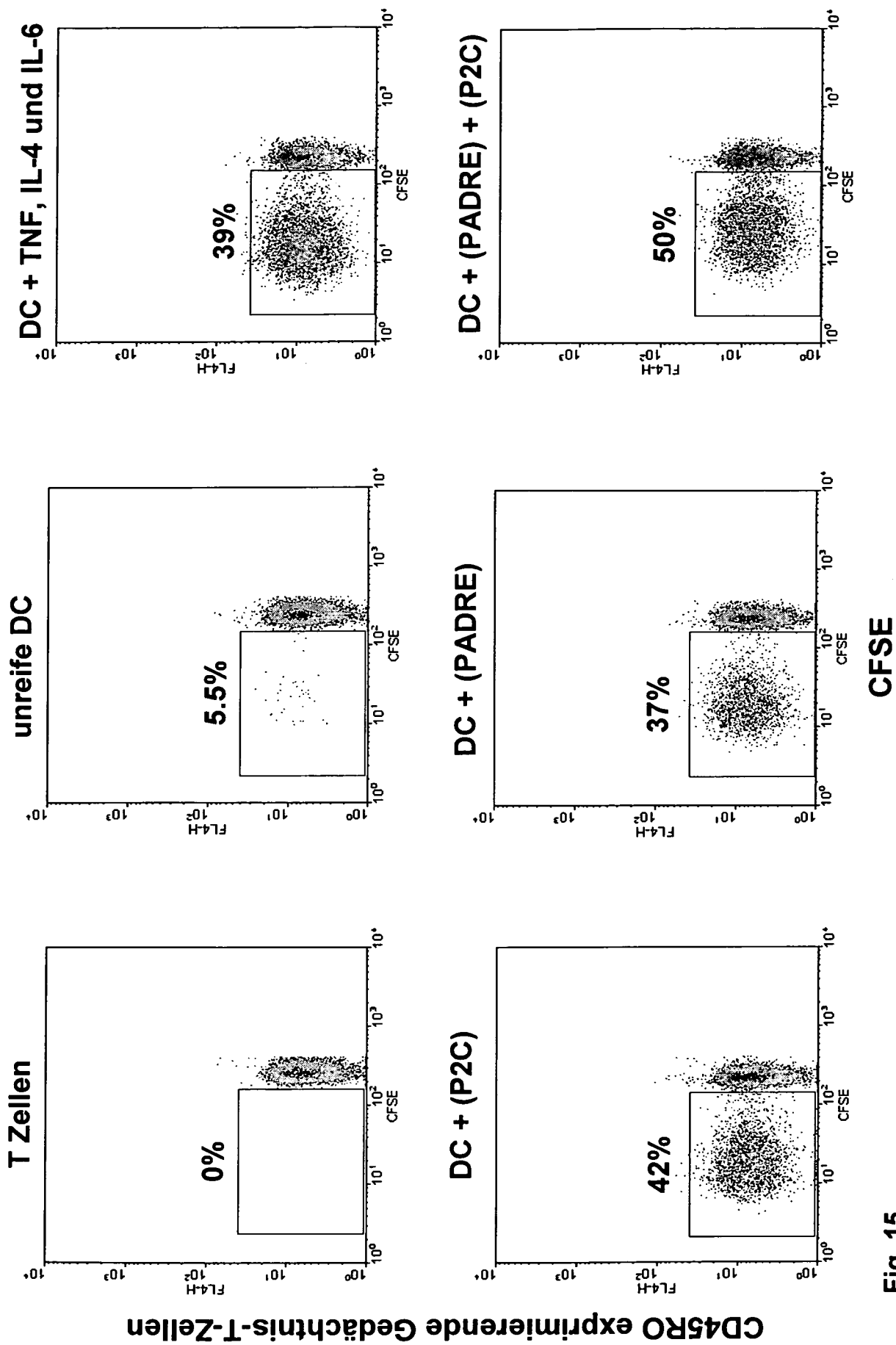
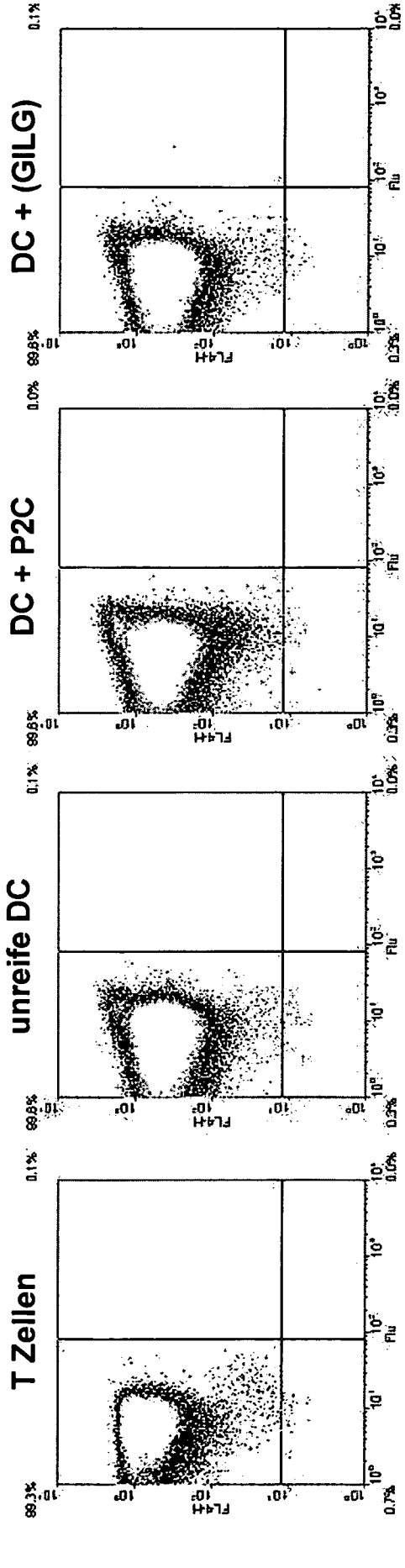


Fig. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/001738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/39 A61K49/14
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/002818 A2 (US ARMY [US]; LANAR DAVID [US]; BURKHARD PETER [US]) 7 January 2010 (2010-01-07) das ganze Dokument, besonders Zusammenfassung, Paragraphen [10, 40], Ansprüche 1 und 4 -----	1-24
Y	X. WANG ET AL: "Induction of Potent CD8+ T-Cell Responses by Novel Biodegradable Nanoparticles Carrying Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 81, no. 18, 15 September 2007 (2007-09-15), pages 10009-10016, XP55026484, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00489-07 das ganze Dokument besonders Seite 10009 ----- -/-	1-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2012

Date of mailing of the international search report

24/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brück, Marianne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/001738

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARVE MINAL ET AL: "Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 26, no. 27, 20 September 2008 (2008-09-20), pages 4418-4425, XP009106492, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6462 das ganze Dokument, besonders Seiten 4418 und 4419 -----	1-24
Y	WO 2006/138238 A2 (CLEVELAND BIOLABS INC [US]; CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [US]; SHAKHOV) 28 December 2006 (2006-12-28) das ganze Dokument, besonders seq id no 24 -----	1-24
Y	EP 0 210 412 A2 (HOECHST AG [DE]) 4 February 1987 (1987-02-04) das ganze Dokument, besonders Seiten 4,9 und Anspruch 2 -----	1-24
Y	EP 0 519 327 A1 (HOECHST AG [DE]) 23 December 1992 (1992-12-23) das ganze Dokument, besonders Zusammenfassung, Seiten 2-3, Ansprüche -----	1-24
Y	WO 02/28887 A2 (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH [DE]; MUEHLRADT PETER [DE]; LUEHRMANN ANKE) 11 April 2002 (2002-04-11) das ganze Dokument, besonders Seite 3, Ansprüche -----	1-24
Y	WO 03/084568 A2 (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH [DE]; GUZMAN CARLOS ALBERTO [DE]; MUEHLRADT) 16 October 2003 (2003-10-16) das ganze Dokument -----	1-24
Y	LADEMANN J ET AL: "Wie sicher sind Nanopartikel?", DER HAUTARZT ; ZEITSCHRIFT FÜR DERMATOLOGIE, VENEROLOGIE UND VERWANDTE GEBIETE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 60, no. 4, 18 February 2009 (2009-02-18), pages 305-309, XP019669599, ISSN: 1432-1173 das ganze Dokument besonders Seiten 308 und 309 -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/001738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010002818 A2	07-01-2010	EP 2313108 A2 US 2012015000 A1 WO 2010002818 A2	27-04-2011 19-01-2012 07-01-2010
WO 2006138238 A2	28-12-2006	AU 2006259630 A1 BR PI0611586 A2 CA 2612102 A1 CN 101242852 A EA 200702510 A1 EP 1904084 A2 JP 2008543847 A KR 20080030566 A NZ 565063 A US 2009214467 A1 US 2011237507 A1 WO 2006138238 A2 ZA 200800126 A	28-12-2006 21-09-2010 28-12-2006 13-08-2008 30-06-2008 02-04-2008 04-12-2008 04-04-2008 29-04-2011 27-08-2009 29-09-2011 28-12-2006 28-10-2009
EP 0210412 A2	04-02-1987	AT 131491 T AU 611385 B2 AU 5894386 A CA 1340656 C DE 3546150 A1 DK 294086 A EP 0210412 A2 ES 8801677 A1 FI 862631 A JP 2594259 B2 JP 62063600 A NO 862511 A PT 82826 A	15-12-1995 13-06-1991 08-01-1987 20-07-1999 22-01-1987 25-12-1986 04-02-1987 16-04-1988 25-12-1986 26-03-1997 20-03-1987 29-12-1986 01-07-1986
EP 0519327 A1	23-12-1992	AT 184274 T DE 4119856 A1 DE 59209742 D1 DK 0519327 T3 EP 0519327 A1 ES 2137166 T3 GR 3031849 T3 JP 3358827 B2 JP 5186419 A US 5700910 A	15-09-1999 24-12-1992 14-10-1999 20-03-2000 23-12-1992 16-12-1999 29-02-2000 24-12-2002 27-07-1993 23-12-1997
WO 0228887 A2	11-04-2002	AT 399018 T AU 2058402 A CA 2424285 A1 DE 10048840 A1 DK 1322321 T3 EP 1322321 A2 ES 2309105 T3 JP 4541642 B2 JP 2004510783 A US 2004127405 A1 US 2004249133 A1 WO 0228887 A2	15-07-2008 15-04-2002 01-04-2003 11-04-2002 13-10-2008 02-07-2003 16-12-2008 08-09-2010 08-04-2004 01-07-2004 09-12-2004 11-04-2002
WO 03084568 A2	16-10-2003	AT 396740 T AU 2003226777 A1	15-06-2008 20-10-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/001738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2480196 A1	16-10-2003
		DK 1490106 T3	27-10-2008
		EP 1490106 A2	29-12-2004
		EP 1987841 A1	05-11-2008
		ES 2307958 T3	01-12-2008
		PT 1490106 E	05-09-2008
		SI 1490106 T1	28-02-2009
		US 2005276813 A1	15-12-2005
		WO 03084568 A2	16-10-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. A61K39/39 A61K49/14
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2010/002818 A2 (US ARMY [US]; LANAR DAVID [US]; BURKHARD PETER [US]) 7. Januar 2010 (2010-01-07) das ganze Dokument, besonders Zusammenfassung, Paragraphen [10, 40], Ansprüche 1 und 4 -----	1-24
Y	X. WANG ET AL: "Induction of Potent CD8+ T-Cell Responses by Novel Biodegradable Nanoparticles Carrying Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120", JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 81, Nr. 18, 15. September 2007 (2007-09-15), Seiten 10009-10016, XP55026484, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00489-07 das ganze Dokument besonders Seite 10009 ----- -/-	1-24



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. August 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/09/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brück, Marianne

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BARVE MINAL ET AL: "Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, Bd. 26, Nr. 27, 20. September 2008 (2008-09-20), Seiten 4418-4425, XP009106492, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6462 das ganze Dokument, besonders Seiten 4418 und 4419 -----	1-24
Y	WO 2006/138238 A2 (CLEVELAND BIOLABS INC [US]; CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [US]; SHAKHOV) 28. Dezember 2006 (2006-12-28) das ganze Dokument, besonders seq id no 24 -----	1-24
Y	EP 0 210 412 A2 (HOECHST AG [DE]) 4. Februar 1987 (1987-02-04) das ganze Dokument, besonders Seiten 4,9 und Anspruch 2 -----	1-24
Y	EP 0 519 327 A1 (HOECHST AG [DE]) 23. Dezember 1992 (1992-12-23) das ganze Dokument, besonders Zusammenfassung, Seiten 2-3, Ansprüche -----	1-24
Y	WO 02/28887 A2 (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH [DE]; MUEHLRADT PETER [DE]; LUEHRMANN ANKE) 11. April 2002 (2002-04-11) das ganze Dokument, besonders Seite 3, Ansprüche -----	1-24
Y	WO 03/084568 A2 (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH [DE]; GUZMAN CARLOS ALBERTO [DE]; MUEHLRADT) 16. Oktober 2003 (2003-10-16) das ganze Dokument -----	1-24
Y	LADEMANN J ET AL: "Wie sicher sind Nanopartikel?", DER HAUTARZT ; ZEITSCHRIFT FÜR DERMATOLOGIE, VENEROLOGIE UND VERWANDTE GEBIETE, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 60, Nr. 4, 18. Februar 2009 (2009-02-18), Seiten 305-309, XP019669599, ISSN: 1432-1173 das ganze Dokument besonders Seiten 308 und 309 -----	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/001738

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2010002818	A2	07-01-2010	EP	2313108 A2	27-04-2011
			US	2012015000 A1	19-01-2012
			WO	2010002818 A2	07-01-2010

WO 2006138238	A2	28-12-2006	AU	2006259630 A1	28-12-2006
			BR	PI0611586 A2	21-09-2010
			CA	2612102 A1	28-12-2006
			CN	101242852 A	13-08-2008
			EA	200702510 A1	30-06-2008
			EP	1904084 A2	02-04-2008
			JP	2008543847 A	04-12-2008
			KR	20080030566 A	04-04-2008
			NZ	565063 A	29-04-2011
			US	2009214467 A1	27-08-2009
			US	2011237507 A1	29-09-2011
			WO	2006138238 A2	28-12-2006
			ZA	200800126 A	28-10-2009

EP 0210412	A2	04-02-1987	AT	131491 T	15-12-1995
			AU	611385 B2	13-06-1991
			AU	5894386 A	08-01-1987
			CA	1340656 C	20-07-1999
			DE	3546150 A1	22-01-1987
			DK	294086 A	25-12-1986
			EP	0210412 A2	04-02-1987
			ES	8801677 A1	16-04-1988
			FI	862631 A	25-12-1986
			JP	2594259 B2	26-03-1997
			JP	62063600 A	20-03-1987
			NO	862511 A	29-12-1986
			PT	82826 A	01-07-1986

EP 0519327	A1	23-12-1992	AT	184274 T	15-09-1999
			DE	4119856 A1	24-12-1992
			DE	59209742 D1	14-10-1999
			DK	0519327 T3	20-03-2000
			EP	0519327 A1	23-12-1992
			ES	2137166 T3	16-12-1999
			GR	3031849 T3	29-02-2000
			JP	3358827 B2	24-12-2002
			JP	5186419 A	27-07-1993
			US	5700910 A	23-12-1997

WO 0228887	A2	11-04-2002	AT	399018 T	15-07-2008
			AU	2058402 A	15-04-2002
			CA	2424285 A1	01-04-2003
			DE	10048840 A1	11-04-2002
			DK	1322321 T3	13-10-2008
			EP	1322321 A2	02-07-2003
			ES	2309105 T3	16-12-2008
			JP	4541642 B2	08-09-2010
			JP	2004510783 A	08-04-2004
			US	2004127405 A1	01-07-2004
			US	2004249133 A1	09-12-2004
			WO	0228887 A2	11-04-2002

WO 03084568	A2	16-10-2003	AT	396740 T	15-06-2008
			AU	2003226777 A1	20-10-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/001738

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
		CA 2480196 A1	16-10-2003
		DK 1490106 T3	27-10-2008
		EP 1490106 A2	29-12-2004
		EP 1987841 A1	05-11-2008
		ES 2307958 T3	01-12-2008
		PT 1490106 E	05-09-2008
		SI 1490106 T1	28-02-2009
		US 2005276813 A1	15-12-2005
		WO 03084568 A2	16-10-2003
