



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 20 677 T2 2006.05.04

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 156 781 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 20 677.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/03331

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 907 228.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 00/50006

(86) PCT-Anmeldetag: 09.02.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 31.08.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 28.11.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 08.06.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.05.2006

(51) Int Cl.⁸: A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

121858 P 26.02.1999 US

146391 P 29.07.1999 US

161997 P 28.10.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Chiron Corp., Emeryville, Calif., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:

O'Hagan, Derek, Emeryville, US; Ott, Gary S., Emeryville, US; Donnelly, John, Emeryville, US; Kazzaz, Jina, Emeryville, US; Ugazzoli, Mildred, Emeryville, US; Singh, Manmohan, Emeryville, US; Barackman, John, Emeryville, US

(54) Bezeichnung: MIKROEMULSIONEN MIT ADSORBIERTEN MAKROMOLEKÜLEN UND MIKROPARTIKELN

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

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

Beschreibung**Technisches Gebiet**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Arzneimittel. Im besonderen betrifft die Erfindung Mikropartikel mit adsorbierenden Oberflächen, Verfahren zur Herstellung derartiger Mikropartikel und Verwendungen davon, wie Impfstoffe; ferner betrifft die vorliegende Erfindung Hilfsmittelzusammensetzungen, umfassend Öltröpfchenemulsionen und Verwendungen davon, wie Impfstoffe. Ferner betrifft die Erfindung Zusammensetzungen, umfassend biologisch abbaubare Mikropartikel und/oder Mikroemulsionen, wobei biologisch aktive Mittel, wie therapeutische Polynucleotide, Polypeptide, Antigene und Hilfsmittel, daran adsorbiert sind.

Hintergrund

[0002] Feststoffträger wurden verwendet, um eine regulierte parenterale Abgabe therapeutischer Verbindungen zu erzielen. Derartige Träger sind dafür bestimmt, den Wirkstoff eine längere Zeitdauer in dem Abgabesystem zu halten. Beispiele von Feststoffträgern schließen die von Polymethylmethacrylatpolymeren abgeleiteten sowie Mikropartikel, die von Poly(lactiden) (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 3,773,919), Poly(lactid-co-glykoliden), bekannt als PLG (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 4,767,628), und Polyethylenglykol, bekannt als PEG (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 5,648,095), abgeleitet sind, ein. Polymethylmethacrylatpolymere sind nicht abbaubar, während sich PLG-Partikel durch zufällige nicht-enzymatische Hydrolyse von Esterbindungen zu Milch- und Glykolsäure biologisch abbauen, die entlang normaler Stoffwechselwege ausgeschieden werden.

[0003] Das U.S.-Patent Nr. 5,648,095 beschreibt zum Beispiel die Verwendung von Mikrokügelchen mit verkapselten Arzneistoffen als Systeme zur Arzneistoffabgabe für die nasale, orale, pulmonale und orale Verabreichung. Formulierungen zur langsamen Freisetzung, die verschiedene Polypeptidwachstumsfaktoren enthalten, wurden ebenfalls beschrieben. Siehe z.B. internationale Veröffentlichung Nr. WO 94/12158, U.S.-Patent Nr. 5,134,122 und internationale Veröffentlichung Nr. WO 96/37216.

[0004] WO-A-9 904 761 berichtet über ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung aus Lipidpartikeln, umfassend ein Lipidmittel und ein Protein, wobei das Lipidmittel eine Öl-in-Wasser-Emulsion ist, umfassend etwa 1 bis 50 Gew.-% einer Ölphase und etwa 0.5 bis 10 Gew.-% eines Phospholipidemulgators, was zu Lipidpartikeln mit einer mittleren Partikelgröße von kleiner als etwa 1 µm führt.

[0005] Fattal et al., Journal of Controlled Release 53:137–143 (1998), beschreiben Nanopartikel, die aus Polyalkylcyanoacrylaten (PACA) mit adsorbierten Oligonucleotiden hergestellt wurden.

[0006] Feststoffträger, wie Mikropartikel, wurden auch mit adsorbierten oder eingeschlossenen Antigenen in Versuchen, adäquate Immunantworten auszulösen, verwendet. Derartige Träger stellen Mehrfachkopien eines ausgewählten Antigens bezüglich des Immunsystems dar und fördern den Einschluss und die Retention von Antigenen in lokalen Lymphknoten. Die Partikel können durch Makrophagen phagozytiert werden und können die Antigenpräsentation durch Cytokinfreisetzung steigern. Die gleichzeitig anhängige Anmeldung Nr. 09/015,652 mit gemeinsamem Rechtsinhaber, eingereicht am 29. Januar 1998, beschreibt die Verwendung von Mikropartikeln mit adsorbierten Antigenen und verkapselten Antigenen, um zellvermittelte Immunantworten zu stimulieren, sowie Verfahren zur Herstellung der Mikropartikel.

[0007] In der vorläufigen Patentanmeldung 60/036,316 mit gemeinsamem Rechtsinhaber ist zum Beispiel ein Verfahren zur Erzeugung von Mikropartikeln offenbart, welches das Vereinigen eines Polymers mit einem organischen Lösungsmittel, dann das Hinzufügen eines Emulsionsstabilisators, wie Polyvinylalkohol (PVA), und anschließend das Abdampfen des organischen Lösungsmittels umfasst, wodurch Mikropartikel erzeugt werden. Die Oberfläche der Mikropartikel umfasst das Polymer und den Stabilisator. Makromoleküle, wie DNA, Polypeptide und Antigene, können dann an diesen Oberflächen adsorbiert werden.

[0008] Während PLG-Mikropartikel mit adsorbierten Antigenen wesentliche Vorteile gegenüber anderen toxischen Systemen bieten, kann die Adsorption von biologisch aktiven Mitteln an der Oberfläche der Mikropartikel problematisch sein. Es ist zum Beispiel oft schwierig oder unmöglich, geladene oder sperrige, biologisch aktive Mittel, wie Polynucleotide, große Polypeptide und dergleichen, an der Oberfläche der Mikropartikel zu adsorbieren. Somit besteht ein ständiger Bedarf an flexiblen Abgabesystemen für derartige Mittel und besonders für Arzneistoffe, die hochempfindlich und schwierig zu formulieren sind.

[0009] Hilfsmittel sind Verbindungen, die eine Immunantwort auf Antigene verstärken können. Hilfsmittel kön-

nen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität verstärken. Für bestimmte Pathogene ist es jedoch bevorzugt, die zelluläre Immunität und zwar Th1-Zellen zu stimulieren. Gegenwärtig verwendete Hilfsmittel lösen keine adäquaten Th1-Zellantworten aus und/oder weisen schädliche Nebenwirkungen auf.

[0010] Gegenwärtig sind die einzigen Hilfsmittel, die in den Vereinigten Staaten zur Verwendung bei Menschen genehmigt sind, Aluminiumsalze (alum). Diese Hilfsmittel waren für einige Impfstoffe, einschließlich Hepatitis B, Diphtherie, Kinderlähmung, Tollwut und Grippe, verwendbar, sind jedoch, besonders wenn die Stimulation von zellvermittelter Immunität für den Schutz erforderlich ist, nicht für andere verwendbar. Berichte zeigen zum Beispiel, dass alum bei der Verbesserung der Wirksamkeit von Impfstoffen gegen Keuchhusten und Typhus versagte und nur eine schwache Wirkung bei Impfstoffen gegen Adenoviren bereitstellte. Ferner stieß man auf Probleme, wie die Auslösung von Granulomen an der Injektionsstelle und eine Chargenschwankung von alum-Zubereitungen.

[0011] Komplettes Freund-Adjuvans (CFA) ist ein starkes immunstimulierendes Mittel, das erfolgreich mit vielen Antigenen auf experimenteller Basis verwendet wurde. CFA besteht aus drei Komponenten: einem Mineralöl, einem Emulgator, wie Arlacel A, und abgetöteten Mycobakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis*. Wässrige Antigenlösungen werden mit diesen Komponenten gemischt, um eine Wasser-in-Öl-Emulsion zu erzeugen. CFA verursacht jedoch schwere Nebenwirkungen, einschließlich Schmerzen, Abszessbildung und Fieber, die seine Verwendung in Impfstoffen für entweder Menschen oder Tiere verhindern. Die Nebenwirkungen treten hauptsächlich auf Grund der Reaktionen des Wirts auf die mycobakterielle Komponente von CFA auf. Unvollständiges Freund-Adjuvans (IFA) entspricht CFA ohne die bakterielle Komponente. Obwohl IFA nicht zur Verwendung in den Vereinigten Staaten genehmigt wurde, wurde IFA bei mehreren Arten von Impfstoffen in anderen Ländern verwendet. IFA wurde mit Impfstoffen gegen Grippe und Kinderlähmung erfolgreich bei Menschen und mit mehreren Tierimpfstoffen, einschließlich Tollwut, Hundestaupe und Maul- und Klauenseuche, verwendet. Experimente zeigten jedoch, dass sowohl das Öl als auch der Emulgator, die in IFA verwendet wurden, Tumore in Mäusen verursachen können, was zeigt, dass ein alternatives Hilfsmittel eine bessere Wahl für die Verwendung bei Menschen darstellt.

[0012] Muramylpeptid (MDP) stellt die minimale Einheit des mycobakteriellen Zellwandkomplexes, der die mit CFA beobachtete Hilfsmittelaktivität erzeugt, dar. Ellouz et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1974, 59, 1317. Viele synthetische Analoga von MDP, die einen breiten Bereich von Hilfsmittelwirksamkeit und Nebenwirkungen aufweisen, wurden erzeugt. Chedid et al., Prog. Allergy, 1978, 25, 63. Von drei Analoga von MDP – Threonylderivaten von MDP (Byars et al., Vaccine, 1987, 5, 223); n-Butylderivaten von MDP (Chedid et al., Infect. Immun., 1982, 35, 417); und lipophilen Derivaten von Muramyltripeptid (Gisler et al., Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds, Y. Yamamura und S. Kotani, Hrsg., Excerpta Medica, Amsterdam, S. 167) – wurde gezeigt, dass sie die humorale und zellvermittelte Immunität stimulieren und einen niedrigen Toxizitätsgrad aufweisen. Ein anderes Derivat von MDP, N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanin-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3,3-(hydroxyphosphoryloxy)]ethylamid (MTP-PE), ist lipophil. MTP-PE weist Phospholipiden auf, die eine Verbindung des hydrophoben Teils des Moleküls mit einer Lipidumgebung ermöglichen, während sich der Muramylpeptidteil mit der wässrigen Umgebung verbindet. Somit kann MTP-PE selbst als Emulgator wirken, um stabile Öl-in-Wasser-Emulsionen zu erzeugen.

[0013] Levamisol und Isoprinosin sind andere synthetische Hilfsmittel, welche die Wirtsimmunität verstärken. Levamisol ist das linksdrehende Isomer von Tetramisol und verstärkt die humorale und zelluläre Immunität durch einen T-Zellen-abhängigen Mechanismus. Isoprinosin, ein Inosin enthaltender Komplex, die Purinvorstufe von Adenosin und Guanosin, fördert die Mitogenese von T-Zellen. Tuftsin, ein Peptid aus 4 Aminosäuren (Thr-Lys-Pro-Arg), das zu einer Sequenz in der schweren Kette von Immunglobulin (Ig) homolog ist, stimuliert hauptsächlich Makrophagen.

[0014] Von Mikropartikeln, die aus den biologisch abbaubaren und biokompatiblen Polymeren, bekannt als Poly(lactid-co-glykolide) (PLG), hergestellt wurden, wurde gezeigt, dass sie wirksame Träger für mehrere Antigene sind. Zusätzlich können PLG-Mikropartikel die Geschwindigkeit der Freisetzung von eingeschlossenen Antigenen regulieren und bieten somit die Möglichkeit für einzeldosierte Impfstoffe. Außerdem wurde von der Verabreichung von biologisch abbaubaren Polymeren mit eingeschlossenen Antigenen in einer Reihe von Tiermodellen gezeigt, dass sie starke Immunantworten auslöst. O'Hagan et al., Advanced Drug Deliv. Rev., 1998, 32, 225–246, und Singh et al., Advanced Drug Deliv. Rev., 1998, 34, 285–304.

[0015] Von einer Emulsion, umfassend mikrofluidifiziertes Squalen, Sorbitantrioleat (Span 85TM) und Polysorbit 80 (Tween 80TM), um Mikrotröpfchen mit einheitlicher Größe, d.h. MF59, bereitzustellen, wurde ebenfalls gezeigt, dass sie starke Immunantworten auslöst. Von MF59-Formulierungen wurde gezeigt, dass sie Antikör-

pertiter auslösen, die 5- → 100-mal stärker sind, als die mit Aluminiumsalzhilfsmitteln erhaltenen. Von MF59 wurde gezeigt, dass es die Immunantwort auf Antigene aus zahlreichen Quellen, einschließlich zum Beispiel des Herpessimplex-Virus (HSV), des humanen Immundefizienz-Virus (HIV), des Influenza-Virus, des Hepatitis-C-Virus (HCV), des Zytomegalie-Virus (CMV), des Hepatitis-B-Virus (HBV), des menschlichen Papilloma-Virus (HPV) und Malaria, verstärkt. Ott et al., *Vaccine Design: The Subunit And Adjuvant Approach*, 1995, M. F. Powell und M. J. Newman, Hrsg., Plenum Press, New York, S. 277–296; Singh et al., *Vaccine*, 1998, 16, 1822–1827; Ott et al., *Vaccine*, 1995, 13, 1557–1562; O'Hagan et al., *Mol. Medicine Today*, 1997, Februar, 69–75; und Traquina et al., *J. Infect. Dis.*, 1996, 174, 1168–75. Das MF59-Hilfsmittel verbessert die Immunogenität von Untereinheiten-Antigenen, während die Sicherheit und das Verträglichkeitsprofil des alum-Hilfsmittels aufrechterhalten werden. Van Nest et al., *Vaccines* 92, 1992, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 57–62, und Valensi et al., *J. Immunol.*, 1994, 153, 4029–39. MF59 ist ferner in der gleichzeitig anhängigen U.S.-Anmeldung Seriennr. 08/434,512, eingereicht am 4. Mai 1995, beschrieben, das an den Rechtsinhaber der vorliegenden Erfindung übertragen wurde. In Tierversuchen wurde festgestellt, dass MF59 nicht genschädigend und teratogen ist und auch keine Sensibilisierung verursacht. Der Wirkungsmechanismus von MF59 ist offensichtlich von der Erzeugung einer starken CD4+-T-Zellantwort, d.h. einer Th2-Zellantwort, abhängig. MF59-Hilfsmittel lösen jedoch, wenn überhaupt, geringe Th1-Antworten oder Antworten zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) aus.

[0016] Von Oligonucleotiden, umfassend mit Antigenen gemischte CpG-Strukturleitmotive, wurde gezeigt, dass sie starke Th1-Immunantworten auslösen. Roman et al., *Nat. Med.*, 1997, 3, 849–854; Weiner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 10833–10837; Davis et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 870–876; Chu et al., *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623–1631; Lipford et al., *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340–2344; und Moldoveanu et al., *Vaccine*, 1988, 16, 1216–1224. Nicht-methylierte CpG-Dinucleotide sind in bakterieller DNA relativ häufig, sind jedoch in der DNA von Wirbeltieren unterrepräsentiert und methyliert. Bird, *Trends Genet.*, 1987, 3, 342–347. Von bakterieller DNA oder synthetischen Oligonucleotiden, die nicht-methylierte CpG-Strukturleitmotive enthalten, ist ebenfalls bekannt, dass sie Immunantworten, einschließlich zum Beispiel Proliferation von B-Zellen, Sekretion von Interleukin-6 und Immunglobulin und Apoptosisresistenz, auslösen. Krieg et al., *Nature*, 1995, 374, 546–549; Klinman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 2879–2883; Ballas et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840–1845; Cowdery et al., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570–4575; Halpern et al., *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72–78; Yamamoto et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866–873; Stacey et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116–2122; Messina et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759–1764; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918–4925; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394–5402; Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755–4761; und Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898–5906; PCT-Veröffentlichung WO 96/02555; PCT-Veröffentlichung WO 98/16247; PCT-Veröffentlichung WO 98/18810; PCT-Veröffentlichung WO 98/40100; PCT-Veröffentlichung WO 98/55495; PCT-Veröffentlichung WO 98/37919; und PCT-Veröffentlichung WO 98/52581.

[0017] Fachleuten ist bekannt, dass Monophosphoryllipid A (MPL) eine Th1-Lymphozytenantwort auslöst. Ullrich et al., *Monophosphoryl Lipid A as an Adjuvant in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell und Newman, Hrsg., 1995, Plenum Press, New York, S. 495–523.

[0018] Es wurde auch gezeigt, dass kationische Emulsionen auf Lipidbasis als Genträger verwendet werden können. Siehe z.B. Yi et al., *Cationic Lipid Emulsion: a Novel Non-Viral, and Non-Liposomal Gene Delivery System*, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24:653–654 (1997); Kim et al., *In Vivo Gene Transfer Using Cationic Lipid Emulsion-Mediated Gene Delivery System by Intra Nasal Administration*, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25:344–345 (1998); Kim et al., *In Vitro and In Vivo Gene Delivery Using Cationic Lipid Emulsion*, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 26, #5438 (1999).

[0019] Ein Hilfsmittel, das zur Verstärkung einer Th1-Zellantwort führt, die zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung verwendet werden kann, ist somit noch immer erwünscht. Eine derartige Antwort wäre bei der Behandlung von zum Beispiel Virusinfektionen sowie zur Immunisierung von Individuen, die für Virusinfektionen anfällig sind, nützlich.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Die Erfinder erfanden hier ein Verfahren zur Erzeugung von Mikropartikeln mit adsorbierenden Oberflächen, die viele verschiedene Makromoleküle adsorbieren können. Die Mikropartikel bestehen sowohl aus einem Polymer als auch einem Detergens. Die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung adsorbieren derartige Makromoleküle wirksamer als andere gegenwärtig verfügbare Mikropartikel.

[0021] Die Mikropartikel sind von einem Polymer, wie einer Poly(α-hydroxsäure), einer Polyhydroxybutter-

säure, einem Polycaprolacton, einem Polyorthoester, einem Polyanhydrid, einem PACA, einem Polycyanoacrylat und dergleichen, abgeleitet und werden mit Detergenzien, wie kationischen, anionischen oder nicht-ionischen Detergenzien, erzeugt, wobei die Detergenzien in Kombination verwendet werden können. Ferner fanden die Erfinder, dass diese Mikropartikel, verglichen mit Mikropartikeln, die durch ein Verfahren unter Verwendung von PVA allein erzeugt wurden, eine verbesserte Adsorption viraler Antigene ergeben und bessere Immunantworten bereitstellen. Während unter Verwendung von PVA allein hergestellte Mikropartikel bestimmte Makromoleküle adsorbieren können, adsorbieren die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung unter Verwendung anderer Detergenzien allein, in Kombination oder in Kombination mit PVA viele verschiedene Makromoleküle. Folglich betrifft die Erfindung dann hauptsächlich derartige Mikropartikel sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und Verfahren zur Verwendung der Mikropartikel.

[0022] In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Mikropartikel mit einer adsorbierenden Oberfläche, wobei das Mikropartikel ein Polymer, ausgewählt aus einer Poly(α -hydroxsäure), einer Polyhydroxybuttersäure, einem Polycaprolacton, einem Polyorthoester, einem Polyanhydrid und einem Polycyanoacrylat, umfasst.

[0023] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung derartige Mikropartikel, die ferner ein ausgewähltes Makromolekül, wie einen Arzneistoff, ein Polynucleotid, ein Polypeptid, ein Protein, ein Hormon, ein Enzym, einen Transkriptions- oder Translationsmittler, ein Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einen Immunmodulator, ein Antigen, ein Hilfsmittel oder Kombinationen davon und dergleichen, das an der Oberfläche des Mikropartikels adsorbiert ist, umfassen.

[0024] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Mikropartikelzusammensetzung, umfassend ein ausgewähltes Makromolekül, das an ein erfindungsgemäßes Mikropartikel adsorbiert ist, und einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.

[0025] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Mikropartikels mit einer adsorbierenden Oberfläche, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Vereinigen einer Polymerlösung, umfassend ein Polymer, ausgewählt aus einer Poly(α -hydroxsäure), einer Polyhydroxybuttersäure, einem Polycaprolacton, einem Polyorthoester, einem Polyanhydrid und einem Polycyanoacrylat, wobei das Polymer in einer Konzentration von etwa 1 % bis etwa 30 % in einem organischen Lösungsmittel vorliegt; und eines anionischen, kationischen oder nicht-ionischen Detergents mit der Polymerlösung, wobei das Detergent in einem Verhältnis von 0,001 bis 10 (Gew./Gew.) Detergent zu Polymer vorliegt, um ein Polymer/Detergent-Gemisch zu erzeugen;
- (b) Dispergieren des Polymer/Detergent-Gemisches;
- (c) Entfernen des organischen Lösungsmittels; und
- (d) Gewinnen des Mikropartikels.

[0026] Das Polymer/Detergent-Gemisch wird bevorzugt emulgiert, um vor dem Entfernen des organischen Lösungsmittels eine Emulsion zu erzeugen.

[0027] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Mikropartikel, das durch die vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.

[0028] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Mikropartikels mit einem adsorbierten Makromolekül, umfassend:

- (a) Vereinigen einer Polymerlösung, umfassend Poly(D,L-lactid-co-glykolid), wobei das Polymer in einer Konzentration von etwa 3 % bis etwa 10 % in einem organischen Lösungsmittel vorliegt; und eines anionischen, kationischen oder nicht-ionischen Detergents, wobei das Detergent in einem Verhältnis von 0,001 bis 10 (Gew./Gew.) Detergent zu Polymer vorliegt, um ein Polymer/Detergent-Gemisch zu erzeugen;
- (b) Dispergieren des Polymer/Detergent-Gemisches;
- (c) Entfernen des organischen Lösungsmittels aus der Emulsion;
- (d) Gewinnen des Mikropartikels; und
- (e) Adsorbieren eines Makromoleküls an der Oberfläche des Mikropartikels, wobei das Makromolekül ausgewählt ist aus einem Arzneistoff, einem Polynucleotid, einem Polypeptid, einem Hormon, einem Enzym, einem Transkriptions- oder Translationsmittler, einem Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einem Immunmodulator, einem Antigen, einem Hilfsmittel und Kombinationen davon. Das Polymer/Detergent-Gemisch wird bevorzugt emulgiert, um vor dem Entfernen des organischen Lösungsmittels eine Emulsion zu erzeugen. In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Mikropartikel mit einem adsorbierten

Makromolekül, das durch das vorstehend beschriebene Verfahren hergestellt wurde.

[0029] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer adsorbierenden Mikropartikelzusammensetzung, umfassend das Vereinigen eines adsorbierenden Mikropartikels, das ein an seiner Oberfläche adsorbiertes Makromolekül aufweist, und eines pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.

[0030] Die Zusammensetzung der Erfindung kann in einem Verfahren zur Abgabe eines Makromoleküls an ein Wirbeltier verwendet werden.

[0031] Die Zusammensetzung der Erfindung kann in einem Verfahren zur Auslösung einer zellulären Immunantwort in einem Wirbeltier verwendet werden.

[0032] Die Zusammensetzung der Erfindung kann auch in einem Immunisierungsverfahren verwendet werden. Die Zusammensetzung kann gegebenenfalls nicht-gebundene Makromoleküle enthalten und kann auch gegebenenfalls Hilfsmittel, einschließlich Aluminiumsalze, wie Aluminiumphosphat, enthalten.

[0033] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Mikropartikel aus einer Poly(α -hydroxysäure); stärker bevorzugt einem Poly(D,L-lactid-co-glykolid); und am meisten bevorzugt einem Poly(D,L-lactid-co-glykolid) erzeugt.

[0034] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine Mikropartikelzubereitung Submikronemulsionen mit ionischen oberflächenaktiven Mitteln. MF59 oder andere können als Basispartikel verwendet werden, während ionische oberflächenaktive Mittel Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP), Dioleoyl-sn-Glycero-3-Ethylphosphocholin (DEPC) und Dioleoylphosphatidsäure (DPA), die jeweils in Squalen löslich sind, einschließen können, jedoch nicht darauf beschränkt sind.

[0035] Jedes der vorher nicht erschöpfend beschriebenen adsorbierenden Mikropartikel kann gegebenenfalls auch in ihm eingeschlossene Makromoleküle aufweisen.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Mikroemulsionen, die eine Öltröpfchenemulsion, die mit einem ionischen Detergens formuliert wurde, umfassen. Derartige Zusammensetzungen adsorbieren leicht Makromoleküle, wie DNA, Proteine und andere antigene Moleküle. Hilfsmittelzusammensetzungen können ein Oligonukleotid, umfassend mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv, umfassen. Die Hilfsmittelzusammensetzung kann auch eine optionale Komponente umfassen, die zu einer positiv geladenen Emulsion führt. Die Öltröpfchenemulsion umfasst bevorzugt ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator, die bevorzugt in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, die im Wesentlichen alle einen Durchmesser von kleiner als 1 μ m aufweisen, vorliegen. Die Zusammensetzung existiert bevorzugt in Abwesenheit eines beliebigen Polyoxypropilen-Polyoxyethylen-Blockcopolymers. Das Öl ist bevorzugt ein tierisches Öl, ein ungesättigter Kohlenwasserstoff, ein Terpenoid, wie zum Beispiel Squalen, oder ein pflanzliches Öl. Die Zusammensetzung umfasst bevorzugt 0,5 bis 20 Vol.-% des Öls in einem wässrigen Medium. Der Emulgator umfasst bevorzugt ein nichtionisches Detergens, wie einen Polyoxyethylensorbitanmono-, -di- oder -triester oder einen Sorbitanmono-, -di- oder -triether. Die Zusammensetzung umfasst bevorzugt etwa 0,01 bis etwa 0,5 Gew.-% des Emulgators. Das Oligonukleotid umfasst bevorzugt mindestens eine Phosphorothioatbindung oder Peptidnucleinsäurebindung. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Oligonukleotid eine Nucleotidsequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nrn.: 1-28. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Oligonukleotid ein CpG-Strukturleitmotiv, das von zwei Purinen unmittelbar 5' an diesem Motiv und zwei Pyrimidinen unmittelbar 3' an diesem Motiv flankiert ist. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Oligonukleotid eine Nucleotidsequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nrn: 19-28. Am meisten bevorzugt ist SEQ ID Nr.: 28. In einigen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Hilfsmittelzusammensetzung ferner ein einzelnes immunstimulierendes Mittel, das bevorzugt ausgewählt ist aus alum, einer Bakterienzellwandkomponente und Muramylpeptid. Die Hilfsmittelzusammensetzung kann in Form eines Mikropartikels vorliegen.

[0037] Die vorliegende Erfindung betrifft auch immunogene Zusammensetzungen, umfassend eine immunstimulierende Menge einer antigenen Substanz und eine immunstimulierende Menge einer hier beschriebenen Hilfsmittelzusammensetzung. Die antigenen Substanz wird bevorzugt aus einem Protein, Protein-Polysaccharid, Protein-Lipopolysaccharid, Polysaccharid, und Lipopolysaccharid ausgewählt. In einigen Ausführungsformen der Erfindung umfasst die immunogene Zusammensetzung ein CpG-Oligonukleotid in Kombination mit einer antigenen Substanz, die an Poly(lactid-co-glykolid)-Mikropartikeln adsorbiert sind. Die adsorbierte anti-

gene Substanz ist bevorzugt ein rekombinantes Protein. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung stammt die antigene Substanz aus einem Virus, wie zum Beispiel dem Hepatitis-C-Virus (HCV), dem Hepatitis-B-Virus (HBV), dem Herpes-simplex-Virus (HSV), dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Zytomegalie-Virus (CMV), dem Influenza-Virus (Grippe) und dem Tollwut-Virus. Die antigene Substanz wird bevorzugt aus HSV-Glykoprotein gD, HIV-Glykoprotein gp120 und HIV p55 gag ausgewählt. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung stammt die antigene Substanz aus einem Bakterium, wie zum Beispiel Cholera, Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori und Haemophilus influenza. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung stammt die antigene Substanz aus einem Parasiten, wie zum Beispiel einem Malaria-parasiten.

[0038] Die Zusammensetzung der Erfindung kann in Verfahren zur Stimulierung einer Immunantwort in einem Wirtstier verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch.

[0039] Die Zusammensetzung der Erfindung kann auch in Verfahren zur Immunisierung eines Wirtstiers gegen eine virale, bakterielle oder parasitäre Infektion verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch.

[0040] Die Zusammensetzung der Erfindung kann auch in Verfahren zur Verstärkung einer Th1-Immunantwort in einem Wirtstier verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch.

[0041] Diese und andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung fallen Fachleuten angesichts der Offenbarung hier ohne weiteres ein.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0042] [Fig. 1](#) ist ein Säulendiagramm, das die typischen Ergebnisse von Immunoglobulinisotypen zeigt, die durch bevorzugte immunogene Zusammensetzungen, umfassend PLG-Mikropartikel gemäß der Erfindung, erzeugt wurden.

[0043] [Fig. 2](#) ist ein Säulendiagramm, das die typischen Ergebnisse von Immunoglobulinisotypen zeigt, die durch bevorzugte immunogene Zusammensetzungen, umfassend ein MF59-Hilfsmittel gemäß der Erfindung, erzeugt wurden.

[0044] [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, das repräsentative Ergebnisse von anti-p55-IgG-Titer im Serum nach der Immunisierung mit einem bevorzugten Emulsionshilfsmittel zeigt.

[0045] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, das repräsentative Ergebnisse der Lyse von Zielzellen durch CTL nach der Immunisierung mit einem bevorzugten Emulsionshilfsmittel zeigt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0046] Die vorliegende Erfindung basiert auf den überraschenden Erkenntnissen, dass Mikropartikel mit adsorbierten Makromolekülen verbesserte Immunantworten auslösen, und dass ein Hilfsmittel, das eine Kombination aus einem CpG-Oligonucleotid und einem metabolisierbaren Öl oder einem biologisch abbaubaren Polymer enthält, Immunantworten verstärkt. Ferner ist die Kombination aus Mikropartikeln mit adsorbierten Makromolekülen und Ölemulsionshilfsmitteln zur Auslösung von starken Immunantworten verwendbar.

[0047] Die Durchführung der Erfindung verwendet, wenn es nicht anders angegeben ist, übliche Verfahren der Chemie, Polymerchemie, Biochemie, Molekularbiologie, Immunologie und Pharmakologie innerhalb des Fachwissens. Derartige Verfahren sind in der Literatur vollständig erklärt. Siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Auflage (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick und N. Kaplan, Hrsg., Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology, Bd. I-IV (D. M. Weir und C. C. Blackwell, Hrsg, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Auflage, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S., Hrsg., CRC Press, 1997) und Seymour/Carraher's Polymer Chemistry (4. Auflage, Marcel Dekker Inc., 1996).

[0048] Wie in dieser Beschreibung und den angefügten Ansprüchen verwendet, schließen die Singularformen "ein, eine, eines" und "der, die das" Bezugnahmen auf den Plural ein, wenn es der Inhalt nicht deutlich anders vorgibt. Somit bezieht sich zum Beispiel der Begriff "Mikropartikel" auf ein oder mehrere Mikropartikel und der-

gleichen.

A. Definitionen

[0049] Bei der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe verwendet und sollen, wie nachstehend angegeben, definiert sein.

[0050] Der hier verwendete Begriff "Mikropartikel" bezieht sich auf ein Partikel mit einem Durchmesser von etwa 10 nm bis etwa 150 μm , stärker bevorzugt mit einem Durchmesser von etwa 200 nm bis etwa 30 μm und am meisten bevorzugt mit einem Durchmesser von etwa 500 nm bis etwa 10 μm . Das Mikropartikel weist bevorzugt einen Durchmesser auf, der eine parenterale oder mukosale Verabreichung ermöglicht, ohne Nadeln und Kapillaren zu verstopfen. Die Größe der Mikropartikel wird durch in dem Fachgebiet allgemein bekannte Verfahren, wie Photonenkorrelationsspektroskopie, Laserdiffraktometrie und/oder Rasterelektronenmikroskopie, leicht bestimmt. Der Begriff "Partikel" kann auch verwendet werden, um ein hier definiertes Mikropartikel zu bezeichnen.

[0051] Mikropartikel für die Verwendung hier werden aus Materialien erzeugt, die sterilisierbar, nicht-toxisch und biologisch abbaubar sind. Derartige Materialien schließen ohne Einschränkung Poly(α -hydroxysäure), Polyhydroxybuttersäure, Polycaprolacton, Polyorthoester, Polyanhydrid, PACA und Polycyanoacrylat ein. Die Mikropartikel zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung sind bevorzugt von einer Poly(α -hydroxysäure), im besonderen von einem Poly(lactid) ("PLA") oder einem Copolymer aus D,L-Lactid und Glykolid oder Glykolsäure, wie einem Poly(D,L-lactid-co-glykolid) ("PLG" oder "PLGA"), oder einem Copolymer aus D,L-Lactid und Caprolacton, abgeleitet. Die Mikropartikel können von einem beliebigen verschiedener polymerer Ausgangsmaterialien abgeleitet sein, die verschiedene Molekulargewichte und im Fall von Copolymeren, wie PLG, verschiedene Verhältnisse von Lactid:Glykolid aufweisen, deren Auswahl größtenteils beliebig ist und teilweise von dem gemeinsam verabreichten Makromolekül abhängt. Diese Parameter werden nachstehend ausführlicher diskutiert.

[0052] Der hier verwendete Begriff "Detergens" schließt oberflächenaktive Mittel und Emulsionsstabilisatoren ein. Anionische Detergenzien schließen SDS, SLS, DSS (Disulfosuccinat), sulfatierte Fettalkohole und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Kationische Detergenzien schließen Cetrimid (CTAB), Benzalkoniumchlorid, DDA (Dimethyldioctadecylammoniumbromid), DOTAP und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Nicht-ionische Detergenzien schließen Sorbitanester, Polysorbate, polyoxyethylierte Glykolmonoether, polyoxyethylierte Alkylphenole, Poloxamere und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0053] Der hier verwendete Begriff "positive Nettoladung", bedeutet, dass die Ladung auf der Oberfläche des Mikropartikels positiver als die Ladung auf der Oberfläche eines entsprechenden Mikropartikels, das unter Verwendung von PVA hergestellt wurde, ist. Desgleichen bedeutet der hier verwendete Begriff "negative Nettoladung", dass die Ladung auf der Oberfläche des Mikropartikels negativer als die Ladung auf der Oberfläche eines entsprechenden Mikropartikels, das unter Verwendung von PVA hergestellt wurde, ist. Die Nettoladung kann durch den Vergleich des Zeta-Potentials (auch als elektrokinetisches Potential bekannt) des Mikropartikels, das unter Verwendung eines kationischen oder anionischen Detergens hergestellt wurde, mit einem entsprechenden Mikropartikel, das unter Verwendung von PVA hergestellt wurde, beurteilt werden. Somit weist eine Mikropartikeloberfläche mit einer "positiven Nettoladung" ein größeres Zeta-Potential als das Zeta-Potential der Oberfläche eines Mikropartikels auf, das unter Verwendung von PVA hergestellt wurde, und ein Mikropartikel mit einer "negativen Nettoladung" weist ein kleineres Zeta-Potential als das Zeta-Potential der Oberfläche eines Mikropartikels auf, das unter Verwendung von PVA hergestellt wurde. Wie offensichtlich ist, werden die Nettoladungen der Mikropartikel der Erfindung bezogen auf das Zeta-Potential eines entsprechenden PVA-Mikropartikels berechnet.

[0054] Der hier verwendete Begriff "Zeta-Potential" bezieht sich auf das elektrische Potential, das über die Grenzfläche aller Feststoffe und Flüssigkeiten hinweg existiert, d.h. das Potential über die diffuse Schicht von Ionen hinweg, die ein geladenes kolloidales Partikel umgibt. Das Zeta-Potential kann aus den elektrophoretischen Beweglichkeiten, d.h. den Geschwindigkeiten, mit denen sich kolloidale Partikel zwischen geladenen Elektroden bewegen, die mit der zu messenden Substanz in Kontakt gebracht wurden, unter Anwendung von in dem Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren berechnet werden.

[0055] Der hier verwendete Begriff "Makromolekül" bezieht sich ohne Einschränkung auf einen Arzneistoff, ein Polynukleotid, ein Polypeptid, ein Hormon, ein Enzym, einen Transkriptions- oder Translationsmittler, ein

Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einen Immunmodulator, ein Antigen, ein Hilfsmittel oder Kombinationen davon. Besondere Makromoleküle für die Verwendung mit der vorliegenden Erfindung sind nachstehend detaillierter beschrieben.

[0056] Der Begriff "Arzneistoff" bezieht sich auf biologisch aktive Verbindungen, wie Antibiotika, antivirale Mittel, Wachstumsfaktoren, Hormone und dergleichen, die nachstehend detaillierter diskutiert werden.

[0057] Ein "Polynucleotid" ist ein Nucleinsäuremolekül, das ein biologisch aktives (z.B. immunogenes oder therapeutisches) Protein oder Polypeptid kodiert. Abhängig von der Art des durch das Polynucleotid kodierten Polypeptids kann ein Polynucleotid nur 10 Nucleotide einschließen, z.B. wenn das Polynucleotid ein Antigen kodiert. Ferner kann ein "Polynucleotid" sowohl doppel- als auch einzelsträngige Sequenzen einschließen und bezieht sich auf cDNA aus viraler, prokaryoter oder eukaryoter mRNA, genomischer RNA und DNA-Sequenzen aus viraler (z.B. RNA- und DNA-Viren und -Retroviren) oder prokaryoter DNA und besonders Sequenzen aus synthetischer DNA, ist jedoch nicht darauf beschränkt. Der Begriff beinhaltet auch Sequenzen, die beliebige der bekannten Basenanaloga von DNA und RNA einschließen, und schließt Modifikationen, wie Deletionen, Additionen und Substitutionen (im Allgemeinen konservativer Art), an der nativen Sequenz ein, vorausgesetzt, dass das Nucleinsäuremolekül ein therapeutisches oder antigenes Protein kodiert. Diese Modifikationen können vorsätzlich sein, wie durch eine ortsgerichtete Mutagenese, oder können zufällig sein, wie durch Mutationen von Wirten, welche die Antigene erzeugen.

[0058] Die Begriffe "Polypeptid" und "Protein" beziehen sich auf ein Polymer aus Aminosäureresten und sind nicht auf eine Mindestlänge des Produkts beschränkt. Somit sind Peptide, Oligopeptide, Dimere, Multimere und dergleichen in der Definition eingeschlossen. Sowohl Proteine in voller Länge als auch Fragmente davon werden von der Definition umfasst. Die Begriffe schließen auch Modifikationen, wie Deletionen, Additionen und Substitutionen (im Allgemeinen konservativer Art), an der nativen Sequenz ein, vorausgesetzt, dass das Protein die Fähigkeit, eine Immunantwort auszulösen, beibehält oder eine therapeutische Wirkung auf einen Patienten, dem das Protein verabreicht wird, ausübt.

[0059] "Antigen" bedeutet ein Molekül, das ein oder mehrere Epitope enthält, die das Immunsystem eines Wirts stimulieren können, um, wenn das Antigen gemäß der vorliegenden Erfindung dargereicht wird, eine zelluläre, antigenspezifische Immunantwort oder eine humorale Antikörperantwort zu erzeugen. Ein Antigen kann allein oder wenn es in Kombination mit einem anderen Molekül vorliegt, eine zelluläre oder humorale Antwort auslösen. Normalerweise schließt ein Epitop etwa 3–15 und im Allgemeinen etwa 5–15 Aminosäuren ein. Epitope eines bestimmten Proteins können unter Anwendung einer beliebigen Anzahl von Epitopkartierungsverfahren, die in dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, identifiziert werden. Siehe z.B. Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Bd. 66 (Glenn E. Morris, Hrsg., 1996), Humana Press, Totowa, New Jersey. Zum Beispiel können lineare Epitope durch z.B. gleichzeitige Synthese einer großen Anzahl von Peptiden auf Feststoffträgern, wobei die Peptide Teilen des Proteinmoleküls entsprechen, und Umsetzung der Peptide mit Antikörpern, während die Peptide noch an die Träger gebunden sind, bestimmt werden. Derartige Verfahren sind in dem Fachgebiet bekannt und z.B. in dem U.S.-Patent Nr. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998–4002; und Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709–715, beschrieben. Entsprechend werden Konformationsepitope durch die Bestimmung der räumlichen Konformation von Aminosäuren, wie z.B. durch Röntgenkristallographie und 2-dimensionale kernmagnetische Resonanz, leicht identifiziert. Siehe z.B. Epitope Mapping Protocols, supra.

[0060] Der hier verwendete Begriff "Antigen" bezeichnet sowohl Untereinheiten-Antigene, d.h. Antigene, die getrennt und diskret von einem Gesamtorganismus sind, mit dem das Antigen naturgemäß verbunden ist, sowie abgetötete, abgeschwächte oder inaktivierte Bakterien, Viren, Parasiten oder andere Mikroben. Antikörper, wie anti-idiotypische Antikörper oder Fragmente davon, und synthetische Peptidmimotope, die ein Antigen oder eine antigenen Determinante nachahmen können, werden ebenfalls von der hier verwendeten Definition eines Antigens erfasst. Entsprechend ist auch ein Oligonucleotid oder Polynucleotid, das ein therapeutisches oder immunogenes Protein oder eine antigenen Determinante in vivo exprimiert, wie bei der Gentherapie und Anwendungen der Immunisierung mit Nucleinsäure, in der Definition eines Antigens hier eingeschlossen.

[0061] Ferner können für die Zwecke der vorliegenden Erfindung Antigene von einem beliebigen von mehreren bekannten Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen sowie von einem beliebigen der verschiedenen Tumortypen abgeleitet sein. Ferner bezieht sich für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ein "Antigen" auf ein Protein, das Modifikationen, wie Deletionen, Additionen und Substitutionen (im Allgemeinen konservativer Art), an der nativen Sequenz einschließt, vorausgesetzt, dass das Protein die Fähigkeit, eine Immunantwort auszulösen, beibehält. Diese Modifikationen können vorsätzlich sein, wie durch eine ortsgerichtete Mutagenese,

oder können zufällig sein, wie durch Mutationen von Wirten, welche die Antigene erzeugen.

[0062] Eine "Immunantwort" auf ein Antigen oder eine Zusammensetzung besteht in der Entwicklung einer humoralen und/oder einer zellulären Immunantwort in einem Patienten auf Moleküle, die in der Zusammensetzung von Interesse vorliegen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bezieht sich eine "humorale Immunantwort", auf eine Immunantwort, die durch Antikörpermoleküle vermittelt wird, während eine "zelluläre Immunantwort" eine durch T-Lymphozyten und/oder andere weiße Blutkörperchen vermittelte ist. Ein wichtiger Aspekt der zellulären Immunität umfasst eine antigenspezifische Antwort durch zytolytische T-Zellen ("CTL's"). CTLs weisen eine Spezifität für Peptidantigene auf, die in Verbindung mit Proteinen präsentiert werden, die durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) kodiert und auf den Oberflächen von Zellen exprimiert werden. CTLs unterstützen die Auslösung und Förderung der intrazellulären Zerstörung intrazellulärer Mikroben oder die Lyse von Zellen, die mit derartigen Mikroben infiziert sind. Ein anderer Aspekt der zellulären Immunität umfasst eine antigenspezifische Antwort durch T-Helferzellen. T-Helferzellen unterstützen die Stimulierung der Funktion und richten sich auf die Aktivität von nicht-spezifischen Effektorzellen gegen Zellen, die Peptidantigene in Verbindung mit MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche zeigen. Eine "zelluläre Immunantwort" bezieht sich auch auf die Erzeugung von Cytokinen, Chemokinen und anderen derartigen Molekülen, die durch aktivierte T-Zellen und/oder andere weiße Blutkörperchen, einschließlich der von CD4+- und CD8+-T-Zellen abgeleiteten, erzeugt werden.

[0063] Eine Zusammensetzung, wie eine immunogene Zusammensetzung, oder ein Impfstoff, der eine zelluläre Immunantwort auslöst, kann dazu dienen, ein Wirbeltier durch die Präsentation eines Antigens in Verbindung mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche zu sensibilisieren. Die zellvermittelte Immunantwort wird auf oder in die Nähe von Zellen, die ein Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren, gerichtet. Zusätzlich können antigenspezifische T-Lymphozyten erzeugt werden, um den zukünftigen Schutz eines immunisierten Wirts zu ermöglichen.

[0064] Die Fähigkeit eines speziellen Antigens oder einer Zusammensetzung, eine zellvermittelte Immunantwort zu stimulieren, kann durch mehrere Tests, wie durch Tests der Lymphoproliferation (Lymphozytenaktivierung), Tests zytotoxischer CTL-Zellen oder durch Untersuchung von für das Antigen spezifischen T-Lymphozyten, in einem sensibilisierten Patienten bestimmt werden. Derartige Tests sind in dem Fachgebiet allgemein bekannt. Siehe z.B. Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189–4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369–2376; und die nachstehenden Beispiele.

[0065] Somit kann eine wie hier verwendete Immunantwort eine sein, welche die Erzeugung von CTLs, und/oder die Erzeugung oder Aktivierung von T-Helferzellen stimuliert. Das Antigen von Interesse kann ebenfalls eine durch Antikörper vermittelte Immunantwort auslösen. Daher kann eine Immunantwort eine oder mehrere der folgenden Wirkungen einschließen: die Erzeugung von Antikörpern durch B-Zellen; und/oder die Aktivierung von T-Suppressor-Zellen und/oder $\gamma\delta$ -T-Zellen, die spezifisch gegen ein Antigen oder Antigene, die in der Zusammensetzung vorliegen, oder Impfstoffe von Interesse gerichtet sind. Diese Antworten können dazu dienen, die Infektiosität zu neutralisieren und/oder das Antikörperkomplement oder die Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität (ADCC) zu vermitteln, um für einen immunisierten Wirt einen Schutz bereitzustellen. Derartige Antworten können unter Verwendung von Standardimmunoassays und Neutralisationsassays, die in dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, bestimmt werden.

[0066] Eine Zusammensetzung, die ein ausgewähltes Antigen, das an ein Mikropartikel adsorbiert ist, enthält, zeigt eine "verstärkte Immunogenität", wenn sie eine größere Fähigkeit zur Auslösung einer Immunantwort besitzt, als die Immunantwort, die durch eine äquivalente Menge des Antigens ausgelöst wird, wenn es ohne Verbindung mit dem Mikropartikel abgegeben wird. Somit kann eine Zusammensetzung eine "verstärkte Immunogenität" zeigen, weil das Antigen auf Grund der Adsorption an das Mikropartikel stärker immunogen ist oder weil eine niedrigere Dosis des Antigens notwendig ist, um eine Immunantwort in dem Patienten, dem sie verabreicht wird, zu erzielen. Eine derartige verstärkte Immunogenität kann durch die Verabreichung der Mikropartikel/Antigen-Zusammensetzung und Antigenkontrollen an Tiere und den Vergleich von Antikörpertitern mit den zwei verwendeten Standardassays, wie dem Radioimmunoassay und ELISA, die in dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, bestimmt werden.

[0067] Die Begriffe "wirksame Menge" oder "pharmazeutisch wirksame Menge" eines hier bereitgestellten Makromoleküls/Mikropartikels beziehen sich auf eine nicht-toxische aber ausreichende Menge des Makromoleküls/Mikropartikels, um die gewünschte Antwort, wie eine Immunantwort, und die entsprechende therapeutische Wirkung bereitzustellen, oder im Fall der Abgabe eines therapeutischen Proteins auf eine Menge, die zur Durchführung der Behandlung des Patienten, wie nachstehend definiert, ausreicht. Wie nachstehend gezeigt,

variiert die genaue erforderliche Menge, abhängig von der Art, dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten, der Schwere der zu behandelnden Krankheit und dem speziellen Makromolekül von Interesse, der Verabreichungsart und dergleichen, von Patient zu Patient. Eine geeignete "wirksame" Menge in jedem einzelnen Fall kann von einem Durchschnittsfachmann unter Verwendung von routinemäßigem Experimentieren bestimmt werden.

[0068] "Wirbeltier" bedeutet einen beliebigen Vertreter des Subphylum cordata, einschließlich ohne Einschränkung Säuger, wie Rinder, Schafe, Schweine, Ziegen, Pferde und Menschen; Haustiere, wie Hunde und Katzen; und Vögel, einschließlich Haus-, Wild- und Jagdvögel, wie Hähne und Hennen, einschließlich Küken, Truthähne und andere hühnerartige Vögel. Der Begriff bezeichnet kein besonderes Alter. Somit ist es beabsichtigt, dass sowohl erwachsene als auch neugeborene Tiere eingeschlossen sind.

[0069] "Pharmazeutisch verträglich" oder "pharmakologisch verträglich" bedeutet ein Material, das nicht biologisch oder anderweitig unerwünscht ist, d.h. das Material kann einem Individuum zusammen mit der Mikropartikelformulierung verabreicht werden, ohne irgendwelche unerwünschten biologischen Wirkungen hervorzurufen oder auf eine gesundheitsschädliche Art und Weise mit einer beliebigen der Komponenten der Zusammensetzung, in der es enthalten ist, wechselzuwirken.

[0070] "Physiologischer pH-Wert" oder ein "pH-Wert im physiologischen Bereich" bedeutet einen pH-Wert im Bereich von ungefähr 7,2 bis 8,0 einschließlich und besonders typischerweise im Bereich von ungefähr 7,2 bis 7,6 einschließlich.

[0071] Wie hier verwendet, bezieht sich "Behandlung" auf (i) die Vorbeugung einer Infektion oder Reinfektion, wie bei einem traditionellen Impfstoff, (ii) die Verringerung oder Beseitigung von Symptomen und (iii) die weitgehende oder vollständige Beseitigung des Krankheitserregers oder der in Frage kommenden Erkrankung. Die Behandlung kann prophylaktisch (vor der Infektion) oder therapeutisch (nach der Infektion) durchgeführt werden.

[0072] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Nucleinsäure" auf DNA, RNA oder daraus gebildete Heterozygoten.

[0073] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Oligonucleotid, umfassend mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv" auf ein Polynucleotid, umfassend mindestens ein CpG-Dinucleotid. Oligonucleotide, umfassend mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv, können verschiedenartige CpG-Strukturleitmotive umfassen. Diese Oligonucleotide sind in dem Fachgebiet auch als "CpG-Oligonucleotide" bekannt. Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "CpG-Strukturleitmotiv" auf einen Dinucleotidteil eines Oligonucleotids, der ein Cytosinnucleotid, gefolgt von einem Guanosinnucleotid umfasst. 5-Methylcytosin kann auch anstelle von Cytosin verwendet werden.

[0074] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Öltröpfchenemulsion" auf eine Emulsion, umfassend ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator.

[0075] Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Zusammensetzungen und Verfahren bereitgestellt, die prophylaktisch und/oder therapeutisch ein Wirtstier gegen Virus-, Pilz-, Mycoplasma-, bakterielle oder Protozoeninfektionen sowie gegen Tumore immunisieren oder behandeln. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung sind verwendbar, um einem Säuger, bevorzugt einem Menschen, eine prophylaktische und/oder therapeutische Immunität zu verleihen. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können für die biomedizinische Forschung auch an anderen Säugern als Menschen durchgeführt werden.

B. Allgemeine Verfahren

1. Mikropartikel mit adsorbierten Makromolekülen

[0076] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass die PLA und PLG-Mikropartikel der vorliegenden Erfindung wirksam biologisch aktive Makromoleküle adsorbieren. Ferner adsorbieren diese Makromoleküle eine größere Vielzahl von Molekülen, einschließlich geladener und/oder voluminöser Makromoleküle, leichter als mit PVA hergestellte Mikropartikel. Somit kann das Makromolekül/Mikropartikel der vorliegenden Erfindung als Abgabesystem verwendet werden, um die biologisch aktiven Komponenten zur Behandlung, Vorbeugung und/oder Diagnose vieler verschiedener Krankheiten abzugeben.

[0077] Die vorliegende Erfindung kann verwendet werden, um viele verschiedene Makromoleküle abzugeben, die Arzneimittel, wie Antibiotika und antivirale Mittel, nicht-steroidale, entzündungshemmende Arzneistoffe, Analgetika, Vasodilatatoren, kardiovaskuläre Arzneistoffe, Psychopharmaka, Neuroleptika, Antidepressiva, Arzneistoffe gegen Parkinson-Krankheit, β -Blocker, Calciumblocker, Bradykinininhibitoren, ACE-Inhibitoren, Vasodilatatoren, Prolactininhibitoren, Steroide, Hormonantagonisten, Antihistaminika, Serotoninantagonisten, Heparin, Chemotherapeutika, Antineoplastika und Wachstumsfaktoren, die PDGF, EGF, KGF, IGF-1 und IGF-2 einschließen, jedoch nicht darauf beschränkt sind, FGF, Polynukleotide, die therapeutische oder immunogene Proteine kodieren, immunogene Proteine und Epitope davon zur Verwendung in Impfstoffen, Hormone, einschließlich Peptidhormone, wie Insulin, Proinsulin, Wachstumshormon, GHRH, LHRH, EGF, Somatostatin, SNX-111, BNP, Insulinotropin, ANP, FSH, LH, PSH und hCG, gonadale Steroidhormone (Androgene, Östrogene und Progesteron), Thyrotropin, Inhibin, Cholezystokinin, ACH, CRF, Dynorphine, Endorphine, Endothelin, Fibronectinfragmente, Galanin, Gastrin, Insulinotropin, Glucagon, GTP-bindende Proteinfragmente, Guanylin, die Leukokinine, Magainin, Mastoparans, Dermaseptin, Systemin, Neuromedine, Neurotensin, Pankreastatin, pankreatisches Polypeptid, Substanz P, Sekretin, Thymosin und dergleichen, Enzyme, Transkriptions- oder Translationsmittler, Zwischenprodukte in Stoffwechselwegen, Immunmodulatoren, wie beliebige der verschiedenen Cytokine, einschließlich Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-3, Interleukin-4 und γ -Interferon, Antigene und Hilfsmittel einschließen, jedoch nicht darauf beschränkt sind.

[0078] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Makromolekül ein Antigen. Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit der Mikropartikel mit dem adsorbierten Antigen, zellvermittelte Immunantworten in einem Wirbeltier zu erzeugen. Die Fähigkeit des Antigens/der Mikropartikel der vorliegenden Erfindung, eine zellvermittelte Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen auszulösen, stellt ein starkes Hilfsmittel gegen eine Infektion durch viele verschiedene Krankheitserreger bereit. Folglich können das Antigen die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung in Impfstoffzusammensetzungen eingebracht werden.

[0079] Somit kann das hier beschriebene System zusätzlich zu einer üblichen Antikörperantwort z.B. die Verbindung des exprimierten Antigens mit MHC-Molekülen der Klasse I bereitstellen, so dass eine zelluläre Immunantwort in vivo bezüglich des Antigens von Interesse aufgebaut werden kann, welche die Erzeugung von CTLs stimuliert, um eine zukünftige Erkennung des Antigens zu ermöglichen. Ferner können die Verfahren eine antigenspezifische Antwort durch T-Helferzellen auslösen. Folglich finden die Verfahren der vorliegenden Erfindung Verwendung mit einem beliebigen Makromolekül, für das zelluläre und/oder humorale Immunantworten gewünscht sind, bevorzugt Antigenen, die von viralen Krankheitserregern, die Antikörper, T-Helferzellen-Epitope und zytotoxische T-Zellen-Epitope auslösen können, abgeleitet sind. Derartige Antigene schließen die von menschlichen und tierischen Viren kodierten ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt, und können entweder strukturellen oder nicht-strukturellen Proteinen entsprechen.

[0080] Die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung sind besonders zur Immunisierung gegen intrazelluläre Viren, die normalerweise schwache Immunantworten auslösen, verwendbar. Die vorliegende Erfindung findet zum Beispiel Verwendung zur Stimulierung einer Immunantwort gegen viele verschiedene Proteine aus der Familie der Herpesviren, einschließlich Proteine, die vom Herpes-simplex-Virus (HSV) Typ 1 und 2, wie den Glycoproteinen gB, gD und gH von HSV-1 und HSV-2, abgeleitet sind; Antigene, die vom Varicella-Zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalievirus (CMV), einschließlich gB und gH von CMV, abgeleitet sind; und Antigene, die von anderen menschlichen Herpesviren, wie HHV6 und HHV7, abgeleitet sind. (Siehe z.B. Chee et al., Cytomegaloviruses (J. K. McDougall, Hrsg., Springer-Verlag 1990) S. 125–169, hinsichtlich eines Überblicks des Protein-kodierenden Anteils des Cytomegalievirus; McGeoch et al., J. Gen. Virol. (1988) 69:1531–1574, hinsichtlich einer Diskussion der verschiedenen durch HSV-1 kodierten Proteine; U.S.-Patent Nr. 5,171,568 hinsichtlich einer Diskussion der gB- und gD-Proteine von HSV-1 und HSV-2 und der dafür kodierenden Gene; Baer et al., Nature (1984) 310:207–211, hinsichtlich der Identifikation von Protein-kodierenden Sequenzen in einem EBV-Genom; und Davison und Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67:1759–1816, hinsichtlich eines Überblicks von VZV.)

[0081] Antigene aus der Hepatitisfamilie von Viren, einschließlich Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Hepatitis-Delta-Virus (HDV), Hepatitis-E-Virus (HEV) und Hepatitis-G-Virus (HGV), können ebenfalls günstigerweise in den hier beschriebenen Verfahren verwendet werden. Beispielsweise sind die virale Genomsequenz von HCV wie auch Verfahren zur Gewinnung der Sequenz bekannt. Siehe z.B. Internationale Veröffentlichung Nrn. WO 89/04669; WO 90/11089; und WO 90/14436. Das HCV-Genom kodiert mehrere virale Proteine, einschließlich E1 (auch bekannt als E) und E2 (auch bekannt als E2/NS1) und eines N-terminalen Nucleocapsidproteins (als "Kern" bezeichnet) (siehe Houghton et al., Hepatology (1991) 14:381–388, hinsichtlich einer Diskussion von HCV-Proteinen, einschließlich E1 und E2). Jedes dieser Proteine sowie antigenen Fragmente davon finden in der vorliegenden Zusammensetzung und den vorliegen-

den Verfahren Verwendung.

[0082] Entsprechend ist die Sequenz für das δ-Antigen aus HDV bekannt (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 5,378,814), und dieses Antigen kann ebenfalls günstigerweise in der vorliegenden Zusammensetzung und den vorliegenden Verfahren verwendet werden. Ferner finden von HBV abgeleitete Antigene, wie das Kernantigen, das Oberflächenantigen, sAg, sowie die Präoberflächensequenzen, pre-S1 und pre-S2 (früher als pre-S bezeichnet), sowie Kombinationen der Vorstehenden, wie sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2 und pre-S1/pre-S2, hier Verwendung. Siehe z.B. "HBV Vaccines – from the laboratory to license: a case study" in Mackett, M. und Williamson, J. D., Human Vaccines und Vaccination, S. 159–176, hinsichtlich einer Diskussion der HBV-Struktur; und U.S.-Patent Nrn. 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513; Beames et al., J. Virol. (1995) 69:6833–6838; Birnbaum et al., J. Virol. (1990) 64:3319–3330; und Zhou et al., J. Virol. (1991) 65:5457–5464.

[0083] Von anderen Viren abgeleitete Antigene finden in den beanspruchten Zusammensetzungen und Verfahren ebenfalls Verwendung, wie ohne Einschränkung Proteine von Vertretern der Familien Picornaviridae (z.B. Polioviren etc.); Caliciviridae; Togaviridae (z.B. Rötelnvirus, Dengue-Virus etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (z.B. Tollwutvirus etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (z.B. Mumpsvirus, Masernvirus, RS-Virus etc.); Orthomyxoviridae (z.B. Influenzavirustypen A, B und C etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (z.B. HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (auch als HTLV-III, LAV, ARV, hTLR etc. bekannt)), die unter anderen Antigene aus den Isolaten HIV_{IIIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}; HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; HIV-2; und des Affenimmundefizienzvirus (SIV) einschließen, jedoch nicht darauf beschränkt sind. Ferner können Antigene auch vom menschlichen Papillomavirus (HPV) und von den durch Zecken übertragenen Encephalitisviren abgeleitet sein. Siehe z.B. Virology, 3. Auflage (W. K. Joklik, Hrsg., 1988); Fundamental Virology, 2. Auflage (B. N. Fields und D. M. Knipe, Hrsg., 1991), hinsichtlich einer Beschreibung dieser und anderer Viren.

[0084] Insbesondere sind die gp120-Hüllenproteine von einem beliebigen der vorstehenden HIV-Isolate, einschließlich Vertreter der verschiedenen genetischen Subtypen von HIV, bekannt und protokolliert (siehe z.B. Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers et al., Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; und Modrow et al., J. Virol. (1987) 61:570–578, hinsichtlich eines Vergleichs der Hüllensequenzen von verschiedenen HIV-Isolaten) und finden Antigene, die von einem beliebigen dieser Isolate abgeleitet sind, in den vorliegenden Verfahren Verwendung. Ferner ist die Erfindung gleichermaßen auf andere immunogene Proteine, die von einem beliebigen der verschiedenen HIV-Isolate abgeleitet sind, einschließlich eines beliebigen der verschiedenen Hüllenproteine, wie gp160 und gp41, gag-Antigene, wie p24 gag und p55 gag, sowie Proteine, die von der pol-Region abgeleitet sind, anwendbar.

[0085] Das Influenzavirus ist ein anderes Beispiel eines Virus, für das die vorliegende Erfindung besonders verwendbar ist. Speziell sind die Hüllenglykoproteine HA und NA von Influenza A von besonderem Interesse für die Erzeugung einer Immunantwort. Zahlreiche HA-Subtypen von Influenza A wurden identifiziert (Kawaoka et al., Virology (1990) 179:759–767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses," S. 127–168. In: P. Palese und D. W. Kingsbury (Hrsg.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, New York). Somit können Proteine, die von einem beliebigen dieser Isolate abgeleitet sind, ebenfalls in den hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren verwendet werden.

[0086] Die hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren finden auch Verwendung mit zahlreichen bakteriellen Antigenen, wie denen, die von Organismen abgeleitet sind, die Diphtherie, Cholera, Tuberkulose, Tetanus, Keuchhusten, Hirnhautentzündung und andere pathogene Zustände verursachen, einschließlich, jedoch ohne Einschränkung Bordetella pertussis, Neisseria meningitidis (A, B, C, Y), Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori und Haemophilus influenza, Haemophilus influenza Typ B (HIB), Helicobacter pylori und Kombinationen davon. Beispiele von Antigenen aus Neisseria meningitidis B sind in den folgenden Patentanmeldungen: PCT/US 99/09346; PCT IB98/01665; PCT IB99/00103; und in den vorläufigen U.S.-Anmeldungen Seriennr. 60/083,758; 60/094,869; 60/098,994; 60/103,749; 60/103,794; 60/103,796; und 60/121,528 offenbart. Beispiele von parasitären Antigenen schließen die ein, die von Organismen, die Malaria und die Lyme-Krankheit verursachen, abgeleitet sind.

[0087] Es ist leicht ersichtlich, dass die vorliegende Erfindung zur Abgabe vieler verschiedener Makromoleküle und daher zur Behandlung, Vorbeugung und/oder Diagnose sehr vieler Krankheiten verwendet werden kann. In einer anderen Ausführungsform können die Makromolekül/Mikropartikel-Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung für eine ortsspezifische, gezielte Abgabe verwendet werden. Die intravenöse Verabreichung der Makromolekül/Mikropartikel-Zusammensetzungen kann verwendet werden, um gezielt auf die

Lunge, Leber, Milz, den Blutkreislauf oder das Knochenmark einzuwirken.

[0088] Die Adsorption von Makromolekülen an der Oberfläche der adsorbierenden Mikropartikel (oder an Mikroemulsionen der vorliegenden Erfindung) findet durch einen beliebigen Bindungs-Wechselwirkungs-Mechanismus statt, der eine Ionenbindung, Wasserstoffbindung, kovalente Bindung, Van-der-Waals-Bindung und Bindung durch hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen einschließt, jedoch nicht darauf beschränkt ist. Durchschnittsfachleute können leicht Detergenzen auswählen, die für den Typ des zu adsorbierenden Makromoleküls geeignet sind.

[0089] Mikropartikel, die in Gegenwart von geladenen Detergenzen, wie anionischen oder kationischen Detergenzen, hergestellt wurden, können zum Beispiel Mikropartikel mit einer negativen Nettoladung oder einer positiven Nettoladung ergeben, die viele verschiedene Moleküle adsorbieren können. Mikropartikel, die mit anionischen Detergenzen, wie Natriumdodecylsulfat (SDS), hergestellt wurden, d.h. SDS-PLG-Mikropartikel, adsorbieren zum Beispiel positiv geladene Antigene, wie Proteine. Entsprechend adsorbieren Mikropartikel, die mit kationischen Detergenzen wie Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB), hergestellt wurden, d.h. CTAB-PLG-Mikropartikel, negativ geladene Makromoleküle, wie DNA. Wenn die zu adsorbierenden Makromoleküle Bereiche positiver und negativer Ladung aufweisen, können entweder kationische oder anionische Detergenzen geeignet sein.

[0090] Biologisch abbaubare Polymere zur Herstellung von Mikropartikeln zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung sind von z.B. Boehringer Ingelheim, Deutschland, und Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, leicht im Handel erhältlich. Zur Erzeugung der Mikropartikel hier verwendbare Polymere schließen zum Beispiel die von Polyhydroxybuttersäure; Polycaprolacton; Polyorthoester; Polyanhydrid; sowie einer Poly(α -hydroxysäure), wie Poly(L-lactid), Poly(D,L-lactid) (beide hier als "PLA" bekannt), Poly(hydroxybutyrat), Copolymeren aus D,L-Lactid und Glykolid, wie Poly(D,L-lactid-co-glykolid) (hier als "PLG" oder "PLGA" bezeichnet) oder einem Copolymer aus D,L-Lactid und Caprolacton abgeleiteten ein. Zur Verwendung hier besonders bevorzugte Polymere sind PLA- und PLG-Polymere. Diese Polymere sind in verschiedenen Molekulargewichten erhältlich, und das für eine bestimmte Verwendung geeignete Molekulargewicht wird von einem Fachmann leicht bestimmt. Somit liegt z.B. ein geeignetes Molekulargewicht für PLA in der Größenordnung von etwa 2000 bis 5000. Für PLG geeignete Molekulargewichte liegen im Allgemeinen in einem Bereich von etwa 10000 bis etwa 200000, bevorzugt etwa 15000 bis etwa 150000 und am meisten bevorzugt etwa 50000 bis etwa 100000.

[0091] Wenn ein Copolymer, wie PLG, zur Erzeugung der Mikropartikel verwendet wird, finden hier verschiedene Verhältnisse von Lactid:Glykolid Verwendung, und das Verhältnis ist größtenteils beliebig, wobei es teilweise von dem gemeinsam verabreichten Makromolekül und der gewünschten Abbaugeschwindigkeit abhängt. Ein PLG-Polymer mit 50:50, das 50 % D,L-Lactid und 50 % Glykolid enthält, stellt zum Beispiel ein schnell resorbierendes Copolymer bereit, während sich auf Grund der erhöhten Lactidkomponente ein PLG mit 75:25 langsamer und mit 85:15 und 90:10 noch langsamer abbaut. Es ist leicht ersichtlich, dass ein geeignetes Verhältnis von Lactid:Glykolid, bezogen auf die Art des Antigens und die in Frage kommende Erkrankung, von einem Fachmann leicht bestimmt wird. Außerdem finden in Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, in denen das Antigen oder die Hilfsmittel in Mikropartikeln eingeschlossen sind, Gemische aus Mikropartikeln mit unterschiedlichen Verhältnissen von Lactid:Glykolid hier Verwendung, um die gewünschte Freisetzungskinetik für ein bestimmtes Makromolekül zu erzielen und um sowohl eine primäre als auch eine sekundäre Immunantwort bereitzustellen. Die Abbaugeschwindigkeit der Mikropartikel der vorliegenden Erfindung kann auch durch derartige Faktoren, wie das Polymermolekulargewicht und die Polymerkristallinität, reguliert werden. PLG-Copolymere mit unterschiedlichen Verhältnissen von Lactid:Glykolid und Molekulargewichten sind von mehreren Quellen, einschließlich Boehringer Ingelheim, Deutschland, und Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, leicht im Handel erhältlich. Diese Polymere können auch durch einfache Polykondensation der Milchsäurekomponente unter Anwendung von Verfahren, die in dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, wie in Tabata et al., J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22:837-858, beschrieben, hergestellt werden.

[0092] Das Makromolekül/die Mikropartikel werden unter Verwendung eines beliebigen von mehreren Verfahren, die in dem Fachgebiet allgemein bekannt sind, hergestellt. Verfahren der zweifachen Eindampfung von Emulsion/Lösungsmittel, wie die in dem U.S.-Patent Nr. 3,523,907 und Ogawa et al., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-1103, beschriebenen, können hier zur Herstellung der Mikropartikel verwendet werden. Diese Verfahren umfassen die Erzeugung einer primären Emulsion, die aus Tröpfchen einer Polymerlösung besteht, die nachfolgend mit einer kontinuierlichen wässrigen Phase, die einen Partikelstabilisator/ein oberflächenaktives Mittel enthält, gemischt wird.

[0093] In einer anderen Ausführungsform kann ein Wasser-in-Öl-in-Wasser (w/o/w) Lösungsmittelabdampfungssystem aus, wie von O'Hagan et al., Vaccine (1993) 11:965–969, und Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362, beschrieben, zur Erzeugung der Mikropartikel verwendet werden. Bei diesem Verfahren wird das spezielle Polymer mit einem organischen Lösungsmittel, wie Ethylacetat, Dimethylchlorid (auch als Methylenchlorid und Dichlormethan bezeichnet), Acetonitril, Aceton, Chloroform und dergleichen, vereinigt. Das Polymer wird in einer etwa 1–30 %igen, bevorzugt einer etwa 2–15 %igen, stärker bevorzugt einer etwa 3–10 %igen und am meisten bevorzugt einer etwa 4 %igen Lösung in einem organischen Lösungsmittel bereitgestellt. Die Polymerlösung wird unter Verwendung von z.B. einem Homogenisator emulgiert. Die Emulsion wird dann gegebenenfalls mit einem größeren Volumen einer wässrigen Lösung aus einem Emulsionsstabilisator, wie Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylpyrrolidon, und einem kationischen, anionischen oder nicht-ionischen Detergents vereinigt. Die Emulsion kann mit mehr als einem Emulsionsstabilisator und/oder Detergents, z.B. einer Kombination aus PVA und einem Detergent, vereinigt werden. Bestimmte Makromoleküle können leichter an Mikropartikel, die eine Kombination aus Stabilisatoren und/oder Detergenzien aufweisen, adsorbieren. Wenn ein Emulsionsstabilisator verwendet wird, wird er typischerweise in einer etwa 2–15 %igen Lösung und besonders typischerweise einer etwa 4–10 %igen Lösung bereitgestellt. Im Allgemeinen wird ein Gewichtsverhältnis von Detergents zu Polymer im Bereich von etwa 0,00001:1 bis etwa 0,1:1, stärker bevorzugt von etwa 0,0001:1 bis etwa 0,01:1, stärker bevorzugt von etwa 0,001:1 bis etwa 0,01:1 und noch stärker bevorzugt von etwa 0,005:1 bis etwa 0,01:1 verwendet. Das Gemisch wird dann homogenisiert, um eine stabile Zweifachemulsion, w/o/w, herzustellen. Die organischen Lösungsmittel werden dann abgedampft.

[0094] Die Formulierungsparameter können beeinflusst werden, um die Herstellung von kleinen Mikropartikeln in der Größenordnung von 0,05 µm (50 nm) bis zu größeren Mikropartikeln mit 50 µm oder sogar noch größer zu ermöglichen. Siehe z.B. Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362–368; und McGee et al., J. Microencap. (1996). Verringertes Rühren sowie eine Zunahme des Volumens der inneren Phase führen zum Beispiel zu größeren Mikropartikeln. Kleine Partikel werden durch geringe Volumina der wässrigen Phase mit hohen Konzentrationen von Emulsionsstabilisatoren hergestellt.

[0095] Mikropartikel können auch unter Verwendung von Sprühtrocknen und Koazervation, wie z.B. in Thomasin et al., J. Controlled Release (1996) 41:131; in dem U.S.-Patent Nr. 2,800,457; und in Masters, K. (1976) Spray Drying, 2. Aufl., Wiley, New York, beschrieben; Luft-Suspensions-Beschichtungsverfahren, wie "Pfannenbeschichtung" und "Wurster-Beschichtung", wie von Hall et al., (1980) The "Wurster Process" in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications (A. F. Kydonieus, Hrsg.), Bd. 2, S. 133–154, CRC Press, Boca Raton, Florida, und Deasy, P. B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S(2):99–139, beschrieben; und Ionengelbildung, wie z.B. von Lim et al., Science (1980) 210:908–910, beschrieben, erzeugt werden.

[0096] Die Partikelgröße kann z.B. durch Laserlichtstreuung, indem zum Beispiel ein Spektrometer mit einem eingebauten Helium-Neon-Laser verwendet wird, bestimmt werden. Im Allgemeinen wird die Partikelgröße bei Raumtemperatur bestimmt und umfasst Mehrfachanalysen der in Frage kommenden Probe (z.B. 5- bis 10-fach), wobei sich ein Mittelwert für den Partikeldurchmesser ergibt. Die Partikelgröße wird auch leicht unter Verwendung von Rasterelektronenmikroskopie (SEM) bestimmt.

[0097] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Mikropartikelzubereitung, umfassend Submikronemulsionen mit ionischen oberflächenaktiven Mitteln. MF59 oder andere können als Basispartikel verwendet werden, während ionische oberflächenaktive Mittel Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP), Dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin (DEPC) und Dioleoylphosphatidsäure (DPA), die jeweils in Squalen löslich sind, einschließen können, jedoch nicht darauf beschränkt sind. Prototypische Ionenemulsionen können durch Lösen jedes der Detergenzien in Squalen/10 % Span 85 mit Konzentrationen, die in einem Bereich von 4–52 mg/ml Squalen liegen, formuliert werden. Die Gemische aus Squalen/oberflächenaktivem Mittel können mit 0,5 % Tween 80/H₂O mit 5 ml Squalen/100 ml H₂O emulgiert werden. Eine Voremulsion kann durch Homogenisation mit einem Silverson-Homogenisator (5 Minuten, 5000 UpM) erzeugt werden, und die Endemulsionen können durch Mikrofluidisation (~10000 psi, 5 Durchgänge, Microfluidizer 110S) hergestellt werden.

[0098] Nach der Herstellung können die Mikropartikel als solche gelagert werden oder für die zukünftige Verwendung gefriergetrocknet werden. Um Makromoleküle an den Mikropartikeln zu adsorbieren, wird die Mikropartikelzubereitung einfach mit dem Makromolekül von Interesse gemischt, und die so erhaltene Formulierung kann vor der Verwendung wieder lyophilisiert werden. Im Allgemeinen werden Makromoleküle zu den Mikropartikeln gegeben, wobei sich Mikropartikel mit adsorbierten Makromolekülen mit einem Gewichtsverhältnis von etwa 0,0001:1 bis 0,25:1, bevorzugt 0,001:1 bis 0,1 und stärker bevorzugt 0,01 bis 0,05 Makromolekülen zu Mikropartikeln ergeben. Der Makromolekülgehalt der Mikropartikel kann unter Anwendung von Standardver-

fahren bestimmt werden.

[0099] Die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung können Makromoleküle, die in ihnen eingeschlossen oder verkapst sind, sowie Makromoleküle, die daran adsorbiert sind, aufweisen. Somit kann zum Beispiel ein Fachmann Mikropartikel, die verkapstelte Hilfsmittel mit daran adsorbieren Proteinen aufweisen, oder Mikropartikel, die verkapstelte Proteine mit daran adsorbierten Hilfsmitteln aufweisen, gemäß der Erfindung herstellen.

[0100] Sind die Mikropartikel mit adsorbierten Makromolekülen einmal hergestellt, werden sie in Arzneimitteln oder Impfstoffen formuliert, um viele verschiedene Erkrankungen, wie vorstehend beschrieben, zu behandeln, ihnen vorzubeugen und/oder sie zu diagnostizieren. Die Zusammensetzungen schließen im Allgemeinen ein oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Exzipienten oder Träger, wie Wasser, Kochsalzlösung, Glycerin, Polyethylenglykol, Hyaluronsäure, Ethanol etc., ein. Ferner können Hilfsstoffe, wie Netzmittel oder Emulgatoren, biologische Puffersubstanzen und dergleichen in derartigen Trägern vorliegen. Ein biologischer Puffer kann praktisch eine beliebige Lösung sein, die pharmakologisch verträglich ist, und welche die Formulierung mit dem gewünschten pH-Wert, d.h. einem pH-Wert im physiologischen Bereich, bereitstellt. Beispiele von Pufferlösungen schließen Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tris-gepufferte Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung nach Hank und dergleichen ein.

[0101] Hilfsmittel können verwendet werden, um die Wirksamkeit der Arzneimittel zu verstärken. Die Hilfsmittel können gleichzeitig mit den Mikropartikeln der vorliegenden Erfindung, z.B. in derselben Zusammensetzung oder in getrennten Zusammensetzungen, verabreicht werden. In einer anderen Ausführungsform kann ein Hilfsmittel vor oder nach den Mikropartikelzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verabreicht werden. In einer anderen Ausführungsform kann das Hilfsmittel, wie ein immunologisches Hilfsmittel, in dem Mikropartikel verkapstelt sein. Hilfsmittel, wie beliebige Makromoleküle, können unter Verwendung eines beliebigen der verschiedenen in dem Fachgebiet bekannten Verfahren in den Mikropartikeln verkapstelt werden. Siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 3,523,907; Ogawa et al., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-1103; O'Hagan et al., Vaccine (1993) 11:965-969, und Jefferey et al., Pharm. Res. (1993) 10:362. In einer anderen Ausführungsform können, wie vorstehend für ein beliebiges Makromolekül beschrieben, Hilfsmittel an dem Mikropartikel adsorbiert werden. In einer anderen Ausführungsform können Hilfsmittel die Ölträpfchenemulsionen der vorliegenden Erfindung umfassen.

[0102] Immunologische Hilfsmittel schließen: (1) Aluminiumsalze (alum), wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat etc.; (2) Öl-in-Wasser-Emulsionsformulierungen (mit oder ohne andere spezielle immunstimulierende Mittel, wie Muramylpeptide (siehe nachstehend) oder Bakterienzellwandkomponenten), wie zum Beispiel (a) MF59 (Internationale Veröffentlichung Nr. WO 90/14837), das 5 % Squalen, 0,5 % Tween 80 und 0,5 % Span 85 (das, obwohl es nicht erforderlich ist, gegebenenfalls verschiedene Mengen an MTP-PE (siehe nachstehend) enthält) und unter Verwendung eines Microfluidizers, wie des Microfluidizers Modell 110Y (Microfluidics, Newton, MA), zu Submikronpartikeln formuliert wurde, (b) SAF, das 10 % Squalan, 0,4 % Tween 80, 5 % mit Pluronic blockiertes Polymer L121 und thr-MDP (siehe nachstehend) enthält und entweder zu einer Submikronemulsion mikrofluidifiziert oder zur Erzeugung einer Emulsion mit einer größeren Partikelgröße verwirbelt wurde, und (c) RibiTM-Hilfsmittelsystem (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), das 2 % Squalen, 0,2 % Tween 80 und eine oder mehrere Bakterienzellwandkomponenten, bestehend aus Monophosphoryllipid A (MPL), Trehalosedimycolat (TDM) und Zellwandskelett (CWS), bevorzugt MPL + CWS (DetoxTM), enthält (hinsichtlich einer weiteren Diskussion zur Verwendung hier geeigneter Öl-in-Wasser-Submikronemulsionen siehe Patentanmeldung Nr. 09/015,736 mit mehreren Rechtsinhabern, eingereicht am 29. Januar 1998); (3) Saponinhilfsmittel, wie Quil A oder QS21 (z.B. StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)), oder daraus erzeugte Partikel, wie ISCOMs (immunstimulierende Komplexe), können verwendet werden; (4) komplettes Freund-Adjuvans (CFA) und unvollständiges Freund-Adjuvans (IFA); (5) Cytokine, wie Interleukine (IL-1, IL-2 etc.), Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Tumornekrosefaktor (TNF) etc.; (6) entgiftete Mutanten eines bakteriellen, ADP-ribosylierenden Toxins, wie eines Choleratoxins (CT), eines Pertussistoxins (PT) oder eines hitzeempfindlichen Toxins aus *E. coli* (LT), besonders LT-K63 (wobei die Aminosäure des Wildtyps in Stellung 63 durch Lysin ersetzt ist), LT-R72 (wobei die Aminosäure des Wildtyps in Stellung 72 durch Arginin ersetzt ist), CT-S109 (wobei die Aminosäure des Wildtyps in Stellung 109 durch Serin ersetzt ist) und PT-K9/G129 (wobei die Aminosäure des Wildtyps in Stellung 9 durch Lysin ersetzt ist und in Stellung 129 durch Glycin ersetzt ist) (siehe z.B. Internationale Veröffentlichung Nrn. WO93/13202 und WO92/19265); (7) CpG-Oligonucleotide und andere immunstimulierende Sequenzen (ISSs); und (8) andere Substanzen, die als immunstimulierende Mittel wirken, um die Wirksamkeit der Zusammensetzung zu verstärken, ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Alum und MF59 sind bevorzugt.

[0103] Muramylpeptide schließen N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-N-mura-

myl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)ethylamin (MTP-PE) etc. ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0104] Hinsichtlich weiterer Beispiele von Hilfsmitteln siehe Vaccine Design, The Subunit and the Adjuvant Approach, Powell, M. F. und Newman, M. J., Hrsg., Plenum Press, 1995.

[0105] Die Zusammensetzungen umfassen eine "therapeutisch wirksame Menge" des Makromoleküls von Interesse. Das heißt, eine Menge an Makromolekül/Mikropartikel ist in den Zusammensetzungen eingeschlossen, die bei dem Patienten die Erzeugung einer ausreichenden Antwort verursacht, um den Symptome vorzubeugen, sie zu verringern, zu beseitigen oder zu diagnostizieren. Die genaue notwendige Menge variiert unter anderen Faktoren abhängig von dem behandelten Patienten; dem Alter und dem Allgemeinzustand des zu behandelnden Patienten; der Schwere der behandelten Erkrankung; im Fall einer Immunantwort der Fähigkeit des Immunsystems des Patienten, Antikörper zu bilden; dem gewünschten Schutzgrad und dem speziellen ausgewählten Antigen und seiner Verabreichungsart. Eine geeignete wirksame Menge kann von einem Fachmann leicht bestimmt werden. Somit fällt eine "therapeutisch wirksame Menge" in einen relativ breiten Bereich, der durch Routineversuche bestimmt werden kann. Wenn das Makromolekül ein Polynukleotid ist, liegt für die Zwecke der vorliegenden Erfindung zum Beispiel eine wirksame Dosis typischerweise in einem Bereich von etwa 1 ng bis etwa 1 mg, stärker bevorzugt von etwa 10 ng bis etwa 1 µg und am meisten bevorzugt etwa 50 ng bis etwa 500 ng des pro Dosis abgegebenen Makromoleküls; und wenn das Makromolekül ein Antigen ist, liegt eine wirksame Dosis typischerweise in einem Bereich von etwa 1 µg bis etwa 100 mg, stärker bevorzugt von etwa 10 µg bis etwa 1 mg und am meisten bevorzugt etwa 50 µg bis etwa 500 µg des pro Dosis abgegebenen Makromoleküls.

[0106] Sind die Zusammensetzungen der Erfindung einmal formuliert, können sie parenteral, z.B. durch Injektion, verabreicht werden. Die Zusammensetzungen können entweder subkutan, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär injiziert werden. Andere Verabreichungsarten schließen eine nasale, orale und pulmonale Verabreichung, Suppositorien und transdermale oder transkutane Anwendungen ein. Die Dosierungsbehandlung kann ein Einzeldosisplan oder ein Mehrfachdosisplan sein. Ein Mehrfachdosisplan ist einer, in dem ein primärer Verlauf der Verabreichung aus 1–10 getrennten Dosen, gefolgt von anderen Dosen, die in nachfolgenden Zeitabständen verabreicht werden, und die so ausgewählt werden, dass die therapeutische Antwort aufrechterhalten und/oder verstärkt wird, zum Beispiel einer zweiten Dosis in 1–4 Monaten und, falls benötigt, (einer) nachfolgenden Dosis (Dosen) nach mehreren Monaten, bestehen kann. Das Dosierungsschema wird auch zumindest teilweise von den Bedürfnissen des Patienten bestimmt und hängt von dem Urteil des praktischen Arztes ab.

[0107] Ferner werden, wenn eine Vorbeugung der Krankheit gewünscht ist, die Makromoleküle in Impfstoffen im Allgemeinen vor der Erstinfektion mit dem Krankheitserreger von Interesse verabreicht. Wenn eine Behandlung, z.B. die Verringerung von Symptomen oder Rückfällen, gewünscht ist, werden die Makromoleküle im Allgemeinen nach der Erstinfektion verabreicht.

2. Öltröpfchenemulsionen

[0108] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Öltröpfchenemulsion, umfassend ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator, hergestellt. Moleküle, wie ein Oligonukleotid, umfassend mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv, können mit der Öltröpfchenemulsion vereinigt werden, um ein Hilfsmittel zu erzeugen. Die Öltröpfchenemulsion umfasst bevorzugt ein metabolisierbares Öl und einen Emulgator, wobei das Öl und der Emulgator in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit Öltröpfchen, die im Wesentlichen alle einen Durchmesser von kleiner als 1 µm aufweisen, vorliegen. Derartige Tröpfchen zeigen eine überraschende Überlegenheit gegenüber Hilfsmittelzusammensetzungen, die Öl und Emulgatoren enthalten, in denen die Öltröpfchen signifikant größer als die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten sind. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Emulsion als Folge eines kationischen Detergens, das als Emulgator verwendet wird, positiv geladen oder enthält in einer anderen Ausführungsform ein von dem Emulgator getrenntes kationisches Detergens. Dies ermöglicht die Adsorption von antigenen Nukleotidmolekülen, wie CpG-Oligonukleotiden oder viraler DNA. In einer anderen Ausführungsform ermöglicht die Verwendung eines anionischen Detergens die Adsorption von Molekülen, wie Proteinen.

[0109] Obwohl die einzelnen Komponenten der Hilfsmittelzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung bekannt sind, wurden derartige Zusammensetzungen nicht auf dieselbe Art und Weise kombiniert. Folglich sind die einzelnen Komponenten, obwohl sie nachstehend sowohl allgemein als auch für bevorzugte Ausführungsformen ziemlich detailliert beschrieben wurden, in dem Fachgebiet allgemein bekannt, und die hier ver-

wendeten Begriffe, wie metabolisierbares Öl, Emulgator, immunstimulierendes Mittel, Muramylpeptid und lipophiles Muramylpeptid, sind ausreichend gut bekannt, um diese Verbindungen ohne weitere Beschreibung einem Fachmann zu beschreiben.

[0110] Eine Komponente dieser Zusammensetzungen ist ein metabolisierbares, nicht-toxisches Öl, bevorzugt eines mit etwa 6 bis etwa 30 Kohlenstoffatomen, das Alkane, Alkene, Alkine und ihre entsprechenden Säuren und Alkohole, die Ether und Ester davon und Gemische davon einschließt, jedoch nicht darauf beschränkt ist. Das Öl kann ein beliebiges pflanzliches Öl, Fischöl, tierisches Öl oder synthetisch hergestelltes Öl sein, das durch den Körper des Wirtstiers, dem das Hilfsmittel verabreicht wird, metabolisiert werden kann, und das für den Patienten nicht toxisch ist. Das Wirtstier ist typischerweise ein Säuger und bevorzugt ein Mensch. Mineralöl und ähnliche toxische Erdöldestillatöle sind von dieser Erfindung ausdrücklich ausgeschlossen.

[0111] Die Ölkomponente dieser Erfindung kann auch ein beliebiges langkettiges Alkan, Alken oder Alkin oder ein Säure- oder Alkoholderivat davon, entweder als die freie Säure, ihr Salz oder ein Ester, wie ein Mono- oder Di- oder Triester, wie die Triglyceride und Ester von 1,2-Propandiol oder ähnlichen Polyhydroxyalkoholen, sein. Die Alkohole können unter Verwendung einer Aminosäure oder polyfunktionellen Säure, zum Beispiel Essigsäure, Propansäure, Citronensäure oder dergleichen, acyliert werden. Ether, die von langkettigen Alkoholen, die Öle sind, abgeleitet sind und die hier angegebenen anderen Kriterien erfüllen, können ebenfalls verwendet werden.

[0112] Die einzelne Alkan-, Alken- oder Alkineinheit und ihre Säure- oder Alkoholderivate weisen im Allgemeinen etwa 6 bis etwa 30 Kohlenstoffatome auf. Die Einheit kann eine verzweigte oder unverzweigte Struktur aufweisen. Sie kann vollständig gesättigt sein oder eine oder mehrere Doppel- oder Dreifachbindungen aufweisen. Wenn Öle auf der Basis von Mono- oder Polyestern oder -ethern verwendet werden, gilt die Einschränkung von etwa 6 bis etwa 30 Kohlenstoffatomen für die einzelnen Fettsäure- oder Fettalkoholeinheiten und nicht für die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome.

[0113] Ein beliebiges metabolisierbares Öl, besonders aus einer Tier-, Fisch- oder Pflanzenquelle, kann hier verwendet werden. Es ist wesentlich, dass das Öl durch den Wirt, dem es verabreicht wird, metabolisiert wird, sonst kann die Ölkomponente Abszesse, Granulome oder sogar Karzinome verursachen oder (wenn sie in der tierärztlichen Praxis verwendet wird) kann das Fleisch von geimpften Vögeln und Tieren auf Grund der schädlichen Wirkung, die das nicht-metabolisierte Öl auf den Verbraucher haben kann, für den menschlichen Verbrauch inakzeptabel machen.

[0114] Beispielhafte Quellen für pflanzliche Öle schließen Nüsse, Samen und Körner ein. Erdnussöl, Sojabohnenöl, Kokosnussöl und Olivenöl, die am häufigsten erhältlichen, veranschaulichen die Nussöle. Samenöle schließen Safloröl, Baumwollsamenöl, Sonnenblumenkernöl, Sesamsamenöl und dergleichen ein. In der Korngruppe ist Maiskeimöl das am leichtesten erhältliche, jedoch das Öl anderer Getreidekörner, wie Weizen, Haffer, Roggen, Reis, Zwerghirse, Triticale und dergleichen, kann ebenfalls verwendet werden.

[0115] Die Technologie zur Gewinnung pflanzlicher Öle ist gut entwickelt und allgemein bekannt. Die Zusammensetzungen dieser und anderer ähnlicher Öle können zum Beispiel in dem Merck-Index und den Quellenmaterialien über Lebensmittel, Ernährung und Lebensmitteltechnologie gefunden werden.

[0116] Die Fettsäureester von Glycerin und 1,2-Propandiol mit 6–10 Kohlenstoffatomen können, obwohl sie nicht natürlich in Samenölen vorkommen, ausgehend von den Nuss- und Samenölen, durch Hydrolyse, Trennung und Veresterung der geeigneten Materialien hergestellt werden. Diese Produkte sind unter dem Namen NEOBEE® von PVO International, Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boongon, NJ, und anderen im Handel erhältlich.

[0117] Öle aus einer beliebigen Tierquelle können ebenfalls in den Hilfsmitteln und immunogenen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden. Tieröle und -fette sind auf Grund der Tatsache, dass sie als Triglyceride vorkommen und einen höheren Sättigungsgrad als Öle aus Fisch oder Pflanzen aufweisen, bei physiologischen Temperaturen in der Regel Feststoffe. Fettsäuren sind jedoch aus Tierfetten durch partielle oder vollständige Triglyceridverseifung, welche die freien Fettsäuren bereitstellt, erhältlich. Fette und Öle aus Säugermilch sind metabolisierbar und können daher bei der Durchführung dieser Erfindung verwendet werden. Die Verfahren zur Trennung, Reinigung, Verseifung und andere Mittel, die zur Gewinnung reiner Öle aus Tierquellen notwendig sind, sind in dem Fachgebiet allgemein bekannt.

[0118] Die meisten Fische enthalten metabolisierbare Öle, die leicht gewonnen werden können. Dorschlebe-

röl, Haifischleberöle und Walöl, wie Spermazet, veranschaulichen mehrere der Fischöle, die hier verwendet werden können. Mehrere verzweigte Öle werden in Isopreneinheiten mit 5-Kohlenstoffatomen biochemisch hergestellt und werden allgemein als Terpenoide bezeichnet. Haifischleberöl enthält ein verzweigtes, ungesättigtes Terpenoid, das als Squalen, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaen, bekannt ist und das hier besonders bevorzugt ist. Squalan, das gesättigte Analogon von Squalen, ist auch ein besonders bevorzugtes Öl. Fischöle, einschließlich Squalen und Squalan, sind von kommerziellen Quellen leicht erhältlich oder können durch in dem Fachgebiet bekannte Verfahren erhalten werden.

[0119] Die Ölkomponente dieser Hilfsmittel und immunogenen Zusammensetzungen liegt in einer Menge von etwa 0,5 Vol.-% bis etwa 20 Vol.-%, jedoch bevorzugt nicht mehr als etwa 15 % und besonders in einer Menge von etwa 1 % bis etwa 12 % vor. Die Verwendung von etwa 1 % bis etwa 4 % Öl ist am meisten bevorzugt.

[0120] Der wässrige Teil dieser Hilfsmittelzusammensetzungen ist bevorzugt eine gepufferte Kochsalzlösung oder stärker bevorzugt reines Wasser. Da diese Zusammensetzungen für die parenterale Verabreichung beabsichtigt sind, ist die Herstellung von gepufferten Endlösungen, die als immunogene Zusammensetzungen verwendet werden, bevorzugt, damit die Tonizität, d.h. die Osmolalität, im Wesentlichen dieselbe wie normaler physiologischer Flüssigkeiten ist, um nach der Verabreichung eine Schwellung oder schnelle Absorption der Zusammensetzung wegen unterschiedlicher Ionenkonzentrationen zwischen der Zusammensetzung und den physiologischen Flüssigkeiten zu verhindern. Es ist ebenfalls bevorzugt, die Kochsalzlösung zu puffern, um den pH-Wert mit den normalen physiologischen Bedingungen kompatibel zu halten. In bestimmten Fällen kann es auch nötig sein, den pH-Wert bei einem speziellen Wert zu halten, um die Stabilität bestimmter Komponenten der Zusammensetzung, wie der Glykopeptide, sicherzustellen.

[0121] Ein beliebiger physiologisch verträglicher Puffer kann hier verwendet werden, jedoch sind Phosphatpuffer bevorzugt. Andere verträgliche Puffer, wie Acetat, Tris, Hydrogencarbonat, Carbonat oder dergleichen, können als Ersatz für Phosphatpuffer verwendet werden. Der pH-Wert der wässrigen Komponente liegt bevorzugt zwischen etwa 6,0–8,0.

[0122] Wenn die Mikroemulsion anfänglich hergestellt wird, ist jedoch reines Wasser als wässrige Komponente der Emulsion bevorzugt. Eine Erhöhung der Salzkonzentration erschwert es, die gewünschte kleine Tröpfchengröße zu erzielen. Wenn die immunogenen Endzusammensetzungen aus dem Hilfsmittel hergestellt werden, kann das antigene Material in einem Puffer mit einer geeigneten Osmolalität zugegeben werden, um die gewünschte immunogene Zusammensetzung bereitzustellen.

[0123] Die Menge der wässrigen Komponente, die in diesen Zusammensetzungen verwendet wird, ist die Menge, die nötig ist, um die Zusammensetzung einheitlich einzustellen. Das heißt, eine Menge der wässrigen Komponente, die ausreicht, um 100 % zu erzeugen, wird mit den anderen vorstehend aufgeführten Komponenten gemischt, um das Volumen der Zusammensetzungen einzustellen.

[0124] Eine beträchtliche Anzahl von Emulgatoren und Suspendiermitteln wird allgemein in den pharmazeutischen Wissenschaften verwendet. Diese schließen natürlich abstammende Materialien, wie Gummiarten von Bäumen, pflanzliches Protein, Polymere auf Zuckerbasis, wie Alginat und Cellulose, und dergleichen ein. Bestimmte Oxypolymere oder Polymere mit einem Hydroxidsubstituenten oder einem anderen hydrophilen Substituenten an dem Kohlenstoffgerüst, zum Beispiel Povidon, Polyvinylalkohol und mono- und polyfunktionelle Verbindungen auf der Basis von Glykolether, weisen die Wirkung eines oberflächenaktiven Mittels auf. Langkettige, von Fettsäuren abgeleitete Verbindungen bilden eine dritte wesentliche Gruppe von Emulgatoren und Suspendiermitteln, die in dieser Erfindung verwendet werden können. Beliebige der vorstehenden oberflächenaktiven Mittel sind verwendbar, solange sie nicht toxisch sind.

[0125] Spezielle Beispiele geeigneter Emulgatoren (auch als oberflächenaktive Mittel oder Detergenzien bezeichnet), die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen die Folgenden ein:

1. Wasserlösliche Seifen, wie Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Alkanolammoniumsalze höherer Fettsäuren (C_{10} – C_{22}), und besonders Natrium- und Kaliumtalg- und -kokosnussseifen.
2. Anionische, synthetische, seifenfreie Detergenzien, die durch die wasserlöslichen Salze organischer Reaktionsprodukte von Schwefelsäure, die in ihrer Molekülstruktur einen Alkylrest, der etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatome enthält, und einen Rest, ausgewählt aus Sulfonsäure- und Schwefelsäureesterresten, aufweisen, dargestellt werden können. Beispiele dieser sind die Natrium- oder Kaliumalkylsulfate, die von Talg- oder Kokosnussöl abgeleitet sind; Natrium- oder Kaliumalkylbenzolsulfonate; Natriumalkylglycerylethersulfonate; Natriummonoglyceridsulfonate und -sulfate von Kokosnussölfettsäure; Natrium- oder Kaliumsalze von Schwefelsäureestern des Reaktionsprodukts aus 1 mol eines höheren Fettalkohols und etwa 1 bis etwa

6 mol Ethylenoxid; Natrium- oder Kaliumalkylphenoylethylenoxidethersulfonate mit 1 bis etwa 10 Einheiten Ethylenoxid pro Molekül, in denen die Alkylreste etwa 8 bis etwa 12 Kohlenstoffatome enthalten; das Reaktionsprodukt aus Fettsäuren, die mit Isethionsäure verestert und mit Natriumhydroxid neutralisiert wurden; Natrium- oder Kaliumsalze des Fettsäureamids eines Methyltaurids; und Natrium- und Kaliumsalze von mit SO sulfonierten C_{10} - C_{24} - α -Olefinen.

3. Nicht-ionische, synthetische Detergenzen, die durch die Kondensation von Alkylenoxidresten mit einer organischen, hydrophoben Verbindung hergestellt wurden. Typische hydrophobe Reste schließen Kondensationsprodukte von Propylenoxid mit Propylenglykol, Alkylphenole, das Kondensationsprodukt aus Propylenoxid und Ethyldiamin, aliphatische Alkohole mit etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatomen und Amide von Fettsäuren ein.

4. Nicht-ionische Detergenzen, wie Aminoxide, Phosphinoxide und Sulfoxides, mit halbpolaren Eigenschaften. Spezielle Beispiele langkettiger, tertiärer Aminoxide schließen Dimethyldodecylaminoxid und Bis-(2-hydroxyethyl)dodecylamin ein. Spezielle Beispiele von Phosphinoxiden werden in dem U.S. Patent Nr. 3,304,263, das am 14. Februar 1967 erteilt wurde, gefunden und schließen Dimethyldodecylphosphinoxid und Dimethyl-(2-hydroxydodecyl)phosphinoxid ein.

5. Langkettige Sulfoxide, einschließlich der, die der Formel R^1 -SO- R^2 entsprechen, wobei R^1 und R^2 substituierte oder unsubstituierte Alkylreste sind, und wobei das erste etwa 10 bis etwa 28 Kohlenstoffatome enthält, während R^2 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome enthält. Spezielle Beispiele dieser Sulfoxide schließen Dodecylmethylsulfoxid und 3-Hydroxytridecylmethylsulfoxid ein.

6. Ampholytische, synthetische Detergenzen, wie Natrium-3-dodecylaminopropionat und Natrium-3-dodecylaminopropansulfat.

7. Zwitterionische, synthetische Detergenzen, wie 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)propan-1-sulfonat und 3-(N,N-Dimethyl-N-hexadecylammonio)-2-hydroxypropan-1-sulfonat.

[0126] Ferner können alle der folgenden Typen von Emulgatoren in einer Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet werden: (a) Seifen (d.h. Alkalosalze) aus Fettsäuren, Harzsäuren und Tallöl; (b) Alkylarensulfonate; (c) Alkylsulfate, einschließlich oberflächenaktiver Mittel mit sowohl verzweigten als auch unverzweigten, hydrophoben Resten sowie primären und sekundären Sulfatgruppen; (d) Sulfate und Sulfonate, die eine intermediäre Bindung zwischen den hydrophoben und hydrophoben Resten enthalten, wie die mit Fettsäure acylierten Methyltauride und die sulfatierten Fettsäuremonoglyceride; (e) Ester von Polyethylenglykol mit langkettigen Säuren, besonders die Tallölester; (f) Polyethylenglykolether von Alkylphenolen; (g) Polyethylenglykolether langkettiger Alkohole und Mercaptane; und (h) Fettsäurediethanolamide. Da die oberflächenaktiven Mittel auf mehr als einer Art und Weise eingeteilt werden können, überlappen sich mehrere Klassen von oberflächenaktiven Mitteln, die in diesem Abschnitt angegeben wurden, mit vorher beschriebenen Klassen von oberflächenaktiven Mitteln.

[0127] Es gibt mehrere Öl-emulgierende Mittel, die speziell für biologische Situationen konstruiert und in diesen allgemein verwendet werden. Beispielsweise wird eine Anzahl biologischer Detergenzen (oberflächenaktive Mittel) von Sigma Chemical Company auf Seite 310-316 ihres Katalogs biochemischer und organischer Verbindungen von 1987 aufgeführt. Derartige oberflächenaktive Mittel werden in vier Grundtypen eingeteilt: anionische, kationische, zwitterionische und nicht-ionische. Beispiele anionischer Detergenzen schließen Alginäure, Caprylsäure, Cholsäure, 1-Decansulfonsäure, Deoxycholsäure, 1-Dodecansulfonsäure, N-Lauroylsarcosin und Taurocholsäure und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Kationische Detergenzen schließen Cetrimid (Hexadecyltrimethylammoniumbromid – CTAB), Benzalkoniumchlorid, Dimethyldodecylammonium-(DDA)-bromid, DOTAP, Dodecyltrimethylammoniumbromid, Benzylidimethylhexadecylammoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid und 4-Picolindodecylsulfat und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Beispiele zwitterionischer Detergenzen schließen 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (allgemein als CHAPS abgekürzt), 3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat (allgemein als CHAPSO abgekürzt), N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat und Lyso- α -phosphatidylcholin und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Beispiele nicht-ionischer Detergenzen schließen Decanoyl-N-methylglucamid, Diethylenglycolmonopentylether, n-Dodecyl- β -D-glucopyranosid, Ethylenoxidkondensate von Fettalkoholen (z.B. unter dem Handelsnamen Lubrol verkauft), Polyoxyethylenether von Fettsäuren (besonders C_{12} - C_{20} -Fettsäuren), Polyoxyethylensorbitanfettsäureether (z.B. unter dem Handelsnamen Tween verkauft) und Sorbitanfettsäureether (z.B. unter dem Handelsnamen Span verkauft) und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Die mögliche Komponente der Hilfsmittelzusammensetzungen, die zu einer positiv geladenen Emulsion führt, kann zum Beispiel ein beliebiges der vorstehend beschriebenen kationischen Detergenzen sein. In einer anderen Ausführungsform können die vorstehend beschriebenen kationischen Reagenzien zusammen mit einer beliebigen der vorstehend beschriebenen Ölträpfchenemulsionen verwendet werden, um die Emulsion positiv zu laden.

[0128] Eine besonders nützliche Gruppe von oberflächenaktiven Mitteln sind die nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittel auf Sorbitanbasis. Diese oberflächenaktiven Mittel werden durch Dehydratisierung von Sorbit hergestellt, wobei sich 1,4-Sorbitan ergibt, das dann mit einem oder mehreren Äquivalenten einer Fettsäure umgesetzt wird. Die mit Fettsäure substituierte Einheit kann mit Ethylenoxid weiter umgesetzt werden, wobei sich eine zweite Gruppe von oberflächenaktiven Mitteln ergibt.

[0129] Die mit Fettsäure substituierten oberflächenaktiven Mittel aus Sorbitan werden durch Umsetzen von 1,4-Sorbitan mit einer Fettsäure, wie Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure oder einer ähnlichen langkettigen Fettsäure, hergestellt, wobei sich 1,4-Sorbitanmonoester, 1,4-Sorbitansesquiester oder 1,4-Sorbitantriester ergibt. Die allgemein üblichen Namen für diese oberflächenaktiven Mittel schließen zum Beispiel Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonopalmitat, Sorbitanmonostearat, Sorbitanmonooleat, Sorbitansesquioleat und Sorbitantrioleat ein. Diese oberflächenaktiven Mittel sind unter dem Namen SPAN® oder ARLACEL®, in der Regel mit einer Buchstaben- oder Zahlenbezeichnung, die zwischen den verschiedenen mono-, di- und triestersubstituierten Sorbitanen unterscheidet, im Handel erhältlich.

[0130] Die oberflächenaktiven Mittel SPAN® und ARLACEL® sind hydrophil und im Allgemeinen in Öl löslich oder dispergierbar. Sie sind auch in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich. In Wasser sind sie im Allgemeinen unlöslich, jedoch dispergierbar. Im Allgemeinen weisen diese oberflächenaktiven Mittel eine Zahl des hydrophilen-lipophilen Gleichgewichts (HLB) zwischen 1,8 und 8,6 auf. Derartige oberflächenaktive Mittel können durch Mittel, die in dem Fachgebiet bekannt sind, leicht hergestellt werden oder sind, zum Beispiel von ICI America's Inc., Wilmington, DE, unter dem eingetragenen Warenzeichen ATLAS® im Handel erhältlich.

[0131] Eine verwandte Gruppe von oberflächenaktiven Mitteln umfasst Polyoxyethylensorbitanmonoester und Polyoxyethylensorbitantriester. Diese Materialien werden durch Zugabe von Ethylenoxid zu einem 1,4-Sorbitanmonoester or -triester hergestellt. Die Zugabe von Polyoxyethylen wandelt das lipophile oberflächenaktive Mittel aus Sorbitanmono- oder -triester in ein hydrophiles oberflächenaktives Mittel um, das im Allgemeinen öllöslich, in Wasser dispergierbar und bis zu verschiedenen Graden in organischen Flüssigkeiten löslich ist.

[0132] Diese Materialien, die unter dem Warenzeichen TWEEN® im Handel erhältlich sind, sind zur Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen und -Dispersionen und zur Löslichmachung von Ölen und um wasserfreie Salben wasserlöslich oder abwaschbar zu machen, verwendbar. Die oberflächenaktiven Mittel TWEEN® können mit oberflächenaktiven Mitteln aus einem verwandten Sorbitanmonoester oder -triester kombiniert werden, um die Emulsionsstabilität zu fördern. Die oberflächenaktiven Mittel TWEEN® weisen im Allgemeinen einen zwischen 9,6 und 16,7 fallenden HLB-Wert auf.

[0133] Eine dritte Gruppe von nicht-ionischen oberflächenaktiven Mitteln, die allein oder in Kombination mit den oberflächenaktiven Mitteln SPAN®, ARLACEL® und TWEEN® verwendet werden können, sind die durch die Reaktion von Ethylenoxid mit einer langkettigen Fettsäure hergestellten Polyoxyethylensettsäuren. Das am häufigsten erhältliche oberflächenaktive Mittel dieses Typs wird unter dem Namen MYRJ® verkauft und ist ein Polyoxyethylenderivat von Stearinsäure. Die oberflächenaktiven Mittel MYRJ® sind hydrophil und wie die oberflächenaktiven Mittel TWEEN® in Wasser löslich oder dispergierbar. Die oberflächenaktiven Mittel MYRJ® können zur Verwendung bei der Erzeugung von Emulsionen mit den oberflächenaktiven Mitteln TWEEN® oder mit Gemischen aus den oberflächenaktiven Mitteln TWEEN®/SPAN® oder ARLACEL® gemischt werden. Die oberflächenaktiven Mittel MYRJ® können durch in dem Fachgebiet bekannte Verfahren hergestellt werden oder sind von ICI America's Inc. im Handel erhältlich.

[0134] Eine vierte Gruppe von nicht-ionischen oberflächenaktiven Mitteln auf Polyoxyethylenbasis sind die Polyoxyethylensettsäureether, die von Lauryl-, Acetyl-, Stearyl- und Oleylalkoholen abgeleitet sind. Diese Materialien werden durch die Zugabe von Ethylenoxid zu einem Fettalkohol wie vorstehend hergestellt. Der Handelsname für diese oberflächenaktiven Mittel ist BRIJ®. Die oberflächenaktiven Mittel BRIJ® können, abhängig von der Größe der Polyoxyethylen-Einheit in dem oberflächenaktiven Mittel, hydrophil oder lipophil sein. Obwohl die Herstellung dieser Verbindungen durch das Fachgebiet verfügbar ist, sind sie auch von derartige kommerzielle Quellen, wie ICI America's Inc., leicht erhältlich.

[0135] Andere nicht ionische oberflächenaktive Mittel, die möglicherweise bei der Durchführung dieser Erfindung verwendet werden können, sind zum Beispiel: Polyoxyethylen, Fettsäurepolyolester, Polyoxyethylenether, Polyoxypropylenglycidether, Bienenwachsderivate, die Polyoxyethylen, ein Polyoxyethylenlanolinlderivat, Polyoxyethylenglycidether, Glycerinfettsäureester oder einen anderen Polyoxyethylensäurealkohol enthalten, oder Etherderivate langkettiger Fettsäuren mit 12–22 Kohlenstoffatomen.

[0136] Als das Hilfsmittel und die immunogenen Zusammensetzungen dieser Erfindung sind Mehrphasensysteme beabsichtigt, und es wird bevorzugt ein emulsionsbildendes, nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, das einen HLB-Wert im Bereich von etwa 7 bis etwa 16 aufweist, ausgewählt. Dieser Wert kann durch die Verwendung eines einzelnen nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittels, wie eines oberflächenaktiven Mittels TWEEN®, erhalten werden, oder kann durch die Verwendung einer Mischung aus oberflächenaktiven Mitteln, wie mit einem oberflächenaktiven Mittel auf der Basis von Mono-, Di- oder Triestern; einer Sorbitanesterpolyoxyethylenfettsäure; einem Sorbitanester in Kombination mit einem von Polyoxyethylenlanolin abgeleiteten oberflächenaktiven Mittel; einem oberflächenaktiven Mittel aus einem Sorbitanester in Kombination mit einem oberflächenaktiven Mittel aus einem Polyoxyethylenfettether mit einem hohen HLB; oder einem oberflächenaktiven Mittel aus einem Polyethylenfettether oder einer Polyoxyethylensorbitanfettsäure, erreicht werden.

[0137] Es ist stärker bevorzugt, ein einzelnes nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel und insbesondere ein oberflächenaktives Mittel TWEEN® als das emulsionsstabilisierende, nichtionische oberflächenaktive Mittel bei der Durchführung dieser Erfindung zu verwenden. Das als TWEEN® 80 bezeichnete oberflächenaktive Mittel, anderweitig als Polysorbat 80 für Polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat bekannt, ist das am meisten bevorzugte der vorstehenden oberflächenaktiven Mittel.

[0138] Eine ausreichende Verringerung der Tröpfchengröße kann in der Regel dadurch erzielt werden, dass das oberflächenaktive Mittel in einer Menge von 0,02 Gew.-% bis 2,5 Gew.-% vorliegt. Eine Menge von 0,05 % bis 1 % ist bevorzugt, wobei 0,01 bis 0,5 % besonders bevorzugt sind.

[0139] Die Art und Weise, auf welche die Tröpfchengröße der Erfindung erreicht wird, ist für die Durchführung der vorliegenden Erfindung nicht wichtig. Eine Art und Weise, auf welche die Submikronöltröpfchen erhalten werden können, ist durch die Verwendung eines handelsüblichen Emulgators, wie das Modell Nr. 110Y, das von Microfluidics, Newton, MA, erhältlich ist. Beispiele anderer handelsüblicher Emulgatoren schließen das Modell 30CD von Gaulin (Gaulin Inc., Everett, MA) und Raininie Minilab Typ 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, WI) ein. Diese Emulgatoren werden durch das Prinzip hoher Scherkräfte betrieben, die entwickelt wurden, um Flüssigkeiten unter hohem Druck durch kleine Öffnungen zu zwingen. Wenn das Modell 110Y bei 5000–30000 psi betrieben wird, werden Öltröpfchen mit Durchmessern von 100–750 nm bereitgestellt.

[0140] Die Größe der Öltröpfchen kann durch eine Änderung des Verhältnisses von Detergens zu Öl (eine Erhöhung des Verhältnisses verringert die Tröpfchengröße), des Betriebsdrucks (eine Erhöhung des Betriebsdrucks verringert die Tröpfchengröße), der Temperatur (eine Erhöhung der Temperatur verringert die Tröpfchengröße) und das Hinzufügen eines amphipatischen, immunstimulierenden Mittels (das Hinzufügen derartiger Mittel verringert die Tröpfchengröße) variiert werden. Die tatsächliche Tröpfchengröße variiert mit dem speziellen Detergens, Öl und immunstimulierenden Mittel (falls vorhanden) und mit den speziellen ausgewählten Betriebsbedingungen. Die Tröpfchengröße kann unter Verwendung von Größenbestimmungsgeräten, wie dem von Coulter Corporation hergestellten handelsüblichen Submikronpartikelanalysator (Modell N4MD), überprüft werden, und die Parameter können unter Verwendung der vorstehend angegebenen Richtlinien variiert werden, bis im Wesentlichen alle Tröpfchen einen Durchmesser von weniger als 1 µm, bevorzugt einen Durchmesser von weniger als 0,8 µm und am meisten bevorzugt einen Durchmesser von weniger als 0,5 µm aufweisen. Im Wesentlichen alle bedeutet mindestens etwa 80 % (bezogen auf die Zahl), bevorzugt mindestens etwa 90 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 95 % und am meisten bevorzugt mindestens etwa 98 %. Die Partikelgrößenverteilung entspricht typischerweise der Gauß-Kurve, so dass der mittlere Durchmesser kleiner als die angegebenen Grenzen ist.

[0141] Die vorliegende Erfindung kann bevorzugt durch die Herstellung einer Ölemulsion in Abwesenheit anderer Komponenten, von denen früher im Stand der Technik berichtet wurde, dass sie mit Submikronemulsioen für eine zufriedenstellende Immunogenität verwendet wurden, nämlich Polyoxypropylen-Polyoxyethylen-Blockpolymeren, wie denen für die Verwendung mit Hilfsmitteln in den U.S.-Patenten Nummer 4,772,466 und 4,770,874 und in der europäischen Patentanmeldung 0 315 153 A2 beschriebenen, durchgeführt werden.

[0142] Eine Mikroemulsionszusammensetzung der Erfindung kann ein metabolisierbares Öl in Wasser und einen anderen Emulgator als ein POP-POE-Copolymer umfassen. Der Emulgator muss keine spezielle immunstimulierende Aktivität aufweisen, da die Ölzusammensetzung selbst als Hilfsmittel wirken kann, wenn die Öltröpfchen im Submikronbereich vorliegen. Eine verstärkte immunstimulierende Aktivität kann jedoch bereitgestellt werden, indem ein beliebiges der bekannten immunstimulierenden Mittel in die Zusammensetzung eingebracht wird. Diese immunstimulierenden Mittel können entweder von dem Emulgator und dem Öl getrennt sein oder das immunstimulierende Mittel und der Emulgator können ein und dasselbe Molekül sein. Beispiele

der erstgenannten Situation schließen metabolisierbare Öle, die mit abgetöteten Mycobakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis*, und subzellulären Komponenten davon gemischt sind, ein. Weitere immunstimulierende Substanzen schließen die Muramylpeptide, die Komponenten der Zellwände derartiger Bakterien sind, und Derivate davon ein. Beispiele der Kombination aus Emulgator/immunstimulierendem Mittel sind die lipophilen Muramylpeptide, die in Sanchez-Pescador et al., *J. Immunol.*, 1988, 141, 1720–1727, beschrieben sind, deren Offenbarung in ihrer Gesamtheit hier durch Bezugnahme aufgenommen ist. Diese Materialien umfassen das basische N-Acetyl muramylpeptid (eine hydrophile Einheit), das als immunstimulierende Gruppe wirkt, schließen jedoch auch eine lipophile Einheit ein, die oberflächenaktive Eigenschaften für die resultierende Verbindung bereitstellt. Derartige Verbindungen sowie andere Arten von amphipatischen, immunstimulierenden Substanzen wirken sowohl als immunstimulierende Mittel als auch Emulgatoren und sind bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Ferner ist es auch möglich, die vorliegende Erfindung unter Verwendung einer amphipatischen, immunstimulierenden Substanz in Kombination mit einer zweiten immunstimulierenden Substanz, die nicht amphipatisch ist, durchzuführen. Ein Beispiel ist die Verwendung eines lipophilen Muramylpeptids in Kombination mit einem im Wesentlichen unsubstituierten (d.h. im Wesentlichen hydrophilen) Muramylpeptid.

[0143] Eine bevorzugte Ölropfchenemulsion ist MF59. MF59 kann gemäß den zum Beispiel in Ott et al., *Vaccine Design: The Subunit And Adjuvant Approach*, 1995, M. F. Powell und M. J. Newman, Hrsg., Plenum Press, New York, S. 277–296; Singh et al., *Vaccine*, 1998, 16, 1822–1827; Ott et al., *Vaccine*, 1995, 13, 1557–1562; und Valensi et al., *J. Immunol.*, 1994, 153, 4029–39, beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

[0144] Andere Ölropfchenemulsionen schließen zum Beispiel SAF, das 10 % Squalan, 0,4 % Tween 80,5 % mit Pluronic blockiertes Polymer L121 und thr-MDP enthält und entweder zu einer Submikronemulsion mikrofluidifiziert oder zur Erzeugung einer Emulsion mit einer größeren Partikelgröße verwirbelt wurde, und das Ribi®-Hilfsmittelsystem (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), das 2 % Squalen, 0,2 % Tween 80 und eine oder mehrere Bakterienzellwandkomponenten, bestehend aus Monophosphoryllipid A (MPL), Trehalosedimycolat (TDM) und Zellwandskelett (CWS), bevorzugt MPL + CWS (Detox™), enthält, ein (hinsichtlich einer weiteren Diskussion hier zur Verwendung geeigneter Öl-in-Wasser-Submikronemulsionen siehe Patentanmeldung Nr. 09/015,736 mit gemeinsamem Rechtsinhaber, eingereicht am 29. Januar 1998).

[0145] Nach der Herstellung der Mikroemulsion der Erfindung können Makromoleküle daran adsorbiert werden, um die Hilfsmittelwirkung der Mikroemulsion zu verstärken. Die weitere Komponente der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ist bevorzugt ein Oligonukleotid, das mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv umfasst. Der hier verwendete Ausdruck "CpG-Strukturleitmotiv" bezieht sich auf einen Dinucleotidteil eines Oligonukleotids, der ein Cytosinnukleotid, gefolgt von einem Guanosinnukleotid umfasst. Derartige Oligonukleotide können unter Verwendung einer üblichen Oligonukleotidsynthese, die einem Fachmann allgemein bekannt ist, hergestellt werden. Die Oligonukleotide der Erfindung umfassen bevorzugt ein modifiziertes Gerüst, wie Phosphorothioat oder eine Peptidnukleinsäure, um dem Oligonukleotid Nucleaseresistenz zu verleihen. Modifizierte Gerüste sind Fachleuten allgemein bekannt. Bevorzugte Peptidnukleinsäuren sind in den U.S.-Patenten Nummer 5,821,060, 5,789,573, 5,736,392 und 5,721,102, in dem japanischen Patent Nr. 10231290, in dem europäischen Patent Nr. 839,828 und in den PCT-Veröffentlichungen Nummer WO 98/42735, WO 98/42876, WO 98/36098, WO 98/27105, WO 98/20162, WO 98/16550, WO 98/15648, WO 98/04571, WO 97/41150, WO 97/39024 und WO 97/38013 detailliert beschrieben.

[0146] Das Oligonukleotid umfasst bevorzugt zwischen etwa 6 und etwa 100 Nukleotiden, stärker bevorzugt zwischen etwa 8 und etwa 50 Nukleotiden und am meisten bevorzugt zwischen etwa 10 und etwa 40 Nukleotiden. Ferner können die Oligonukleotide der Erfindung Substitutionen der Zuckereinheiten und der stickstoffhaltigen Baseneinheiten umfassen. Bevorzugte Oligonukleotide sind zum Beispiel in Krieg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 12631–12636, Klinman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 2879–2883, Weiner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 10833–10837, Chu et al., *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623–1631, Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15553–15558, Ballas et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840–1845, Cowdery et al., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570–4575, Halpern et al., *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72–78, Yamamoto et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866–873, Stacey et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116–2122, Messina et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759–1764, Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918–4925, Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394–5402, Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755–4761, Roman et al., *Nat. Med.*, 1997, 3, 849–854, Davis et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 870–876, Lipford et al., *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340–2344, Moldoveanu et al., *Vaccine*, 1988, 16, 1216–1224, Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5899–5906, in der PCT-Veröffentlichung WO 96/02555, PCT-Veröffentlichung WO 98/16247, PCT-Veröffentlichung WO 98/18810, PCT-Veröffentlichung WO 98/40100, PCT-Veröffentlichung WO 98/55495, PCT-Veröffentlichung WO 98/37919 und PCT-Veröffentlichung WO 98/52581 offenbart. Es ist selbstverständlich, dass

die Oligonucleotide der Erfindung mindestens ein CpG-Strukturleitmotiv umfassen, jedoch eine Vielzahl von CpG-Strukturleitmotiven enthalten können.

[0147] Bevorzugte Oligonucleotide umfassen Nucleotidsequenzen, wie zum Beispiel tccatgacgttccgtacgtt (SEQ ID Nr.: 1), ataatcgacgtcaagcaag (SEQ ID Nr.: 2), ggggtcaacgtgagggggg (SEQ ID Nr.: 3), tctcccgacgtgcgcat (SEQ ID Nr.: 4), gagaacgctcgaccctcgat (SEQ ID Nr.: 5), tccatgtcgccctgatgct (SEQ ID Nr.: 6), tccatgacgttccgtatgct (SEQ ID Nr.: 7), gctagacgttagcgt (SEQ ID Nr.: 8), atcgactctcgagcgcttc (SEQ ID Nr.: 9), gaacctccatgttcccg (SEQ ID Nr.: 10), gctagatgttagcgt (SEQ ID Nr.: 11), tcaacgtt (SEQ ID Nr.: 12), gcaacgtt (SEQ ID Nr.: 13), tcgacgctc (SEQ ID Nr.: 14), tcagcgct (SEQ ID Nr.: 15), tcaacgct (SEQ ID Nr.: 16), tcatcgat (SEQ ID Nr.: 17), tcttcgaa (SEQ ID Nr.: 18), tgactgtgaacgttcgagatga (SEQ ID Nr.: 19), tgactgtgaacgttagcgatga (SEQ ID Nr.: 20), tgactgtgaacgttagcgaga (SEQ ID Nr.: 21), gtttgcgaacgttgc (SEQ ID Nr.: 22), atggcaacaacgttgcgcaac (SEQ ID Nr.: 23), cattggaaaacgttccgggg (SEQ ID Nr.: 24), ccccaagaacgttccaatg (SEQ ID Nr.: 25), atggacgtcaat (SEQ ID Nr.: 26), cttccattgacgtcaatgggt (SEQ ID Nr.: 27) und tccatacgccgtacgtt (SEQ ID Nr.: 28). In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Oligonucleotid ein CPG-Strukturleitmotiv, das von zwei Purinen an der 5'-Seite des Motivs und zwei Pyrimidinen an der 3'-Seite des Motivs flankiert ist. Es ist jedoch selbstverständlich, dass ein beliebiges Oligonucleotid, umfassend ein CPG-Strukturleitmotiv, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, solange das Oligonucleotid eine Verstärkung der Th1-Lymphozytenstimulation auslöst, wenn es mit den hier beschriebenen Öltröpfchenemulsionen vereinigt wird.

[0148] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Makromolekül immunogene DNA oder immunogenes Protein, das an der Mikroemulsion adsorbiert ist. Eine derartige Adsorption erzeugt eine Mikroemulsion mit einer starken Hilfsmittelwirkung.

[0149] Die vorliegende Erfindung betrifft auch immunogene Zusammensetzungen, umfassend die vorstehend beschriebenen Mikroemulsionen mit adsorbierten antigenen und/oder immunogenen Molekülen. Die Hilfsmittelzusammensetzungen werden im Allgemeinen aus den vorstehend beschriebenen Bestandteilen hergestellt, bevor das Hilfsmittel mit der antigenen Substanz, die in der immunogenen Zusammensetzung verwendet wird, vereinigt wird. Das Wort Antigen oder antigene Substanz bezieht sich auf eine beliebige Substanz, einschließlich eines Proteins oder eines Protein-Polysaccharids, Protein-Lipopolysaccharids, Polysaccharids, Lipopolysaccharids, einer viralen Untereinheit, eines ganzen Virus oder ganzer Bakterien, die, wenn sie für den Blutstrom eines Tieres fremd ist, nach dem Zugang zum Gewebe eines derartigen Tieres die Bildung spezifischer Antikörper stimuliert und in vivo oder in vitro spezifisch mit einem homologen Antikörper reagiert. Außerdem stimuliert sie die Proliferation von T-Lymphozyten, bevorzugt Th1-Lymphozyten, mit Rezeptoren für das Antigen und kann mit den Lymphozyten reagieren, um die als zellvermittelte Immunität bezeichnete Reihe von Antworten einzuleiten.

[0150] Ein Hapten liegt innerhalb des Umfangs dieser Definition eines Antigens. Ein Hapten ist der Teil eines antigenen Moleküls oder antigenen Komplexes, der seine immunologische Spezifität bestimmt. Im Allgemeinen ist ein Hapten ein Peptid oder Polysaccharid in natürlich vorkommenden Antigenen. In künstlichen Antigenen kann es eine Substanz mit niedrigem Molekulargewicht, wie ein Arsanilsäurederivat, sein. Ein Hapten reagiert in vivo oder in vitro spezifisch mit homologen Antikörpern oder T-Lymphozyten. Alternative Stichworte sind antigena Determinante, antigena Strukturgruppierung und Haptengruppierung.

[0151] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist die antigena Substanz von einem Virus, wie zum Beispiel dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Hepatitis-B-Virus (HBV), dem Hepatitis-C-Virus (HCV), dem Herpes-simplex-Virus (HSV), dem Zytomegalie-Virus (CMV), dem Influenza-Virus (Grippe) und dem Tollwut-Virus, abgeleitet. Die antigena Substanz ist bevorzugt aus dem HSV-Glykoprotein gD, HIV-Glycoprotein gp120 und HIV p55 gag ausgewählt. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist die antigena Substanz von einem Bakterium, wie Helicobacter pylori, Haemophilus influenza, Cholera, Diphtheria, Tetanus, Neisseria meningitidis und Pertussis, abgeleitet. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung stammt die antigena Substanz aus einem Parasiten, wie zum Beispiel einem Malariaparasiten. In anderen bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das Antigen an der Oberfläche eines Mikropartikels der vorliegenden Erfindung adsorbiert.

[0152] Antigene können durch in dem Fachgebiet bekannte Verfahren hergestellt werden oder können von kommerziellen Quellen gekauft werden. Antigene innerhalb des Umfangs dieser Erfindung schließen vollständig inaktivierte Viruspartikel, isolierte Virusproteine und Proteinuntereinheiten, ganze Zellen und Bakterien, Zellmembran- und Zellwandproteine und dergleichen ein. Einige bevorzugte Antigene sind nachstehend beschrieben.

[0153] Das Herpes-simplex-Virus (HSV) rgD2 ist ein rekombinantes Protein, das in genetisch veränderten Ei-erstockzellen Chinesischer Hamster erzeugt wurde. Dieses Protein weist die normale Ankerregion verkürzt auf, was zu einem glykosylierten Protein führt, das in Gewebekulturmedium sezerniert wird. Das gD2 kann in dem CHO-Medium bis zu einer Reinheit von mehr als 90 % gereinigt werden. Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) env-2-3 ist eine rekombinante Form des HIV-Hüllenproteins, das in genetisch verändertem *Saccharomyces cerevisiae* erzeugt wurde. Dieses Protein stellt die gesamte Proteinregion von HIV gp120 dar, ist jedoch, wie aus Hefe gereinigt, nicht-glykosyliert und denaturiert. HIV gp120 ist eine vollständig glykosylierte, sezernierte Form von gp120, das in CHO-Zellen auf eine ähnliche Art und Weise wie das vorstehende gD2 erzeugt wurde. Weitere HSV-Antigene, die zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignet sind, sind in den PCT-Veröffentlichungen WO 85/04587 und WO 88/02634 beschrieben. Gemische aus gB- und gD-Antigenen, die verkürzte Oberflächenantigene sind, denen die Haftregionen fehlen, sind besonders bevorzugt.

[0154] Zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignete Influenzaantigene sind im Handel erhältlich. Antigene, die in den folgenden Beispielen verwendet werden können, schließen FLUOGEN® (von Parke-Davis hergestellt), Duphar (von Duphar B.V. hergestellt) und die Influenza-Impfstoffcharge A41 (von Instituto Vaccinogeno Pozzi hergestellt) ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0155] Zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignete Malariaantigene sind in der U.S.-Patentanmeldung Seriennr. 336,288, eingereicht am 11. April 1989, und in dem U.S.-Patent Nr. 4,826,957 beschrieben.

[0156] Zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignete weitere HIV-Antigene sind in der U.S.-Anmeldung Seriennr. 490,858, eingereicht am 9. März 1990, und in der veröffentlichten europäischen Anmeldung Nummer 181150 (14. Mai 1986) beschrieben.

[0157] Zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignete Cytomegalievirusantigene sind in dem U.S.-Patent Nr. 4,689,225, in der U.S.-Anmeldung Seriennummer 367,363, eingereicht am 16. Juni 1989, und in der PCT-Veröffentlichung WO 89/07143 beschrieben.

[0158] Zur Verwendung in immunogenen Zusammensetzungen geeignete Hepatitis-C-Antigene sind in PCT/US 88/04125, in der veröffentlichten europäischen Anmeldung Nummer 318216 (31. Mai 1989), in der veröffentlichten japanischen Anmeldung Nummer 1-500565, eingereicht am 18. November 1988, in der kanadischen Anmeldung 583,561 und in EPO 388,232 beschrieben. Ein unterschiedlicher Satz von HCV-Antigenen ist in der europäischen Patentanmeldung 90/302866.0, eingereicht am 16. März 1990, und in der U.S.-Anmeldung Seriennummer 456,637, eingereicht am 21. Dezember 1989, und in PCT/US 90/01348 beschrieben.

[0159] Immunogene Zusammensetzungen der Erfindung können zur Immunisierung von Vögeln und Säugern gegen Krankheiten und Infektionen, einschließlich ohne Einschränkung Cholera, Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Grippe, Masern, Hirnhautentzündung, Mumps, Pest, Kinderlähmung, Tollwut, amerikanisches Zeckenbissfieber, Röteln, Pocken, Fleckfieber, Typhus, Katzen-Leukämie-Virus und Gelbfieber, verwendet werden.

[0160] Die Zusammensetzungen einer immunogenen Zusammensetzung der Erfindung verwenden eine wirksame Menge eines Antigens. Das heißt, eine Menge eines Antigens ist eingeschlossen, das in Kombination mit dem Hilfsmittel, den Patienten zur Erzeugung einer spezifischen und ausreichenden Immunantwort, bevorzugt einer Th1-Lymphozytenantwort, veranlasst, um dem Patienten Schutz vor der nachfolgenden Ansteckung mit einem Virus, Bakterium, Pilz, Mycoplasma oder Parasiten, gegen den es immunisiert ist, zu verleihen.

[0161] Keine Bestimmung einer Einzeldosis kann zugeordnet werden, die eine spezielle Anleitung für jedes Antigen, das in dieser Erfindung verwendet werden kann, bereitstellt. Die wirksame Menge eines Antigens ist eine Funktion seiner innewohnenden Aktivität und Reinheit und wird durch Fachleute mittels routinemäßigem Experimentieren empirisch bestimmt. Es ist beabsichtigt, dass die Hilfsmittelzusammensetzungen dieser Erfindung in Verbindung mit immunogenen Zusammensetzungen aus ganzen Zellen oder viralen, immunogenen Zusammensetzungen sowie mit gereinigten Antigenen oder immunogenen Zusammensetzungen aus Proteinuntereinheiten oder Peptiden, die durch Verfahren oder eine Synthese mit rekombinanter DNA hergestellt werden, verwendet werden können. Da die Hilfsmittelzusammensetzungen der Erfindung stabil sind, können das Antigen und die Emulsion durch einfaches Schütteln gemischt werden. Andere Verfahren, wie das schnelle Hindurchleiten eines Gemisches aus dem Hilfsmittel und der Lösung oder Suspension des Antigens durch eine

schmale Öffnung (wie eine Nadel zur subkutanen Injektion) stellt leicht eine verwendbare immunogene Zusammensetzung bereit.

[0162] Die immunogenen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen etwa 1 Nanogramm bis etwa 1000 Mikrogramm Nucleinsäure, bevorzugt DNA, wie zum Beispiel CpG-Oligonucleotide. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die immunogenen Zusammensetzungen etwa 10 Nanogramm bis etwa 800 Mikrogramm Nucleinsäure. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die immunogenen Zusammensetzungen etwa 0,1 bis etwa 500 Mikrogramm Nucleinsäure. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die immunogenen Zusammensetzungen etwa 1 bis etwa 350 Mikrogramm Nucleinsäure. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die immunogenen Zusammensetzungen etwa 25 bis etwa 250 Mikrogramm Nucleinsäure. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die immunogenen Zusammensetzungen etwa 100 Mikrogramm Nucleinsäure. Ein Fachmann kann eine immunogene Zusammensetzung, umfassend eine beliebige gewünschte Menge an Nucleinsäure, leicht formulieren. Die immunogenen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung werden steril und pyrogenfrei bereitgestellt. Die immunogenen Zusammensetzungen können günstigerweise in einer Einheitsdosierungsform verabreicht werden und durch ein beliebiges der Verfahren, die in dem pharmazeutischen Fachgebiet allgemein bekannt sind, zum Beispiel wie in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) beschrieben, hergestellt werden.

[0163] Die in dieser Erfindung beschriebene Zusammensetzung kann bei Verfahren zur Stimulierung einer Immunantwort in einem Wirtstier durch Verabreichung der Zusammensetzung an das Tier in einer Menge, welche die Auslösung einer Immunantwort bewirkt, verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch. Bevorzugte Verabreichungswege schließen intramuskulär, intraperitoneal, intradermal, subkutan, intravenös, intraarteriell, intraokular und oral sowie transdermal oder durch Inhalation oder ein Suppositorium ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Die am meisten bevorzugten Verabreichungswege schließen eine intramuskuläre, intraperitoneale, intradermale und subkutane Injektion ein. Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird die immunogene Zusammensetzung einem Wirtstier unter Verwendung einer nadelfreien Injektionsvorrichtung verabreicht, die allgemein bekannt und erhältlich ist. Ein Fachmann kann nach den Angaben hier nadelfreie Injektionsvorrichtungen verwenden, um immunogene Zusammensetzungen an die Zellen eines Individuums abzugeben.

[0164] Die Zusammensetzung dieser Erfindung kann bei Verfahren zur Immunisierung eines Wirtstiers gegen eine virale, bakterielle oder parasitäre Infektion durch die Verabreichung der Zusammensetzung an das Tier in einer Menge, welche die Auslösung einer Schutzantwort bewirkt, verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch. Bevorzugte Verabreichungswege sind vorstehend beschrieben. Während die prophylaktische oder therapeutische Behandlung des Wirtstiers gegen einen beliebigen Krankheitserreger gerichtet sein kann, schließen bevorzugte Krankheitserreger die vorstehend beschriebenen viralen, bakteriellen und parasitären Krankheitserreger ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0165] Die Zusammensetzung dieser Erfindung kann bei Verfahren zur Verstärkung einer Th1-Immunantwort in einem Wirtstier durch die Verabreichung der Zusammensetzung an das Tier in einer Menge, welche die Auslösung einer Th1-Immunantwort bewirkt, verwendet werden. Das Wirtstier ist bevorzugt ein Säuger und stärker bevorzugt ein Mensch. Bevorzugte Verabreichungswege sind vorstehend beschrieben. Einem Fachmann sind Th1-Lymphozyten und Antworten und Messungen davon ohne weiteres geläufig.

[0166] Mikropartikel oder Mikroemulsionen mit adsorbierten Antigenen können zur Auslösung einer Immunantwort allein oder in Kombination miteinander verwendet werden. Das heißt, die Erfindung umfasst Mikropartikel mit einem adsorbierten Antigen, Mikroemulsionen mit einem adsorbierten Antigen oder immunstimulierenden Molekül und die Kombination aus Mikropartikeln mit einem adsorbierten Antigen und Mikroemulsionen mit einem adsorbierten Antigen oder immunstimulierenden Molekül.

[0167] Wie durch die folgenden Beispiele gezeigt, lösen die Mikropartikel mit adsorbierten Makromolekülen der vorliegenden Erfindung starke Immunantworten aus. Ferner lösen die Ölropfchenemulsionen der vorliegenden Erfindung ebenfalls starke Immunantworten aus. Die Kombination aus den Mikropartikeln mit adsorbierten Makromolekülen der vorliegenden Erfindung und der Ölropfchenemulsion als Hilfsmittel der vorliegenden Erfindung ist daher ein starkes Werkzeug zur Auslösung von Immunantworten. Die Erfindung wird ferner durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht, welche die Erfindung erläutern sollen. Die vorstehenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen und keineswegs einschränken.

C. Experimentelles

[0168] Nachstehend sind Beispiele spezieller Ausführungsformen zur Durchführung der vorliegenden Erfindung aufgeführt. Die Beispiele werden nur für veranschaulichende Zwecke angeboten und sollen den Umfang der vorliegenden Erfindung keineswegs einschränken.

[0169] Wir bemühten uns, eine Genauigkeit in Bezug auf die verwendeten Zahlen (z.B. Mengen, Temperaturen etc.) sicherzustellen, es sollten jedoch natürlich ein gewisser Versuchsfehler und eine gewisse Versuchsabweichung berücksichtigt werden.

Beispiel 1

Herstellung von reinen Mikropartikeln unter Verwendung von PVA als Emulsionsstabilisator

[0170] Reine Mikropartikel (z.B. ohne adsorbierte oder eingeschlossene Makromoleküle) wurden unter Verwendung von Polyvinylalkohol (PVA) wie folgt hergestellt. Verwendete Lösungen:

- (1) 6 % RG 504 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dichlormethan.
- (2) 10 % Polyvinylalkohol (PVA) (ICN) in Wasser.

[0171] Im besonderen wurden die Mikropartikel durch Vereinigen von 10 ml Polymerlösung mit 1,0 ml destilliertem Wasser und 3-minütiges Homogenisieren unter Verwendung eines Tischhomogenisators von Omni mit einer 10 mm Sonde mit 10000 UpM hergestellt, wobei eine Emulsion aus Wasser/Öl (w/o) gebildet wurde. Die w/o-Emulsion wurde zu 40 ml der 10 %igen PVA-Lösung gegeben und 3 Minuten homogenisiert, wobei eine Emulsion aus Wasser/Öl/Wasser (w/o/w) gebildet wurde. Man ließ die w/o/w-Emulsion zur Abdampfung des Lösungsmittels über Nacht röhren, wobei Mikropartikel gebildet wurden. Die gebildeten Mikropartikel wurden 4-mal mit Wasser unter Zentrifugation gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel wurden dann für die zukünftige Verwendung in einem Mastersizer von Malvern der Größe nach sortiert.

Beispiel 2

Herstellung von reinen Mikropartikeln unter Verwendung von CTAB

[0172] Reine Mikropartikel wurden unter Verwendung von CTAB wie folgt hergestellt. Verwendete Lösungen:

- (1) 4 % RG 504 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dimethylchlорid.
- (2) 0,5 % CTAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Wasser.

[0173] Im besonderen wurden die Mikropartikel durch Vereinigen von 12,5 ml Polymerlösung mit 1,25 ml destilliertem Wasser und 3-minütiges Homogenisieren unter Verwendung eines Tischhomogenisators von Omni mit einer 10 mm Sonde mit 10000 UpM hergestellt, wobei eine w/o-Emulsion gebildet wurde. Die w/o-Emulsion wurde zu 50 ml der 0,5 %igen CTAB-Lösung gegeben und 3 Minuten homogenisiert, wobei eine w/o/w-Emulsion gebildet wurde. Man ließ die w/o/w-Emulsion zur Abdampfung des Lösungsmittels über Nacht röhren, wobei Mikropartikel gebildet wurden. Die gebildeten Mikropartikel wurden anschließend durch eine Siebgröße von 38 µm filtriert, 4-mal mit Wasser unter Zentrifugation gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel wurden dann für die zukünftige Verwendung in einem Mastersizer von Malvern der Größe nach sortiert.

Beispiel 3

Herstellung von reinen Mikropartikeln unter Verwendung von SDS

[0174] Reine Mikropartikel wurden unter Verwendung von SDS wie folgt hergestellt. Verwendete Lösungen:

- (1) 6 % RG 504 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dimethylchlорid.
- (2) 1 % SDS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Wasser.

[0175] Im besonderen wurden die Mikropartikel durch Vereinigen von 12,5 ml Polymerlösung mit 50 ml der SDS-Lösung und 3-minütiges Homogenisieren unter Verwendung eines Tischhomogenisators von Omni mit einer 10 mm Sonde mit 10000 UpM hergestellt. Man ließ die Emulsion zur Abdampfung des Lösungsmittels über Nacht röhren. Die gebildeten Mikropartikel wurden durch eine Siebgröße von 38 µm filtriert, 4-mal mit Wasser unter Zentrifugation gewaschen und für die zukünftige Verwendung lyophilisiert. Die Mikropartikel wurden dann für die zukünftige Verwendung in einem Mastersizer von Malvern der Größe nach sortiert.

Beispiel 4

Adsorption von Protein an reinen Mikropartikeln

[0176] Protein wurde an Mikropartikeln wie folgt adsorbiert.

A. Theoretische Beladung mit 1 % und 3 % p55 gag

[0177] Um theoretische Beladungen von 1 % und 3 % zu erzielen, wurden 50 mg der wie in Beispiel 3 hergestellten, lyophilisierten, reinen SDS/PLG-Mikropartikel in ein Zentrifugenrörchen von Nalgene gegeben, und 10 ml 25 mM Boratpuffer, pH 9, mit 6 M Harnstoff, der p55-gag-Protein (Chiron Corporation, Berkeley, CA) enthielt, wurden zugegeben: (a) für eine theoretische Beladung von 1 % wurden 10 ml einer Lösung von p55 gag mit 50 µg/ml verwendet; und (b) für eine theoretische Beladung von 3 % wurden 10 ml einer Lösung von p55 gag mit 150 µg/ml verwendet. Das Gemisch wurde unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikropartikel zentrifugiert und hinsichtlich der Proteinbeladung durch Basenhydrolyse, gefolgt von einem Bicinchonintest (BCA; Pierce, Rockford, IL) analysiert, um die adsorbierte Menge zu bestimmen. Die Mikropartikel wurden zweimal mit einem Puffer aus 10 ml Borat/6 M Harnstoff und zweimal mit 30 ml Wasser gewaschen und für die zukünftige Verwendung lyophilisiert.

B. Theoretische Beladung mit 1 % HCV-Kernantigen

[0178] Um eine theoretische Beladung von 1 % zu erzielen, wurden 50 mg der lyophilisierten, reinen SDS/PLG-Mikropartikel in ein Zentrifugenrörchen von Nalgene gegeben, und 10 ml 30 mM Citratpuffer, pH 6.5, mit 6 M Harnstoff, der monomeres HCV-Kernprotein (10 ml einer HCV-Kernproteinlösung mit 50 µg/ml; Chiron Corporation, Berkeley, CA) enthielt, wurden zugegeben. Das Gemisch wurde unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikropartikel zentrifugiert und hinsichtlich der Proteinbeladung durch Basenhydrolyse, gefolgt von einem Bicinchonintest (BCA; Pierce, Rockford, IL) hinsichtlich der HCV-Konzentration analysiert, um die adsorbierte Menge zu bestimmen. Die Mikropartikel wurden zweimal mit 30 ml eines Puffers aus Citrat/6 M Harnstoff und zweimal mit 30 ml Wasser gewaschen und für die zukünftige Verwendung lyophilisiert.

Beispiel 5

Adsorptionsleistung von Mikropartikeln

[0179] Die lyophilisierten Mikropartikel mit adsorbiertem Protein aus Beispiel 4 wurden hinsichtlich des gesamten adsorbierten Proteins unter Verwendung einer Basenhydrolyse wie folgt analysiert. 10 mg der lyophilisierten, adsorbierten Partikel wurden vier Stunden in 2 ml 0,2 N NaOH mit 5 % SDS hydrolysiert, neutralisiert und 1:10 verdünnt und hinsichtlich des Proteingehalts unter Verwendung des MicroBCA-Proteintests (Pierce, Rockford, IL) analysiert. Wie in Tabelle 1 gezeigt, adsorbierten Mikropartikel mit modifizierten Oberflächen, die mit Detergenzien, wie CTAB und SDS, hergestellt wurden, beide Protein wirksamer als Mikropartikel, die unter Verwendung von PVA allein hergestellt wurden.

TABELLE 1

Typ des Mikropartikels	Protein	beabsichtigte Beladung (Gew.-%)	tatsächliche Beladung (Gew.-%)
PVA-PLG	p55gag	3%	0,38%
CTAB-PLG	p55gag	3%	1,58%
SDS-PLG	p55gag	3%	1,36%
PVA-PLG	p55gag	1%	0,18%
SDS-PLG	p55gag	0,5%	0,45%
SDS-PLG	p55gag	1%	0,72%
SDS-PLG	p55gag	1%	0,79%
PVA-PLG	HCV-Kern	4%	0,3%
SDS-PLG	HCV-Kern	1%	0,7%

Beispiel 6

A. Immunogenität von Mikropartikeln mit adsorbiertem gag

[0180] Die Mikropartikel mit adsorbiertem gag, die unter Verwendung von PVA oder SDS, wie in Beispiel 4 beschrieben, hergestellt wurden, sowie p55 gag allein ohne damit verbundene Mikropartikel (als negative Kontrolle) und Kontrollen aus gag-pol von Vaccinia (als positive Kontrolle) wurden Mäusen intramuskulär verabreicht. Die Tiere wurden am 7. und 14. Tag einer Auffrischimpfung unterzogen. Die verabreichte Gesamtdosis ist in den Tabellen 2 und 3 angegeben. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde die Milz entnommen, und die CTL-Aktivität wurde, wie in Doe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93:8578–8583, beschrieben, untersucht.

[0181] Die Lymphozytenkulturen wurden wie folgt hergestellt: Milzzellen (sc) aus immunisierten Mäusen wurden in Schalen mit 24 Vertiefungen mit 5×10^6 Zellen pro Vertiefung gezüchtet. Von diesen Zellen wurden 1×10^6 mit synthetischen Peptiden der Epitope aus HIV-1_{SF2}-Proteinen mit einer Konzentration von 10 μM 1 Stunde bei 37°C sensibilisiert, gewaschen und zusammen mit den verbliebenen unbehandelten 4×10^6 sc in 2 ml Kulturmedium [50 % RPMI 1640 und 50 % α -MEM (GIBCO)], das mit hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, Antibiotika und 5 % Interleukin 2 (Rat T-Stim, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) ergänzt war, gezüchtet. Die Zellen wurden am 3. und 5. Tag mit 1 ml frischem Kulturmedium ernährt, und die Zytotoxizität wurde am 6. Tag untersucht.

[0182] Der Test zytotoxischer Zellen wurde wie folgt durchgeführt: die in den ⁵¹Cr-Freisetzungstests verwendeten Zielzellen SvBALB (H-2^d) (SvB) und MC57 (H-2^b) exprimieren MHC-Moleküle der Klasse I, jedoch nicht der Klasse II. Ungefähr 1×10^6 Zielzellen wurden in 200 μl Medium, das 50 μCi (1 Ci = 37 Gbq) ⁵¹Cr und synthetische HIV-1-Peptide (1 mM) enthielt, 60 min inkubiert und dreimal gewaschen. Effektorzellen (E-Zellen) wurden mit 5×10^3 Zielzellen (T-Zellen) mit verschiedenen E/T-Verhältnissen in 200 μl Kulturmedium in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen und runder Boden 4 Stunden gezüchtet. Der mittlere cpm-Wert von Vertiefungen in zweifacher Ausfertigung wurde verwendet, um die spezifische ⁵¹Cr-Freisetzung in Prozent zu berechnen.

[0183] Wie in den Tabellen 2 und 3 gezeigt, wiesen die SDS-PLG/p55-Mikropartikel eine mit der Vacciniakontrolle vergleichbare Aktivität auf und waren aktiver als die PVA-PLG/p55-Mikropartikel und die p55-gag-Proteinformulierung. Speziell war, wie in Tabelle 2 gezeigt, das p55-gag-Protein in Konzentrationen von 10 μg , 25 μg und 50 μg inaktiv. Ferner waren, wie in Tabelle 3 gezeigt, die SDS-PLG/p55-Formulierungen aktiver als die PVA-PLG/p55- und p55-gag-Proteinformulierungen, was zeigt, dass die Proteine in den SDS-PLG/p55-Formulierungen, verglichen mit den PVA-PLG/p55- und p55-gag-Proteinformulierungen, wirksamer an den Mikropartikeln adsorbiert waren.

Antigenhilfsmittel (Hilfsm.dosis)	Verhältnis der Zielzellen	SvB ^a	SvB P7G ^b	MC57 p7G ^c
p55-gag-Protein (10 µg)	60	15	12	4
	15	11	8	3
	4	7	6	3
		12	10	13
p55-gag-Protein (25 µg)	63	10	18	2
	16	7	6	-1
	4	4	1	-3
		12	10	13
p55-gag-Protein (50 µg)	60	28	22	5
	15	13	12	2
	4	9	3	3
		12	10	13
p55-gag-Protein (10 µg) PLG/SDS 0.6 % 11.6 mg	60	8	50	0
	15	5	21	-3
	4	4	7	-1
		12	10	13
Vv gag/pol (gag kodierendes Vacciniaivirus)	60	9	65	1
	15	4	38	1
	4	1	18	3
		12	10	13

^aSvB-Zelllinie ohne Pulsimmunisierung mit Peptid^bSvB-Zelllinie mit p7g-Peptid pulsimmunisiert^cMC57-Zelllinie mit p7g-Peptid pulsimmunisiert

Effektor	E:T-Verhältnis	MC57 ^a	MC57 + gag b ^b	SVB + gag b ^c
PVA-PLG/p55 10 µg	60:1	8	15	11
	12:1	3	10	2
	2.4:1	>1	5	2
SDS-PLG/p55 10 µg	60:1	6	35	4
	12:1	3	12	>1
	2.4:1	>1	3	2
p55gag-Protein 10 µg	60:1	7	15	1
	12:1	2	6	1
	2.4:1	>1	1	>1
Vaccinia-gag	60:1	>1	37	>1
	12:1	>1	19	>1
	2.4:1	1	9	>1

^aMC57-Zelllinie ohne Pulsimmunisierung mit Peptid^bMC57-Zelllinie mit gag-b-Peptid pulsimmunisiert^cSVB-Zelllinie mit gag-b-Peptid pulsimmunisiert

Beispiel 7

Herstellung von Mikropartikeln mit adsorbiertem pCMVgp120-DNA und modifizierten Oberflächen

[0184] Mikropartikel mit adsorbiertem Plasmid-DNA, die gp120 kodiert, wurden wie folgt hergestellt. 20 mg reine Mikropartikel, die, wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben, hergestellt wurden, wurden mit zunehmenden Konzentrationen von pCMVgp120-DNA in einem Volumen von 1.0 ml 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikropartikel zentrifugiert, zweimal mit Tris-EDTA-Puffer gewaschen und über Nacht gefriergetrocknet. Die Mikropartikel wurden, wie in Beispiel 5 beschrieben, hydrolysiert und hinsichtlich der Menge an adsorbiertem DNA bei A_{260} nm analysiert.

[0185] Tabelle 4 veranschaulicht die Beladungsleistung von PLG-PVA- und PLG-CTAB-Mikropartikeln. Wie in der Tabelle gezeigt, adsorbieren die PLG-CTAB-Mikropartikel wirksamer als die entsprechenden PLG-PVA-Partikel.

TABELLE 4

Typ des Mikropartikels	theoretische Beladung (Gew.-%)	tatsächliche Beladung (Gew.-%)	Beladungsleistung (Gew.-%)
PLG-PVA	1	0,44	44
PLG-CTAB	1	0,84	88
PLG-PVA	2	0,38	19
PLG-CTAB	2	1,23	62
PLG-PVA	3	0,33	11
PLG-CTAB	3	1,82	61
PLG-PVA	4	0,48	12
PLG-CTAB	4	2,36	59

Beispiel 8

HCV-E2-Adsorption

[0186] Mikropartikel wurden unter Verwendung von PVA und mehreren verschiedenen Detergenzien, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, hergestellt. E2-Protein aus Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde an der Oberfläche der Mikropartikel wie folgt adsorbiert: 0,2 mg/ml E2 wurden zu 20 mg der Mikropartikel in PBS gegeben, wobei eine Lösung mit 0,5 Gew.-% E2/PLG in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml gebildet wurde. Die Lösungen wurden 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und dann hinsichtlich des Proteingehalts durch den MicroBCA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt. Die Ergebnisse bestätigen die bessere Adsorption von Makromolekülen durch die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung.

TABELLE 5

Typ des Mikropartikels	Protein	gebundenes E2/PLG (Gew.-%)	gebundenes Gesamt-E2 in %
PVA-PLG	E2	0,00	0,00
CTAB-PLG	E2	0,43	96,00
SDS-PLG	E2	0,14	31,00
NaOleat-PLG	E2	0,36	81,00
Pluronic P84-PLG	E2	0,00	0,00
Pluronic L121-PLG	E2	0,00	0,00

Beispiel 9

Adsorption von gp120-Protein

[0187] Mikropartikel wurden unter Verwendung von PVA, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, hergestellt. Mikropartikel wurden auch unter Verwendung von NaOleat, einem anionischen Detergens, wie folgt hergestellt: eine w/o/w-Emulsion wurde mit 1,67 ml 30 mM NaCitrat bei einem pH-Wert von 6 als innere Wasserphase, 16,7 ml 6 %igem Polymer RG 505 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dichlormethan als Lösungsmittel (Ölphase) und 66,8 ml 0,4 %igem NaOleat als äußere wässrige Phase hergestellt. Diese Mikropartikel erscheinen nachstehend in Tabelle 6 als "NaOleat-PLG (w/o/w)". Ferner wurden Mikropartikel unter Verwendung von NaOleat in einer Öl-in-Wasser-Formulierung hergestellt, und diese Mikropartikel erscheinen nachstehend in Tabelle 6 als "NaOleat-PLG (o/w)". gp120-Protein wurde an der Oberfläche der hergestellten Mikropartikel wie folgt adsorbiert: 0,388 mg/ml Protein wurden zu etwa 20 mg der Mikropartikel in PBS gegeben, wobei eine Lösung mit etwa 1,4 Gew.-% gp120/PLG in einem Gesamtvolumen von 0,8 ml gebildet wurde. Die Lösungen wurden 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert und dann zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und anschließend hinsichtlich des Proteingehalts durch den MicroBCA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Ergebnisse bestätigen die bessere Adsorption von Makromolekülen durch die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung.

TABELLE 6

Typ des Mikropartikels	Protein	gebundenes gp120/PLG (Gew.-%)	gebundenes Gesamt-E2 in %
PVA-PLG	gp120	0,01	0,00
PVA-PLG	gp120	0,09	3,00
NaOleat-PLG (w/o/w)	gp120	1,33	96,00
NaOleat-PLG (w/o/w)	gp120	1,24	95,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,41	31,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,27	20,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,36	28,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,27	22,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,34	26,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	0,31	24,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	-0,01	-1,00
NaOleat-PLG (o/w)	gp120	-0,09	-7,00

Beispiel 10

Adsorption von Listeriolysinprotein

[0188] Mikropartikel wurden unter Verwendung von PVA und CTAB, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, hergestellt. Listeriolysinprotein (LLO) aus *Listeria monocytogenes* wurde an der Oberfläche der Mikropartikel wie folgt adsorbiert: 1,0 mg/ml LLO wurden zu 100 mg der Mikropartikel in PBS gegeben, wobei eine Lösung mit 1 Gew.-% LLO/PLG in einem Gesamtvolumen von 5 ml gebildet wurde. Die Lösungen wurden 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und dann zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und anschließend hinsichtlich des Proteingehalts durch den MicroBCA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt. Die Ergebnisse bestätigen die bessere Adsorption von Makromolekülen durch die Mikropartikel der vorliegenden Erfindung.

TABELLE 7

Typ des Mikropartikels	Protein	beabsichtigte Beladung (Gew.-%)	tatsächliche Beladung (Gew.-%)	Beladungsleistung
PVA-PLG	LLO	0,10	0,10	100,0
PVA-PLG	LLO	0,25	0,08	32,0
PVA-PLG	LLO	0,50	0,12	24,0
PVA-PLG	LLO	1,00	0,18	18,0
CTAB-PLG	LLO	0,10	0,06	60,0
CTAB-PLG	LLO	0,25	0,19	76,0
CTAB-PLG	LLO	0,50	0,34	68,0
CTAB-PLG	LLO	1,00	0,71	71,0

Beispiel 11

Wirkung eines Aluminiumsalzes als Hilfsmittel

[0189] PLG-Mikropartikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA wurden, wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von CTAB hergestellt. Die Mikropartikel wurden Mäusen in zwei Konzentrationen intramuskulär injiziert, und als Kontrolle wurde DNA allein in denselben zwei Konzentrationen injiziert. Ferner wurden in einem Versuch 50 µg Aluminiumphosphat zu der injizierten CTAB-Zusammensetzung gegeben. Jede Formulierung wurde zehn Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden nach 28 Tagen einer Auffrischimpfung unterzogen. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde Serum entnommen, und der geometrische Mittelwert des Titers (GMT) jedes Serums wurde zusammen mit seinem Standardfehler (SE) gemessen. Die Ergebnisse sind sowohl als lineare als auch als logarithmische Werte in Tabelle 8 zusammengefasst. Jede Zahl ist der Mittelwert der aus den zehn Mäusen erhaltenen Ergebnisse.

TABELLE 8

Formulierung	GMT	SE	log GMT	log SE
DNA-CTAB 1 µg	19546	5983	4,28	0,11
DNA-CTAB 10 µg	54487	5510	4,73	0,04
DNA-CTAB 1 µg + ALUM 50 µg	49765	10034	4,69	0,1
DNA allein 1 µg	10.6	2.7	1,01	0,07
DNA allein 10 µg	230	395	2,15	0,3

[0190] Um diese Ergebnisse statistisch zu vergleichen, wurden für DNA-CTAB gegen DNA-CTAB + ALUM (P-Wert = 0,0017); DNA-CTAB + ALUM gegen DNA allein (P-Wert < 0,0001); und DNA-CTAB (10 µg) gegen DNA allein (10 µg) (P-Wert < 0,0001) die P-Werte erzeugt. Diese P-Werte bestätigen die statistische Signifikanz der Werte in Tabelle 8.

Beispiel 12

Messung des Zeta-Potentials

[0191] Die Messung von Zeta-Potentialen wurde auf einem Zetasizer DELSA 440 SX von Coulter Corp., Miami, FL 33116, durchgeführt. Das System wird unter Verwendung von Beweglichkeitstandards von Coulter (EMP SL7, eine wässrige Suspension von Polystyrolatexkugelchen) kalibriert. Nach dem Spülen der Probenzelle mit steriles Wasser werden die Proben in die Probenzelle gegeben. Der Zähler wird dann auf null eingestellt, indem der Strahl auf seinen niedrigsten Wert ausgerichtet wird. Der Strom wird für die Referenz auf 0,7 mA und für die Probe auf 20 V eingestellt. Die Detektorwerte aus allen vier Strahlen werden überprüft, anschließend lässt man die Probe durch die Auswahl von "run" aus der Software durchlaufen, und die Frequenzmessungen werden abgelesen. Die Strahlen sollten 20 Hz voneinander getrennt sein. Der Mittelwert des Zeta-Potentials jeder Probe wird dann abgelesen.

[0192] Die Messungen für mehrere Mikropartikelformulierungen der vorliegenden Erfindung wurden abgelesen, und die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt. Wie die Ergebnisse zeigen, ändert die Adsorption von Makromolekülen an den Oberflächen der Mikropartikel die Zeta-Potentiale der Mikropartikel.

TABELLE 9

Typ des Mikropartikels	haftendes Makromolekül	Zeta-Potential (mV)
PLG-PVA	kein	-26 ± 8
PLG-CTAB	kein	+83 ± 22
PLG-CTAB	p55-DNA	+35 ± 14
PLG-SDS	kein	-44 ± 26
PLG-SDS	p55-Protein	-32 ± 18
PLG-Oleat	kein	-64 ± 24
PLG-Oleat	gp120-Protein	-48 ± 14

Beispiel 13

Mikropartikel mit verkapselten und adsorbierten Makromolekülen

(A). PLG-Mikropartikel wurden unter Verwendung von RG 505 PLG und PVA und durch Verkapseln des Hilfsmittels LTK63 hergestellt. 100 mg der Mikropartikel wurden mit 5 ml PBS, das p24-gag-Protein mit 400 µg/ml enthielt, inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend unter Schütteln bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert, unter Zentrifugation zweimal mit 20 ml PBS und einmal mit Wasser gewaschen und dann lyophilisiert. Nach der Basenhydrolyse und Neutralisation wurden das adsorbierte Protein in % und das verkapselte Hilfsmittel in % gemessen; die Ergebnisse erscheinen in Tabelle 10.

(B). PLG-Mikropartikel wurden unter Verwendung von SDS und RG 505 PLG und durch Verkapseln von CpG-Oligonucleotiden als Hilfsmittel wie folgt hergestellt: 5 ml 6 %iges RG505-Polymer in DCM wurde mit 0,5 ml CpG mit 5 mg/ml in 50 mM Tris/EDTA emulgiert, wobei eine w/o-Emulsion gebildet wurde. Die w/o-Emulsion wurde zu 20 ml 1 %igem SDS gegeben und anschließend emulgiert, wobei eine w/o/w-Emulsion gebildet wurde. Die Mikropartikel wurden durch Abdampfung des Lösungsmittels über Nacht gebildet,

dann gewaschen, zentrifugiert und lyophilisiert. 10 mg der Mikropartikel mit verkapseltem CpG wurden in 1 ml DCM gelöst. 0,5 ml Wasser wurden zugegeben, um die Oligonucleotide zu extrahieren, und das Gemisch wurde anschließend zentrifugiert, und die wässrige Schicht wurde in eine Ausschlußsäule mit PBS als mobile Phase injiziert. 10 mg von Placebo-Mikropartikeln wurden mit 100 µg CpG-Oligonucleotiden gemischt und wie vorstehend mit DCM extrahiert, und man ließ sie als Standard auf der Säule laufen. Die Menge an CpG-Oligonucleotiden, die in den eingeschlossenen Partikeln vorlag, wurde verglichen mit dem Standard berechnet.

[0193] p55 gag wurde an den Mikropartikeln mit verkapseltem CpG wie folgt adsorbiert: 50 mg der lyophilisierten Mikropartikel mit verkapseltem CpG wurden über Nacht mit 5 ml 25 mM Boratpuffer mit 6 M Harnstoff (pH 9), der 140 µg p55-gag-Protein enthielt, inkubiert. Das Gemisch wurde unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit 20 ml Boratpuffer/6 M Harnstoff und zweimal 20 ml Wasser gewaschen und dann lyophilisiert.

[0194] 10 mg der Mikropartikel mit verkapseltem CpG/adsorbiertem p55 gag wurden einer Basenhydrolyse unterzogen, und Messungen der eingeschlossenen und adsorbierten Makromoleküle in % wurden durchgeführt. Die beabsichtigte Beladung betrug 1,0 %, wenn es nicht anders angegeben wurde. Die Ergebnisse erscheinen in Tabelle 10.

TABELLE 10

Typ des Mikropartikels	verkapselt (Gew.-%)	adsorbiert (Gew.-%)
(A). PLG-PVA verkapseltes LTK63 adsorbiertes p24 gag	0,46	1,2*
(B). PLG-SDS verkapseltes CpG adsorbiertes p55 gag	0,41	1,0

*beabsichtigte Beladung = 2.0

Beispiel 14

Mikropartikel mit zwei adsorbierten Makromolekülen

(A). Gemäß der vorliegenden Erfindung können zwei oder mehr Makromoleküle in einer Zusammensetzung, umfassend Mikropartikel, die beide Makromoleküle adsorbiert haben, verabreicht werden oder können in einer Zusammensetzung, umfassend zwei oder mehr getrennte Mikropartikel, die jeweils ein einzelnes Makromolekül adsorbiert haben, verabreicht werden. Mikropartikel wurden zum Beispiel unter Adsorbieren von sowohl E2-Polypeptid als auch CpG-Oligonucleotiden als Hilfsmittel wie folgt hergestellt: reines PLG-CTAB wurde, wie vorher beschrieben, hergestellt. 20 mg der lyophilisierten Mikropartikel wurden 4 Stunden mit 1 ml E2 mit 200 µg/ml in Kochsalzlösung inkubiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden geschüttelt, zweimal mit 20 ml normalem Kochsalzwasser unter Zentrifugation mit 10000 G gewaschen, und das Pellet wurde in 1 ml einer CpG-Lösung in TE-Puffer, der CpG mit 200 µg/ml enthielt, 4 Stunden bei Raumtemperatur resuspendiert. Die Endssuspension wurde zweimal mit TE-Puffer unter Zentrifugation gewaschen und anschließend lyophilisiert. 10 mg der Mikropartikel mit adsorbiertem CpG und E2 wurden einer Basenhydrolyse unterzogen, und die Proteinkonzentration wurde durch den BCA bestimmt, und die verbliebene Menge an CpG in dem Überstand wurde durch HPLC untersucht, um die Menge von an den Mikropartikeln adsorbiertem CpG zu messen. Die Ergebnisse erscheinen in Tabelle 11, wobei eine positive Adsorption für beide Makromoleküle gezeigt wird.

(B). Mikropartikel wurden gemäß der Erfindung hergestellt. Ein Teil wurde verwendet, um das E2-Polypeptid zu adsorbieren, während ein anderer Teil verwendet wurde, um die CpG-Oligonucleotide als Hilfsmittel zu adsorbieren. Reines PLG-CTAB wurde, wie vorher beschrieben, hergestellt. 20 mg der lyophilisierten Mikropartikel wurden 4 Stunden mit 1 ml E2 mit 200 µg/ml in Kochsalzlösung inkubiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden geschüttelt, zweimal mit 20 ml normalem Salzwasser unter Zentrifugation mit 10000 G gewaschen und dann lyophilisiert. Getrennt wurden 20 mg der lyophilisierten Mikropartikel 4

Stunden mit 1 ml CpG mit 200 µg/ml in TE-Puffer inkubiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden geschüttelt, zweimal mit 20 ml TE-Puffer unter Zentrifugation mit 10000 G gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die Ergebnisse der Messungen der adsorbierten Makromoleküle in Prozent erscheinen in Tabelle 11.

TABELLE 11

Typ des Mikropartikels	adsorbiertes E2 (Gew.-%)*	adsorbiertes CpG (Gew.-%)*
(A). PLG-SDS adsorbiertes E2 adsorbiertes CpG	0,71	0,32
(B). PLG-SDS adsorbiertes E2	0,64	n/a
(B). PLG-SDS adsorbiertes CpG	n/a	0,81

*beabsichtigte Beladung = 1.0 %

Beispiel 15

Unter Verwendung einer Kombination aus Detergens und PVA gebildete Mikropartikel

[0195] Das folgende Verfahren wurde angewendet, um Mikropartikel, umfassend zwei oberflächenaktive Mittel, PVA und ein Detergens, zu bilden: 10 ml 5 % PLG-Polymer und 0,2 % des Detergens DOTAP in DCM wurden mit 12000 UpM 3 Minuten mit 1,0 ml destilliertem Wasser emulgiert, um die primäre w/o-Emulsion zu bilden. Die w/o-Emulsion wurde zu 40 ml 0,8 %igem PVA gegeben und 3 Minuten emulgiert, um die zweite w/o/w-Emulsion zu bilden, die über Nacht gerührt wurde, um das Lösungsmittel abzudampfen, und die Mikropartikel wurden gebildet. Die Mikropartikel wurden zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel sind dann zur Adsorption von Makromolekülen gemäß der vorliegenden Erfindung bereit.

[0196] Dasselbe Verfahren wurde angewendet, um Mikropartikel, umfassend eine Kombination aus PVA und dem Detergens DDA, zu bilden.

Beispiel 16

Immunogenität von Mikropartikeln mit adsorbiertem p55-DNA

[0197] Mikropartikel wurden unter Verwendung der Detergenzien CTAB oder DDA wie in den vorhergehenden Beispielen gebildet. p55-DNA wurde an den Mikropartikeln adsorbiert, und die Immunogenität wurde unter Anwendung der in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Verfahren beurteilt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 12 zusammengefasst.

TABELLE 12

SPEZIFISCHE LYSE VON ZIELZELLEN IN PROZENT		
Effektor	E:T-Verhältnis	Sv/B P7g ^a
PLG-CTAB/ p55-DNA 1 µg	60:1	71
	15:1	55
	4:1	31
PLG-DDA/ p55 1 µg	60:1	70
	15:1	54
	4:1	17
p55-DNA allein 1 µg	60:1	3
	15:1	1
	4:1	0
Vaccinia gag 2x10 ⁷ pfu	60:1	64
	15:1	35
	4:1	11

^aSVB-Zelllinie mit gag-b-Peptid pulsimmunisiert

Beispiel 17

Expression von Luciferase in vivo unter Verwendung von Mikropartikeln mit adsorbiertem Luciferase-DNA

[0198] Mikropartikel wurden unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren und unter Verwendung von PLG und des Detergents CTAB gebildet. Luciferase-DNA wurde unter Anwendung der vorher beschriebenen Verfahren daran adsorbiert. Die Expression von Luciferase in vitro unter Verwendung einer Dosis von 5 µg Luciferase-DNA wurde unter Verwendung der Luciferase-DNA allein (1248 pg) und der Mikropartikel mit daran adsorbiertem Luciferase-DNA (2250 pg) gemessen. Die Expression von Luciferase in vivo wurde am 1. und 14. Tag nach der Verabreichung im Muskel wie folgt gemessen: zwei Gruppen von Mäusen (n = 5) wurden jeweils entweder 50 µg Luciferase-Plasmid oder 50 µg PLG-CTAB-Luciferase-DNA-Mikropartikel injiziert. Beide Gruppen von Mäusen erhielten intramuskuläre Injektionen in den Muskel anterior tibialis (TA) an zwei Beinen. Beide TA-Muskeln aus jeder Maus in den zwei Gruppen wurden entweder am 1. oder am 14. Tag entnommen und in einem Tiefkühlschrank mit -80°C gelagert. Die Muskeln wurden mit einem Mörser und Pistill auf Trockeneis zerrieben. Die pulverisierten Muskeln wurden in Eppendorf-Röhrchen mit 0,5 ml 1 × Reporter-Lysepuffer aufgenommen. Die Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur verwirbelt. Nach 3-maligem Einfrieren/Auftauen wurden die Proben mit 14000 UpM 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände der TA-Muskeln jeder Maus zu jedem Zeitpunkt wurden vereinigt, und 20 µl der Proben wurden hinsichtlich der Luciferase-Expression unter Verwendung eines ML3000 (Dynatech) mit verstärktem Blitz untersucht.

[0199] Die Luciferasebestimmung wurde unter Verwendung eines Chemilumineszenztests durchgeführt. Der Puffer, der BSA mit 1 mg/ml in 1 × Reporter-Lyse (Promega) enthielt, wurde hergestellt. Die Stammlösung des Luciferaseenzyms (Promega) mit 10 mg/ml wurde, verdünnt auf eine Konzentration von 500 pg/20 µl, als Standard verwendet. Dieser Standard wurde entlang der Microlite-2-Platte (Dynatech) 1:2 in Reihe verdünnt, um eine Standardkurve zu erstellen. 20 µl des Blindwerts und der Proben wurden ebenfalls auf die Platte gegeben und 1:2 in Reihe verdünnt. Die Platten wurden in den ML3000 gestellt, wobei 100 µl des Luciferase-Testreagens (Promega) pro Vertiefung injiziert wurden. Mit verstärktem Blitz wurden die relativen Lichteinheiten jeder Probe gemessen.

[0200] Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 13 tabellarisiert.

TABELLE 13

Typ des Mikropartikels	Expression der Luciferase <i>in vivo</i> am 1. Tag (pg)	Expression der Luciferase <i>in vivo</i> am 14. Tag (pg)
PLG-CTAB adsorbierte Luciferase-DNA (50 µg)	9,51	44,95
Luciferase-DNA allein (50 µg)	6,78	9,29

Beispiel 18

Immunogenität von Mikropartikeln mit adsorbiertem Antigen gegenüber eingeschlossenem Antigen

[0201] Mikropartikel wurden unter Anwendung der in den vorhergehenden Beispielen diskutierten Verfahren hergestellt. E2-Protein wurde dann, wie vorstehend beschrieben, daran adsorbiert. Mikropartikel wurden auch, wie vorstehend beschrieben, mit darin eingeschlossenem und nicht daran adsorbiertem E2 hergestellt. Die Mikropartikel wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, nach einer Immunisierung von 10 Mäusen mit jedem Typ von Mikropartikel IgG-Antikörper zu induzieren, beurteilt. Der geometrische Mittelwert des Titers (GMT) des Serums aus jeder Maus wurde gemessen und anschließend über die Gruppe von 10 Tieren gemittelt. Der Standardfehler (SE) wurde ebenfalls berechnet. PLSD nach Fisher (Signifikanzwert 5 %) wurde bei $p = 0.0006$ gemessen. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 14 gezeigt: die Ergebnisse zeigen deutlich eine bessere Auslösung der humoralen Immunantwort unter Verwendung der adsorbierten Mikropartikel der vorliegenden Erfindung.

TABELLE 14

Formulierung	GMT	SE
PLG mit eingeschlossenem E2	293	270
PLG mit adsorbiertem E2	3122	1310

Beispiel 19

Immunogenität von Mikropartikeln mit daran adsorbiertem HCV-E1E2-Protein

[0202] PLG-CTAB-Mikropartikel wurden unter Verwendung der in den vorhergehenden Beispielen diskutierten Verfahren hergestellt. E1E2-Protein aus Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde daran adsorbiert. Die Partikel wurden verwendet, um Mäuse mit oder ohne das Hilfsmittel Alum mit Dosierungen der Mikropartikel, die so berechnet wurden, dass entweder 10 µg oder 100 µg Protein bereitgestellt wurden, zu immunisieren. Der geometrische Mittelwert des Titers wurde gemessen, und die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 15 gezeigt.

TABELLE 15

Formulierung	GMT	SE
PLG/CTAB E1E2 (10 µg)	4117	558
PLG/CTAB E1E2 (100 µg)	7583	659
PLG/CTAB E1E2 Alum (10 µg)	3356	436
PLG/CTAB E1E2 Alum (100 µg)	10485	1548
HCV E1E2 DNA (10 µg)	87	63
HCV E1E2 DNA (100 µg)	7621	571

[0203] Wie die Ergebnisse zeigen, erzeugen die Mikropartikel mit daran adsorbiertem Protein eine bessere Immunantwort mit einer Dosis von 10 µg. Dies zeigt, dass die Mikropartikel den Vorteil aufweisen, dass sie zur Auslösung von Immunantworten mit niedrigen Dosen, bei denen freie DNA keine derartigen Antworten erzeugen kann, verwendbar sind.

Beispiel 20

Immunogenität von Mikropartikeln mit adsorbiertem p24-gag-Protein

[0204] PLG-PVA-Mikropartikel wurden unter Verwendung der in den vorhergehenden Beispielen diskutierten Verfahren hergestellt. Das Protein p24 gag wurde dann, wie vorstehend beschrieben, daran adsorbiert. Die Mikropartikel wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, nach Immunisierungen von 10 Mäusen IgG-, IgG1- und IgG2a-Antikörper zu induzieren, beurteilt. Der geometrische Mittelwert des Titers (GMT) des Serums, das 2 Wochen nach der 2. Immunisierung (2wp2) und 2 Wochen nach der 3. Immunisierung (2wp3) den Mäusen entnommen wurde, wurde gemessen und dann über die Gruppe von 10 Tieren gemittelt. Der Standardfehler (SE) wurde ebenfalls berechnet. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 16 gezeigt: die Ergebnisse zeigen deutlich eine bessere Auslösung der humoralen Immunantwort unter Verwendung der adsorbierten Mikropartikel der vorliegenden Erfindung.

TABELLE 16

	IgG GMT	IgG SE	IgG1 GMT	IgG1 SE	IgG2a GMT	IgG2a SE
PLG-PVA/p24 gag (2wp2)	5813,59	2400,58	3741,17	2039,08	755,3	587,21
p24 gag allein (2wp2)	6,6	7,91	6,51	6,85	5	1
PLG-PVA/p24 gag (2wp3)	26730,29	3443,67	40088,65	8989,07	6974,22	1457,74
p24 gag allein (2wp3)	7,15	5,59	8,22	12,3	5	1

Beispiel 21

i.m.-Immunisierung mit p55-gag-Protein und verschiedenen Hilfsmitteln

[0205] PLG/CTAB-, PLG/SDS- und PLG/PVA-Mikropartikel wurden, wie vorstehend in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, gebildet. Acht Gruppen von Mikropartikeln wurden hergestellt, um die verschiedenen Wirkungen der Immunisierung von Mäusen mit dem an Mikropartikeln adsorbierten Antigen p55-gag-Protein gegenüber der Bereitstellung von freiem, löslichem p55 gag zu analysieren, und um die Wirkungen, die das Hilfsmittel CpG (20 Basen lange, einzelsträngige Oligonucleotide mit einem CpG-Strukturleitmotiv) aufweist, das auch an anderen Mikropartikeln adsorbiert oder in freier, löslicher Form bereitgestellt wurde, zu bestimmen. Die verschiedenen Gruppen wurden wie folgt hergestellt:

Gruppe 1 verwendete lösliches p55-gag-Protein (rekombinantes HIV-p55-gag-Protein, das in Hefe mit 2 mg/ml in Tris/NaCl-Puffer mit 2 M Harnstoff erzeugt wurde), das mit PLG/CTAB-Partikeln mit adsorbiertem CpG gemischt war.

Gruppe 2 verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55 gag, die mit PLG/CTAB-Partikeln mit adsorbiertem CpG gemischt waren.

Gruppe 3 verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55 gag, die mit freiem CpG gemischt waren.

Gruppe 4 verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55 gag und ohne Hilfsmittel.

Gruppe 5 verwendete PLG/PVA-Partikel mit darin eingeschlossenem p55 gag, die mit PLG/CTAB-Partikeln mit adsorbiertem CpG gemischt waren.

Gruppe 6, eine Kontrolle, verwendete kein Antigen und lösliches CpG.

Gruppe 7, eine andere Kontrolle, verwendete lösliches p55-gag-Protein und keine Hilfsmittel.

Gruppe 8, eine andere Kontrolle, verwendete nur Vacciniaivirus (vv gag), welches das gag-Gen exprimiert, und keine Hilfsmittel.

[0206] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung des Antigens p55 gag und CpG-Hilfsmittels (falls in der Gruppe vorhanden) jeweils 25 µg betrug, ausgenommen Gruppe 8, die in einer Dosierung von 10×10^7 PFU verwendet wurde. Der Immunisierungsweg war i.m., ausgenommen Gruppe 8, deren Weg i.p. war. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-IgG-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 17A (3wp2, drei Wochen nach der zweiten Immunisierung) erscheinen. Tabelle 17B stellt eine Analyse der Isotypen der IgG1- und IgG2a-Komponenten, einschließlich des Verhältnisses von IgG2a/IgG1, bereit. Die Lyse von Zielzellen durch CTL wurde ebenfalls mit jeder Gruppe gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in den Tabellen 18A und 18B (zwei getrennte Experimente) erscheinen.

TABELLE 17A

IgG-Titer im Serum			
Gruppe	Form des Antigens p55-gag-Protein	Form des CpG-Hilfsmittels	Titer im Serum
1	löslich	an PLG/CTAB-Partikeln adsorbiert	43250
2	an PLG/SDS-Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB-Partikeln adsorbiert	49750
3	an PLG/SDS-Partikeln adsorbiert	löslich	62750
4	an PLG/SDS-Partikeln adsorbiert	kein	7550
5	in PLG/PVA-Partikeln eingeschlossen	an PLG/CTAB-Partikeln adsorbiert	127000
6	löslich	löslich	38
7	löslich	kein	2913
8	Vacciniaivirus (vv gag)	kein	938

TABELLE 17B

	IgG GMT	IgG1 GMT	IgG2a GMT	IgG2a/Ig G1
PLG/CTAB- CpG plus lösliches p55	43 250	18 750	17 500	0,9333
PLG/CTAB- CpG plus PLG/SDS-p55	49 750	24 750	24 500	0,9899
PLG/SDS-p55 plus freies CpG	62 750	30 000	32 500	1,0833
PLG/SDS-p55 ohne CpG	7 550	18 600	350	0,0188
PLG/CTAB- CpG plus PLG/ PVA mit einge- schlossenem p55	127 000	72 750	49 250	0,6770
freies CpG1	38	nicht nach- weisbar	25	—
kein Hilfsmittel	2913	7.450	88	0,0117
vv gag, kein Hilfsmittel	938	488	375	0,7692

TABELLE 18A

SPEZIFISCHE LYSE VON ZIELZELLEN IN PROZENT					
Gruppe	Form des Antigens p55-gag-Protein	Form des CpG- Hilfsmittels	Verhältnis der Zielzellen	SvB pGAG ^a	SvB P7g ^b
1	löslich	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	3	41
			15	0	15
			4	-1	8
2	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	7	77
			15	4	49
			4	2	26
3	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	löslich	60	6	51
			15	3	30
			4	4	11
4	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	kein	60	4	48
			15	2	21
			4	1	7
5	in PLG/PVA-Partikeln eingeschlossen	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	3	37
			15	2	17
			4	0	4
6	löslich	löslich	60	4	23
			15	4	7
			4	2	3
7	löslich	kein	60	1	4
			15	-1	1
			4	0	2
8	Vaccinavirus (vv gag)	kein	60	3	52
			15	2	25
			4	3	16

^aSvB-Zelllinie mit irrelevantem Peptid pulsimmunisiert^bSvB-Zelllinie mit p7g-Peptid pulsimmunisiert

TABELLE 18B

SPEZIFISCHE LYSE VON ZIELZELLEN IN PROZENT					
Gruppe	Form des Antigens p55-gag-Protein	Form des CpG- Hilfsmittels	Verhältnis der Zielzellen	SvB pGAG ^a	SvB P7g ^b
1	löslich	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	0	47
			15	-1	23
			4	0	13
2	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	3	68
			15	2	48
			4	3	16
3	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	löslich	60	2	32
			15	1	17
			4	1	0
4	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	kein	60	1	27
			15	2	19
			4	2	3
5	in PLG/PVA-Partikeln eingeschlossen	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	60	0	31
			15	0	13
			4	-1	3
6	löslich	löslich	60	3	17
			15	1	4
			4	1	0
7	löslich	kein	60	-1	10
			15	-1	1
			4	4	2
8	Vaccinavirus (vv gag)	kein	60	1	48
			15	1	23
			4	1	12

^aSvB-Zelllinie mit irrelevantem Peptid pulsimmunisiert^bSvB-Zelllinie mit p7g-Peptid pulsimmunisiert

Beispiel 22

i.m.-Immunisierung mit p55-gag-Protein oder p55-DNA und verschiedenen Hilfsmitteln

[0207] PLG-Mikropartikel wurden, wie vorstehend in dem Vorhergehenden beschrieben, gebildet. Gruppen von Mikropartikeln wurden hergestellt, um die verschiedenen Wirkungen der Immunisierung von Mäusen mit dem an Mikropartikeln adsorbierten Antigen p55-gag-Protein gegenüber der Bereitstellung von freiem, löslichem p55 gag zu analysieren und um die Wirkungen, die das CpG-Hilfsmittel (CpG1 oder CpG2, die verschiedene Gruppen von Oligonucleotiden darstellen) aufweist, das auch an anderen Mikropartikeln adsorbiert oder in freier, löslicher Form bereitgestellt wurde, zu bestimmen. Zehn Gruppen von Tieren wurden mit verschiedenen Formulierungen wie folgt immunisiert:

Gruppe 1 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG1, die mit freiem p55-gag-Protein (rekombinantes HIV-p55-gag-Protein, das in Hefe mit 2 mg/ml in Tris/NaCl-Puffer mit 2 M Harnstoff erzeugt wurde) gemischt waren.

Gruppe 2 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG1, die mit PLG/SDS-Partikeln mit adsorbiertem p55-gag-Protein gemischt waren.

Gruppe 3 verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-Protein, die mit freiem CpG1 gemischt waren.

Gruppe 4 verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-Protein und ohne Hilfsmittel.

Gruppe 5 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG1 und eingeschlossenem PVA/p55-gag-Protein.

Gruppe 6, PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG2, die mit PLG/SDS-Partikeln mit adsorbiertem p55-gag-Protein gemischt waren.

Gruppe 7, eine Kontrolle, verwendete PLG/SDS-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-Protein und reine PLG/CTAB-Mikropartikel.

Gruppe 8, eine andere Kontrolle, verwendete nur freies CpG2.

Gruppe 9, eine andere Kontrolle, verwendete nur freies CpG1.

Gruppe 10, eine andere Kontrolle, verwendete nur freies, lösliches p55-gag-Protein.

[0208] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung des Antigens p55 gag und CpG-Hilfsmittels (falls in der Gruppe vorhanden) jeweils 25 µg betrug. Der Immunisierungsweg war i.m. TA. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-IgG-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 19A erscheinen. Das Serum wurde 2wp2 (zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung) und 2wp3 (zwei Wochen nach der dritten Immunisierung) gemessen.

TABELLE 19A

IgG-Titer im Serum				
Gruppe	Form des Antigens p55-gag-Protein	Form des CpG- Hilfsmittels	Titer im Serum [GMT/(SE)]	
			2wp2	2wp3
1	löslich	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	40 200 (7973)	120 000 (13600)
2	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	56 500 (9495)	146 000 (24700)
3	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	löslich	53 000 (13900)	108 000 (14900)
4	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	kein	7 536 (1628)	1 628 (3218)
5	in PLG/PVA-Parti- keln eingeschlossen	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	126 000 (12900)	201 000 (24400)
6	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	4 684 (814)	62 100 (11300)
7	an PLG/SDS- Partikeln adsorbiert	kein	24 600 (4456)	53 900 (7451)
8	kein	löslich	82 (1308)	2 415 (1874)
9	kein	löslich	57 (31)	12 200 (4306)
10	kein	kein	6 338 (999)	15 900 (2929)

[0209] Ein ähnliches Experiment wurde unter Verwendung verschiedener PLG-Mikropartikel, unter Verwendung von CTAB als Detergens, unter Verwendung von p55-gag-DNA als Antigen, unter Verwendung von CpG oder LTK63 als Hilfsmittel und unter Verwendung der folgenden Gruppen durchgeführt:

Gruppe 1 verwendete PLG/PVA/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg.

Gruppe 2 verwendete PLG/PVA/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 10 µg.

Gruppe 3 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg.

Gruppe 4 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 10 µg.

Gruppe 5 verwendete lösliche p55-gag-DNA mit 1 µg ohne Partikel oder Hilfsmittel.

Gruppe 6 verwendete lösliche p55-gag-DNA mit 10 µg ohne Partikel oder Hilfsmittel.

Gruppe 7 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg, die mit freiem CpG gemischt waren.

Gruppe 8 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg, die mit PLG/CTAB-Partikeln mit adsorbiertem CpG1 gemischt waren.

Gruppe 9 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg, die mit freiem LTK63 gemischt waren.

Gruppe 10 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-gag-DNA mit 1 µg, die mit PLG/SDS-Partikeln mit adsorbiertem LTK63 gemischt waren.

[0210] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung des Antigens p55-DNA wie angegeben war, und das CpG-Hilfsmittel (falls in der Gruppe vorhanden) jeweils 25 µg betrug. Der Immunisierungsweg war i.m. TA. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-IgG-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 19B erscheinen. Das Serum wurde 2wp2 (zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung) gemessen.

TABELLE 19B

IgG-Titer im Serum			
Gruppe	Form des Antigens p55-gag-DNA	Form des Hilfsmittels	Titer im Serum [GMT/(SE)]
1	an PLG/PVA/ CTAB-Partikeln adsorbiert	kein	22 900 (8892)
2	an PLG/PVA/ CTAB-Partikeln adsorbiert	kein	81 700 (8578)
3	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	kein	18 100 (12800)
4	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	kein	101 000 (10900)
5	löslich	kein	14 (130)
6	löslich	kein	1 060 (1905)
7	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	lösliches CpG	50 400 (19700)
8	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB-Parti- keln adsorbiertes CpG	68 300 (9534)
9	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	lösliches LTK63	109 000 (15900)
10	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	an PLG/SDS-Partikeln adsorbiertes LTK63	52 900 (9229)

[0211] Ein ähnliches Experiment wurde unter Verwendung verschiedener PLG-Mikropartikel oder MF59-Mikroemulsionen, unter Verwendung von Phosphatidsäure (PA), DSS, DOTAP oder CTAB als Detergens, unter Verwendung von gp120-Protein als Antigen und unter Verwendung der folgenden Gruppen durchgeführt:

Gruppe 1 verwendete eine MF59-Emulsion mit freiem gp120-Protein.

Gruppe 2 verwendete eine MF59/PA-Emulsion mit adsorbiertem gp120-Protein.

Gruppe 3 verwendete PLG/PVA-Partikel mit eingeschlossenem gp120.

Gruppe 4 verwendete PLG/DSS-Partikel mit adsorbiertem gp120-Protein und kein Hilfsmittel.

Gruppe 5 verwendete PLG/DSS-Partikel mit adsorbiertem gp120-Protein und PLG/CTAB-Partikel mit daran adsorbiertem CpG.

Gruppe 6 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG.

Gruppe 7 verwendete PLG/DSS-Partikel mit adsorbiertem gp120-Protein, die mit MF59/DOTAP-80-Partikeln mit adsorbiertem CpG1 gemischt waren.

Gruppe 8 verwendete eine MF59/DOTAP-80-Emulsion mit adsorbiertem CpG1.

Gruppe 9 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem CpG, die mit MF59/PA-Partikeln mit adsorbier-tem gp120-Protein gemischt waren.

Gruppe 10 verwendete freies CpG1 plus lösliches gp120-Protein.

[0212] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung des Antigens gp120 gag und CpG-Hilfsmittels (falls in der Gruppe vorhanden) jeweils 25 µg betrug. Der Immunisierungsweg war i.m. TA. Nach der Immunisierung wurde der anti-gp120-IgG-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 19C erscheinen. Das Serum wurde 2wp2 (zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung) und 2wp3 (zwei Wochen nach der dritten Immunisierung) gemessen.

TABELLE 19C

IgG-Titer im Serum				
Gruppe	Form des Antigens gp120-gag-Protein	Form des CpG- Hilfsmittels	Titer im Serum [GMT/(SE)]	
			2wp2	2wp3
1	in MF59 löslich	kein	2 995 (679)	7 797 (864)
2	an eine MF59/PA- Emulsion adsorbiert	kein	997 (201)	4 383 (820)
3	in PLG/PVA-Parti- keln eingeschlossen	kein	740 (307)	3 655 (569)
4	an PLG/DSS- Partikeln adsorbiert	kein	530 (145)	1 306 (306)
5	an PLG/DSS- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	6 835 (2217)	26 294 (3972)
6	kein	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	9 (6)	127 (143)
7	an PLG/DSS- Partikeln adsorbiert	an eine MF59/DOTAP- Emulsion adsorbiert	16 588 (4997)	26 688 (6583)
8	kein	an eine MF59/DOTAP- Emulsion adsorbiert	1 050 (978)	5 216 (2379)
9	an MF59/PA- Partikeln adsorbiert	an PLG/CTAB- Partikeln adsorbiert	81 (1530)	2012 (7234)
10	löslich	löslich	8 (37)	15 (163)

[0213] Die vorstehenden Daten zeigen, dass im Fall des Antigens gp120-Protein die besten Immunantworten in der Gruppe ausgelöst wurden, die mit an PLG-Partikeln adsorbiertem Antigen, sei es, dass die CpG-Oligonucleotide an anderen PLG-Partikeln oder eine MF59/DOTAP-Emulsion adsorbiert waren, immunisiert wurden. Im Gegensatz dazu war die Immunantwort im Wesentlichen bedeutungslos, wenn das Antigen an der MF59/DOTAP-Emulsion adsorbiert war, und die CpG-Oligonucleotide an PLG-Partikeln adsorbiert waren. Versehen mit den Angaben hier kann ein Fachmann leicht bestimmen, welche Kombination aus adsorbierten Mi-kropartikeln und/oder einer Mikroemulsion für ein beliebiges spezielles Antigen am besten geeignet ist.

Beispiel 23

Adsorption und Einschluss von p55-DNA

[0214] PLG/CTAB-Mikropartikel mit adsorbierter p55-DNA wurden, wie vorstehend in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, gebildet, und hinsichtlich einer Antikörperinduktion vier Wochen nach der i.m.-Immunisierung und zwei Wochen nach der zweiten i.m.-Immunisierung gegenüber reinen Partikeln, freiem CTAB und freier p55-DNA geprüft. Die Ergebnisse erscheinen nachstehend in Tabelle 20A und zeigen den deutlichen Vorteil von an Mikropartikeln adsorbierter p55-DNA gegenüber freier p55-DNA in Lösung.

TABELLE 20A

Formulierung	4wp1 GMT	4wp1 SE	2wp2 GMT	2wp2 SE
PLG/CTAB mit adsorbierter p55-DNA (1 µg)	27	85	17 800	9156
freies CTAB (1 µg)	8	25	181	653
reines PLG (1 µg)	4	2	32	106
reines PLG + freies CTAB (1 µg)	6	25	71	1631
freie p55-DNA (1 µg)	3	0	69	60

[0215] Die CTL-Induktion wurde mit denselben Formulierungen untersucht und 3 Wochen nach der ersten Immunisierung unter Verwendung von Verhältnissen der Zielzellen zu Effektor von 4:1, 15:1 und 60:1 gemessen. Die Ergebnisse erscheinen nachstehend in Tabelle 20B, wobei der Vorteil von an Mikropartikeln adsorbierter p55-DNA gezeigt wird.

TABELLE 20B - SPEZIFISCHE LYSE VON ZIELZELLEN IN PROZENT		
Formulierung	E:T-Verhältnis	Lyse
PLG/CTAB-p55-DNA (1 µg)	60:1	33
	15:1	11
	4:1	1
freies CTAB	60:1	-1
	15:1	1
	4:1	0
reines PLG	60:1	12
	15:1	2
	4:1	3
reines PLG + CTAB	60:1	18
	15:1	6
	4:1	3
freie p55-DNA (1 µg)	60:1	3
	15:1	0
	4:1	0
vv gag (2 x 10 ⁷ PFU)	60:1	59
	15:1	24
	4:1	9

[0216] PLG/CTAB-Mikropartikel mit adsorbierter p55-DNA und PLG/PVA-Mikropartikel mit darin eingeschlossener p55-DNA wurden, wie vorstehend in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, gebildet. Eine i.m.-Immunisierung von Mäusen und eine Antikörperinduktion (Entnahme und Analyse von Serum) wurden,

wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, vier Wochen nach der 1. Immunisierung (4wp1) und 2, 4, 6, 13 und 15 Wochen nach der 2. Immunisierung (2wp2, 4wp2, 6wp2, 13wp2 beziehungsweise 15wp2) durchgeführt. Die nachstehend in Tabelle 20C gezeigten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Vorteil der adsorbierten Mikropartikel gegenüber sowohl eingeschlossenem als auch freiem p55.

TABELLE 20C

Formulierung	4wp1	2wp2	4wp2	6wp2	13wp2	15wp2
PLG/CTAB mit adsorbiertem p55-DNA (1 µg)	576	79300	156000	227000	988000	123000
PLG/PVA mit eingeschlossener p55-DNA (1 µg)	996	1915	2215	1376	25100	1084
p55-Plasmid allein (1 µg)	912	1149	1360	701	1075	742
p55-Plasmid allein (10 µg)	1489	10700	7885	26300	31600	17300

[0217] PLG/CTAB/PVA-Partikel mit adsorbiertem p55-DNA (1 % DNA) wurden, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, hergestellt und hinsichtlich mehrerer Eigenschaften gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 20D erscheinen.

TABELLE 20D

CTAB Gew./ Vol.-%	PVA Gew./ Vol.-%	beabsich- tigte Beladung mit p55- DNA	tatsäch- liche Beladung mit p55- DNA	Beladungs- leistung (%)	mittlere Größe (µm)	Zeta- Potential ohne DNA (mV)	Zeta- Potential mit DNA (mV)	nach 4 Waschvor- gängen ver- bliebenes CTAB (Gew.-%)
0,2	0,8	1,0	0,74	74	1,86	46 ± 14	24 ± 14	0,42

[0218] PLG/CTAB- und PLG/PVA/CTAB-Partikel wurden, wie vorher beschrieben, hergestellt, und p55-DNA wurde daran absorbiert. Mäuse wurden mit den Partikeln so immunisiert, dass die Dosierung der p55-DNA entweder 1 µg oder 10 µg betrug. Die Ergebnisse eines Antikörperinduktionsexperiments 2 Wochen nach der 2. Immunisierung erschienen vorstehend in Tabelle 19B und sind nachstehend in Tabelle 20E zusammengefasst.

TABELLE 20E

Formulierung	2wp2 GMT	2wp2 SE
PLG/PVA/CTAB mit adsorbiertem p55-DNA (1 µg)	22 900	8 892
PLG/PVA/CTAB mit adsorbiertem p55-DNA (10 µg)	81 700	8 578
PLG/CTAB mit adsorbiertem p55-DNA (1 µg)	18 100	12 800
PLG/CTAB mit adsorbiertem p55-DNA (10 µg)	101 000	10 900
freie p55-DNA (1 µg)	14	130
freie p55-DNA (10 µg)	1 060	1 905

[0219] Verschiedene PLG-Mikropartikel oder MF59-Mikroemulsionen wurden unter Verwendung von DOTAP oder CTAB als Detergens und unter Verwendung von p55-DNA als Antigen hergestellt und verwendet, um Mäuse wie folgt zu immunisieren:

Gruppe 1 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-DNA.

Gruppe 2 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit eingeschlossener p55-DNA.

Gruppe 3 verwendete PLG/DOTAP-Partikel mit adsorbiertem p55-DNA.
 Gruppe 4 verwendete PLG-Partikel mit freiem CTAB und freier p55-DNA.
 Gruppe 5 verwendete eine MF59/DOTAP-80-Emulsion mit freier p55-DNA.
 Gruppe 6 verwendete eine MF59-Emulsion mit freier p55-DNA.
 Gruppe 7 verwendete freie p55-DNA allein.
 Gruppe 8 verwendete reine PLG-Partikel und freie p55-DNA.
 Gruppe 9 verwendete reine PLG-Partikel, freies CTAB und freie p55-DNA.

[0220] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung der p55-DNA 1 µg betrug. Der Immunisierungsweg war i.m. TA. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-DNA-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 20F erscheinen. Das Serum wurde 3wp1 (drei Wochen nach der ersten Immunisierung) und 3wp2 (drei Wochen nach der zweiten Immunisierung) gemessen.

TABELLE 24F

IgG-Titer im Serum			
Gruppe	Form des Antigens p55-DNA	Titer im Serum [GMT/(SE)]	
		3wp1	3wp2
1	an PLG/CTAB-Partikeln adsorbiert	72 (29)	21 600 (18 400)
2	in PLG/CTAB-Partikeln eingeschlossen	148 (95)	20 200 (3048)
3	an PLG/DOTAB-Partikeln adsorbiert	40 (52)	23 800 (2293)
4	frei	5 (3)	7 (30)
5	an eine MF59/DOTAB-Emulsion adsorbiert	96 (7)	31 000 (3267)
6	an eine MF59-Emulsion adsorbiert	5 (0)	10 (19)
7	frei	3 (0)	3 (0)
8	frei	3 (0)	5 (2)
9	frei	3 (0)	35 (55)

[0221] PLG/CTAB- und PLG-Mikropartikel und MF59-Mikroemulsionen wurden unter Verwendung von DOTAP 40 oder DOTAP 80 und unter Verwendung von p55-DNA als Antigen in einer Dosierung von 1 µg, außer wenn es anders angegeben wurde, wie vorher beschrieben, hergestellt und zur Immunisierung von Mäusen wie folgt verwendet:

Gruppe 1 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-DNA, bruchfrei (d.h. die Partikel wurden vor der Immunisierung *in vitro* zerbrochen).
 Gruppe 2 verwendete PLG/CTAB-Partikel mit adsorbiertem p55-DNA.
 Gruppe 3 verwendete PLG/CTAB-Partikel (nicht gefriergetrocknet) mit adsorbiertem p55-DNA.
 Gruppe 4 verwendete eine MF59/DOTAP-40-Emulsion mit adsorbiertem p55-DNA.
 Gruppe 5 verwendete eine MF59/DOTAP-40-Emulsion mit adsorbiertem p55-DNA in einer Dosierung von 10 µg.
 Gruppe 6 verwendete eine MF59/DOTAP-80-Emulsion mit adsorbiertem p55-DNA.
 Gruppe 7 verwendete eine MF59/DOTAP-80-Emulsion mit adsorbiertem p55-DNA in einer Dosierung von 10 µg.

Gruppe 8 verwendete freie p55-DNA.

Gruppe 9 verwendete freie p55-DNA in einer Dosierung von 10 µg.

Gruppe 10 verwendete eine MF59-Emulsion mit freier p55-DNA in einer Dosierung von 10 µg.

[0222] Für jede Gruppe wurden 10 Mäuse mit ausreichenden Mengen an Mikropartikeln oder freien Molekülen so immunisiert, dass die Dosierung der p55-DNA, wie angegeben, 1 oder 10 µg betrug. Der Immunisierungsweg war i.m. TA. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-DNA-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 20G erscheinen. Das Serum wurde 4wp1 (vier Wochen nach der ersten Immunisierung) und 2wp2 (zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung) gemessen.

TABELLE 20G

IgG-Titer im Serum			
Gruppe	Form des Antigens p55-DNA	Titer im Serum [GMT/(SE)]	
		4wp1	2wp2
1	an PLG/CTAB-Partikeln (bruchfrei) adsorbiert	25 (52)	23 900 (3326)
2	an PLG/CTAB-Partikeln adsorbiert	13 (6)	11 800 (3242)
3	an PLG/CTAB-Partikeln (nicht gefriergetrocknet) adsorbiert	8 (3)	8 877 (1964)
4	an eine MF59/DOTAB-40-Emulsion adsorbiert (1 µg)	5 (8)	5 141 (2950)
5	an eine MF59/DOTAB-40-Emulsion adsorbiert (10 µg)	135 (74)	38 100 (6150)
6	an eine MF59/DOTAB-80-Emulsion adsorbiert (1 µg)	22 (33)	8 901 (4067)
7	an eine MF59/DOTAB-80-Emulsion adsorbiert (10 µg)	147 (70)	75 900 (6992)
8	frei (1 µg)	4 (1)	7 (18)
9	frei (10 µg)	49 (64)	1 995 (2052)
10	an eine MF59-Emulsion adsorbiert (10 µg)	13 (11)	6 690 (2592)

Beispiel 24

[0223] Auslösung einer Immunantwort in Meerschweinchen durch Mikropartikel PLG/CTAB-Mikropartikel mit adsorbiertem gp120-DNA wurden, wie vorstehend in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, gebildet. Andere Proben sind wie nachstehend in Tabelle 20 gezeigt und schlossen die Mikropartikel mit und ohne Aluminiumphosphat, Kontrollen aus freiem, löslichem gp120 mit und ohne Aluminiumphosphat und MF59-Protein, das durch gp120-DNA kodiert wird, ein. Eine i.m.-Immunisierung von Meerschweinchen und eine Antikörperinduktion (Entnahme und Analyse von Serum) wurden, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 21 gezeigt.

TABELLE 21

Formulierung	GMT	SE
PLG/CTAB mit adsorbiertem gp120 (25 µg)	1435	383
PLG/CTAB mit adsorbiertem gp120 (25 µg) + Alumphosphat	3624	454
lösliche gp120-DNA (25 µg) + Alumphosphat	119	606
lösliche gp120-DNA (25 µg) allein	101	55
MF59-Protein (50 µg)	3468	911

Beispiel 25

Intranasale (i.n.) Immunisierung mit an Mikropartikeln adsorbiert p55-DNA

[0224] PLG/CTAB-Mikropartikel mit adsorbiert p55-DNA und PLG/DDA-Mikropartikel mit adsorbiert p55-DNA wurden, wie vorstehend in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, gebildet. Eine i.n.-Immunisierung von Mäusen mit 25 oder 100 µg, eine Antikörperinduktion (Entnahme und Analyse von Serum) und eine CTL-Induktion wurden, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, zwei und vier Wochen nach der 1. Immunisierung (2wp1, 4wp1), zwei und vier Wochen nach der 2. Immunisierung (2wp2, 4wp2) und zwei und vier Wochen nach der 3. Immunisierung (2wp3, 4wp3) durchgeführt. Die Kontrollen schlossen eine Immunisierung mit löslicher p55-DNA allein oder mit 10 µg Choleratoxin ein. Die Ergebnisse für die Antikörperinduktion sind in Tabelle 22 gezeigt, und die Ergebnisse für die Lyse durch CTL (4 Wochen nach der 4. Immunisierung) sind nachstehend in Tabelle 23 gezeigt.

TABELLE 22

Formulierung	2wp1	4wp2	2wp2	4wp2	2wp3	4wp3
PLG/CTAB mit adsorbiert p55-DNA (25 µg)	189	529	1412	882	908	742
PLG/CTAB mit adsorbiert p55-DNA (100 µg)	128	383	3462	2887	289000	134000
PLG/DDA mit adsorbiert p55-DNA (25 µg)	247	482	1223	338	940	545
PLG/DDA mit adsorbiert p55-DNA (100 µg)	143	1351	2538	1341	357000	161000
lösliche p55-DNA (100 µg) + Choleratoxin (10 µg)	195	270	2298	617	1549	862
lösliche p55-DNA (100 µg) allein	362	260	618	190	285	263

TABELLE 23

SPEZIFISCHE LYSE VON ZIELZELLEN IN PROZENT					
Gruppe	Formulierung	Dosis der p55-DNA	Verhältnis der Zielzellen	SvB pGAG ^a	SvB P7g ^{a,b}
1	PLG/CTAB mit adsorbiert p55-DNA	100 µg	60	-1	82
			15	-1	53
			4	12	25
2	PLG/DDA mit adsorbiert p55-DNA	100 µg	60	10	47
			15	3	26
			4	2	8
3	p55-DNA plus Choleratoxin (10 µg)	100 µg	60	9	64
			15	2	22
			4	0	7
4	p55-DNA allein	100 µg	60	4	6
			15	2	3
			4	1	1

^aSvB-Zelllinie mit irrelevantem Peptid pulsimmunisiert^bSvB-Zelllinie mit p7g-Peptid pulsimmunisiert

Beispiel 26

Herstellung von Hilfsmittelzusammensetzungen

[0225] MTP-PE wurde von CIBA-GEIGY (Basel, Schweiz) bereitgestellt. Squalen und TWEEN® 80 wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) erhalten. CFA und IFA wurden von Gibco (Grand Island, NY) erhalten. Aluminiumhydroxid (Rehsorptar) wurde von Reheis Chemical Co. (Berkeley Heights, NJ) erhalten.

[0226] Die Herstellung von Öltröpfchenemulsionen wurde durch mehrere Verfahren durchgeführt. In dem ersten Verfahren wurde ein Gemisch, bestehend aus 4 % Squalen, 0,008 % TWEEN® 80, 250 µg/ml MTP-PE und Antigen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), 6-mal durch eine Nadel mit 23 Gauge geleitet. Diese Emulsion bestand aus Öltröpfchen mit einer Größe im Bereich von 10 µm und wird als MTP-PE-LO bezeichnet. Das zweite Verfahren umfasst das fünfmalige Hindurchleiten des vorstehend beschriebenen Gemisches durch einen Kirkland-Emulgator. Diese Emulsion besteht aus Öltröpfchen mit hauptsächlich 1–2 µm und wird als MTP-PE-LO-KE bezeichnet. Der Kirkland-Emulgator (Kirkland Products, Walnut Creek, CA) ist eine Version des handelsüblichen Messerhomogenisators (z.B. das Modell 30CD von Gaulin und Rainin Minilab Typ 8.30H) im kleinen Maßstab, der etwa 1000 psi in der Arbeitskammer erzeugt. In dem dritten Verfahren wurden Gemische, die 0,3–18 % Squalen und MTP-PE mit 0,2–1,0 mg/ml mit oder ohne TWEEN® 80 enthielten, mit 5000–30000 psi durch den Microfluidizer (Modell Nr. 110Y, Microfluidics, Newton, MA) geleitet. Typischerweise wurden 50 ml der Emulsion 5 Minuten oder 100 ml 10 Minuten in dem Microfluidizer gemischt. Die so erhaltenen Emulsionen bestanden, abhängig von der Squalen-, MTP-PE- und Detergenskonzentration und dem Betriebsdruck und der Betriebstemperatur des Microfluidizers, aus Öltröpfchen mit 100–750 nm. Diese Zusammensetzung wird als MTP-PE-LO-MF bezeichnet.

Beispiel 27

Herstellung von Mikropartikeln unter Verwendung von CTAB

[0227] Reine Mikropartikel wurden unter Verwendung von CTAB wie folgt hergestellt. Verwendete Lösungen:

(1) 4 % RG 504 PLG (Boehringer Ingelheim) in Dimethylchlorid.

(2) 0,5 % CTAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Wasser.

[0228] Im besonderen wurden die Mikropartikel durch Vereinigen von 12,5 ml Polymerlösung mit 1,25 ml destilliertem Wasser und 3-minütiges Homogenisieren unter Verwendung eines Tischhomogenisators von Omni mit einer 10 mm Sonde mit 10000 UpM hergestellt, wobei eine w/o-Emulsion gebildet wurde. Die w/o-Emulsion

wurde zu 50 ml der 0.5 %igen CTAB-Lösung gegeben und 3 Minuten homogenisiert, wobei eine w/o/w-Emulsion gebildet wurde. Man ließ die w/o/w-Emulsion zur Abdampfung des Lösungsmittels über Nacht röhren, wobei Mikropartikel gebildet wurden. Die gebildeten Mikropartikel wurden dann durch ein Sieb mit 38 µm filtriert, 4-mal mit Wasser unter Zentrifugation gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel wurden anschließend für die zukünftige Verwendung in einem Mastersizer von Malvern der Größe nach sortiert.

Beispiel 28

Wirkung von MPL und CpG-Oligonucleotiden auf den Phänotyp der Immunantwort

[0229] Gruppen von 10 Mäusen wurden wie folgt immunisiert: Gruppe 1) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein in Gegenwart und Abwesenheit von CpG-Oligonucleotiden; Gruppe 2) MF59 mit eingebrachtem Monophosphoryllipid A (MPL) mit HIV-p55-gag-Protein; Gruppe 3) SDS/PLG-Mikropartikel mit auf der Oberfläche adsorbiertem HIV-p55-gag-Protein in Gegenwart und Abwesenheit von CpG-Oligonucleotiden; Gruppe 4) SDS/PLG-Mikropartikel mit adsorbiertem p55 mit MPLs; Gruppe 5) rekombinantes Protein mit MPL; und Gruppe 6) rekombinantes Protein allein. Die MF59-Dosis betrug 25 µl pro Tier, das HIV-p55-Protein betrug 25 µg pro Tier, das CpG-Oligonucleotid betrug 50 µg pro Tier, und MPL wurde mit 10 µg pro Tier verabreicht. Die Mikropartikel wurden in einer Dosis, die 25 µg Protein enthielt, verabreicht.

[0230] MPL wurde von Ribi Immunochem Res. Inc. (Hamilton, Montana) erhalten. MPL/MF59 wurde durch Lösen von MPL in CHCl₃, Überführen der Lösung in Squalen/Span 85 und Formulieren der MF59-Standardeulsion mit Tween 80/H₂O hergestellt.

[0231] Rekombinantes p55-gag-Protein aus Hefe wurde durch Standardfermentationsverfahren, die Fachleuten allgemein bekannt sind, und in denen die Hefe durch eine Dynomill aufgebrochen wird, hergestellt. Das p55-Protein wurde aus dem pelletisierten Material, das aus dem Zelllysat in Harnstoff/NaCl-Puffer erhalten wurde, extrahiert. Das harnstofflösliche Protein wurde durch Anionenaustauschchromatographie in Gegenwart von 6 M Harnstoff bis zu einer Homogenität von >90 % gereinigt.

[0232] Die Mäuse erhielten drei intramuskuläre Injektionen in wöchentlichen Zeitabständen, und Serumproben wurden zwei Wochen nach der dritten Injektion entnommen und hinsichtlich des Gesamt-IgG (G + M + A), IgG1 und IgG2a unter Verwendung eines Chemilumineszenz-ELISAs auf der Basis von CA-Aequorn (Sealite Inc., Norcross, GA) untersucht. Die Ergebnisse aus einem typischen Test sind in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt. Im Fall der adsorbierten Mikropartikel zeigten Tiere, welche die CpG-Oligonucleotide erhielten, eine 19-mal stärkere IgG2a-Antwort als die der adsorbierten Partikel allein, eine 7-mal stärkere Antwort als adsorbierte Partikel mit MPLs und eine 17-mal stärkere Antwort als das Protein allein. Im Fall des Proteins mit MF59 zeigten Tiere, welche die CpG-Oligonucleotide erhielten, eine 7-mal stärkere IgG2a-Antwort als die in Abwesenheit der CpG-Oligonucleotide ausgelöste, 2,6-mal stärker als die Kombination aus MF59 und MPLs, 15-mal stärker als Protein mit MPLs und 23-mal stärker als Protein allein. Die Ergebnisse zeigen, dass CpG-Oligonucleotide in Kombination mit entweder MF59 oder PLG-Mikropartikeln eine Antwort der Th1-Lymphozyten stimulieren, die wesentlich stärker als die durch MPLs mit entweder MF59 oder PLG-Mikropartikeln ausgelöste Antwort ist.

[0233] Oligonucleotide wurden durch Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR) hergestellt. CpG1 umfasst SEQ ID Nr.: 28. CpG2 umfasst die nicht-CpG-Sequenz tccaggacttctcagg (SEQ ID Nr.: 29).

Beispiel 29

i.m.-Immunisierung mit p55-gag-Protein und verschiedenen Hilfsmitteln

[0234] Gruppen von 9 Mäusen wurden, außer wo es angemerkt wurde, intramuskulär wie folgt immunisiert: Gruppe 1) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein und DOTAP 80 in Gegenwart von CpG1-Oligonucleotid; Gruppe 2) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein und DOTAP 160 in Gegenwart von CpG1-Oligonucleotid; Gruppe 3) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein und DOTAP; Gruppe 4) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein; Gruppe 5) MF59 mit rekombinantem HIV-p55-gag-Protein in Gegenwart von CpG1-Oligonucleotid; Gruppe 6) rekombinantes HIV-p55-gag-Protein und DOTAP 160; Gruppe 7) rekombinantes HIV-p55-gag-Protein und CpG1-Oligonucleotid; Gruppe 8) rekombinantes HIV-p55-gag-Protein und DOTAP 160 in Gegenwart von CpG1-Oligonucleotid; und Gruppe 9) vv-gag-pol (2 × 10⁷ PFU) i.p.. Die MF59-Dosis betrug 25 µl pro Tier, das HIV-p55-Protein betrug 25 µg pro Tier und das CpG-Oligonucleotid betrug 50 µg pro Tier. Nach der Immunisierung wurde der anti-p55-IgG-Titer im Serum gemessen, wobei die Ergebnisse in [Fig. 3](#) erscheinen. Wie ersichtlich ist, ist der Antikörpertiter in Gegenwart einer positiv geladenen

Emulsion (mit DOTAP) zweimal so hoch wie in Abwesenheit einer positiv geladenen Emulsion (ohne DOTAP). Die Lyse von Zielzellen (SvB-Zellline) durch CTL wurde ebenfalls mit jeder Gruppe gemessen, wobei die Ergebnisse in [Fig. 4](#) erscheinen. Wie ersichtlich ist, verstärkt die Zugabe von DOTAP, die zu einer positiv geladenen Emulsion führt, die CTL-Antwort.

Beispiel 30

Ionische Emulsionen als Hilfsmittel

[0235] Submikronemulsionen, die ionische oberflächenaktive Mittel enthalten, wurden unter Verwendung einer nicht-ionisch stabilisierten MF59-Formulierung formuliert. Mehrere ionische oberflächenaktive Mittel wurden hinsichtlich der Löslichkeit in Squalen geprüft. Von drei ionischen Detergenzien, Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP), Dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin (DEPC) und Dioleoylphosphatidsäure (DPA), wurde festgestellt, dass sie in Squalen löslich sind. Prototypische, ionische Emulsionen wurden durch Lösen jedes der Detergenzien in Squalen/10 % Span 85 in Konzentrationen, die in einem Bereich von 4 bis 52 mg/ml Squalen liegen, formuliert. Die Gemische aus Squalen/oberflächenaktivem Mittel wurden mit 0.5 % Tween 80/H₂O mit 5 ml Squalen/100 ml H₂O emulgiert. Eine Voremulsion wurde durch Homogenisierung mit einem Silverson-Homogenisator (5 Minuten, 5000 UpM) gebildet, und die Endemulsionen wurden durch Mikrofluidisation (~10000 psi, 5 Durchläufe, Microfluidizer 110S) hergestellt. Die Emulsionen jedes Typs wurden hinsichtlich der Tröpfchengröße und des Zeta-Potentials geprüft. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 24 gezeigt.

TABELLE 24

Emulsion	mittlere Tröpfchengröße (nm)	Zeta-Potential (mV)
MF/DOTAP/160	210	+51
MF/DOTAP/160/CpG	171	-2
MF/DOTAP/80	145	+42
MF/DEPC/160	168	+26,5
MF/DPA/160	162	-35,7
MF59	~150	-20

[0236] MF59/DOTAP/160 und MF59/DOTAP/80 wurden hinsichtlich der Bindung von sowohl DNA als auch CpG-ODN geprüft. Zwei MF59/DOTAP-Formulierungen, 160 mg/100 ml DOTAP und 80 mg/100 ml DOTAP, wurden verwendet, um p55-DNA zu adsorbieren. Die Emulsionen wurden jeweils mit DNA mit 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Kontrolle aus MF59/Wasser ohne DOTAP wurde ebenfalls mit 50, 100 und 200 µg DNA inkubiert. Die Emulsionen wurden unter Verwendung einer Airfuge zentrifugiert, und der Überstand jeder Probe wurde mit Säure hydrolysiert und in dem DNA-Test eingesetzt (da eine ausreichende Trübung für eine Störung der A₂₆₀-Messungen vorhanden war). Die Kontrollproben mit MF59 ohne DOTAP wurden verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen, aus der die Menge an DNA, die in dem Überstand der MF59/DOTAP-Proben verblieben war, berechnet wurde, wobei die Ergebnisse nachstehend in Tabelle 25 gezeigt sind.

TABELLE 25

Formulierung	Einsatz an DNA in µg	tatsächliche adsorbierte µg	Leistung in %
59/160	50	49,7	99,56
59/160	100	99,6	99,6
59/160	200	132	66
59/80	50	48,5	97
59/80	100	67,6	67,6
59/80	200	73	36

[0237] MF59 wurde mit DOTAP in Squalen hergestellt. Dieses wurde mit CpG mit 0,5 mg/ml über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wurde die Emulsion in einer Eppendorfzentrifuge 50 min zentrifugiert, und man ließ den Überstand auf einer GPC-Säule laufen. 0,5/ml CpG wurden zu normalem MF59 gegeben, zentrifugiert und dann auf der Säule analysiert. Die Menge an CpG in dem MF59/DOTAP-Überstand betrug 50 % der des

mit CpG versetzten MF59, was zeigt, dass fast 50 % des CpG-Einsatzes tatsächlich in der Ölphase vorliegen.

[0238] Als nächstes wurde eine Adsorptionsisotherme aufgestellt, wobei CpG mit 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml zu MF59/DOTAB gegeben wurde. Dieses wurde etwa 4 Tage bei 4°C belassen, und anschließend wurden die Proben zusammen mit MF59, das mit CpG mit 0.5 mg/ml versetzt worden war, in einer Airfuge zentrifugiert.

[0239] Man ließ den Überstand (der sehr klar war) zusammen mit einer Standardkurve, die mit dem versetzten MF59 mit 0.5 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg erstellt worden war, auf einer GPC-Säule laufen. Die Adsorption in Prozent wurde gemessen, und die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 26 gezeigt.

TABELLE 26

Einsatz an CpG in µg/ml	adsorbiert in %
100	100
500	97
1000	65
2000	42

Patentansprüche

1. Emulsion, umfassend Tröpfchen mit einem Durchmesser von unter 1 µm und mit einer adsorbierenden Oberfläche, wobei die Emulsion umfaßt:

- (a) ein abbaubares Öl;
 - (b) einen Emulgator, umfassend ein ionisches Detergens; und
 - (c) mindestens ein biologisch aktives Makromolekül ausgewählt aus einem Polypeptid, einem Polynukleotid, einem Polynukleosid, einem Antigen, einem Arzneistoff, einem Hormon, einem Enzym, einem Transkriptions- oder Translationsmittler, einem Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einem Immunmodulator und einem Hilfsmittel,
- wobei das biologisch aktive Makromolekül an der Oberfläche der Emulsion adsorbiert wird.

2. Emulsion gemäß Anspruch 1, wobei das Öl und der Emulgator in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion vorliegen, welche Öltröpfchen aufweist, wobei mindestens 80% (Anzahl) der Öltröpfchen einen Durchmesser von unter 1 µm aufweisen, und wobei die Zusammensetzung in Abwesenheit eines Polyoxypropyl-Polyoxyethylen-Blockcopolymers existiert.

3. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Öl eines aus einem tierischen Öl, einem ungesättigten Kohlenwasserstoff, einem Terpenoid und einem pflanzlichen Öl ist.

4. Emulsion gemäß Anspruch 3, wobei das Öl ein Terpenoid ist, welches Squalen ist.

5. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung 0,5 bis 20 Volumenprozent des Öls in einem wässrigen Medium umfaßt.

6. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung 0,01 bis 0,5 Gew.-% des Emulgators umfaßt.

7. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator weiterhin ein nicht-ionisches Detergens umfaßt.

8. Emulsion gemäß Anspruch 7, wobei der Emulgator einen Polyoxyethylensorbitan-mono, -di- oder -triester oder einen Sorbitanmono-, -di- oder -triether umfaßt.

9. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator ein kationisches Detergens umfaßt.

10. Emulsion gemäß Anspruch 9, wobei das kationische Detergens ausgewählt ist aus Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Benzalkoniumchlorid, Dimethyldioctadecylammoniumbromid, Dioleoyl-3-trimethylam-

moniumpropan, Dodecyltrimethylammoniumbromid, Benzylidimethylhexadecylammoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid und 4-Picolindodecylsulfat.

11. Emulsion gemäß Anspruch 9 oder 10, wobei die Zusammensetzung 0,01 bis 0,5 Gew.-% des kationischen Detergents umfaßt.
12. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator ein anionisches Detergent umfaßt.
13. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Makromolekül ein Hilfsmittel ausgewählt aus einem CpG Oligonucleotid, einem Aluminiumsalz, einer Bakterienzellwandkomponente und Muramylpeptid ist.
14. Emulsion gemäß Anspruch 13, wobei das Oligonucleotid mindestens eine Phosphorthioatbindung umfaßt.
15. Emulsion gemäß Anspruch 14, wobei das Oligonucleotid mindestens eine Peptidnucleinsäurebindung umfaßt.
16. Emulsion gemäß Anspruch 15, wobei das Oligonucleotid eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus SEQ ID Nrn.: 1–28 umfaßt.
17. Emulsion gemäß einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei das Oligonucleotid ein CpG-Strukturleitmotiv flankiert von zwei Purinen unmittelbar 5' an diesem Motiv und zwei Pyrimidinen unmittelbar 3' an diesem Motiv umfaßt.
18. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Antigen aus einem Virus stammt.
19. Emulsion gemäß Anspruch 18, wobei das virale Antigen eine virale Untereinheit umfaßt.
20. Emulsion gemäß Anspruch 18 oder 19, wobei der Virus ausgewählt ist aus einem Hepatitis C-Virus (HCV), einem Hepatitis B-Virus (HBV), einem Herpes Simplex-Virus (HSV), einem HIV-Virus, einem Zytomegalie-Virus (CMV), einem Influenza-Virus (Grippe) und einem Tollwut-Virus.
21. Emulsion gemäß Anspruch 20, wobei das Antigen ausgewählt ist aus HSV Glycoprotein gD, HIV Glycoprotein gp120 und HIV p55 gag.
22. Emulsion gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Antigen aus einem Bakterium stammt.
23. Emulsion gemäß Anspruch 22, wobei das Bakterium ausgewählt ist aus Cholera, Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Helicobacter pyloris und Haemophilus influenzae.
24. Emulsion gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Antigen aus einem Parasiten stammt.
25. Emulsion gemäß Anspruch 24, wobei der Parasit ein Malaria-parasit ist.
26. Emulsion gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung in der Medizin.
27. Verwendung der Emulsion gemäß einem der Ansprüche 1 bis 25 zur Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines Tieres.
28. Verwendung gemäß Anspruch 27, wobei das Tier ein Säugetier ist.
29. Verwendung gemäß Anspruch 28, wobei das Säugetier ein Mensch ist.
30. Zusammensetzung, umfassend die Emulsion gemäß einem der Ansprüche 1 bis 25 und einen Mikropartikel mit einer adsorbierenden Oberfläche, wobei das Mikropartikel ein Polymer ausgewählt aus einer Poly(α-hydroxysäure), einer Polyhydroxybuttersäure, einem Polycaprolacton, einem Polyorthoester, einem Poly-anhydrid und einem Polycyanoacrylat; und ein zweites Detergens umfaßt.

31. Zusammensetzung gemäß Anspruch 30, wobei das Mikropartikel weiterhin ein erstes biologisch aktives Makromolekül adsorbiert auf dessen Oberfläche umfaßt, wobei das erste biologisch aktive Makromolekül mindestens eines ausgewählt aus einem Polypeptid, einem Polynucleotid, einem Polynucleosid, einem Antigen, einem Arzneistoff, einem Hormon, einem Enzym, einem Transkriptions- oder Translationsmittler, einem Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einem Immunmodulator und einem Hilfsmittel ist.

32. Zusammensetzung gemäß Anspruch 30 oder 31, wobei das Mikropartikel weiterhin ein zweites biologisch aktives Makromolekül, welches in dem Mikropartikel verkapselt ist, umfaßt, wobei das zweite biologisch aktive Makromolekül mindestens eines ausgewählt aus einem Polypeptid, einem Polynucleotid, einem Polynucleosid, einem Antigen, einem Arzneistoff, einem Hormon, einem Enzym, einem Transkriptions- oder Translationsmittler, einem Zwischenprodukt in einem Stoffwechselweg, einem Immunmodulator und einem Hilfsmittel ist.

33. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 32, wobei das Mikropartikel eine Poly(α -hydroxysäure) ausgewählt aus Poly(L-lactid), Poly(D,L-lactid) und Poly(D,L-lactid-co-glykolid) umfaßt.

34. Zusammensetzung gemäß Anspruch 33, wobei das Mikropartikel Poly(D,L-lactid-co-glykolid) umfaßt.

35. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei das zweite Detergens ein kationisches Detergens ist.

36. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei das zweite Detergens ein anionisches Detergens ist.

37. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei das zweite Detergens ein nicht-ionisches Detergens ist.

38. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 37, wobei das erste biologisch aktive Makromolekül ein Antigen ausgewählt aus gp120, p24gag, p55gag und Influenza A-Hämagglutininantigen ist.

39. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 37, wobei das erste biologisch aktive Makromolekül ein Polynucleotid, welches pg120 kodiert, ist.

40. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 37, wobei das zweite biologisch aktive Makromolekül ein Hilfsmittel ist.

41. Zusammensetzung gemäß Anspruch 40, wobei das Hilfsmittel, welches an dem Mikropartikel adsorbiert ist, ein Aluminiumsalz ist.

42. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 41, weiterhin umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.

43. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 42, weiterhin umfassend ein nicht-adsorbiertes Hilfsmittel.

44. Zusammensetzung gemäß Anspruch 43, wobei das nicht-adsorbierte Hilfsmittel eines ausgewählt aus CpG Oligonucleotiden, LTK63, LTR72, MPL, QS21, QuilA und einem Aluminiumsalz, ist.

45. Zusammensetzung gemäß Anspruch 44, wobei das nicht-adsorbierte Hilfsmittel ein Aluminiumphosphat ist.

46. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 45 zur Verwendung in der Medizin oder Diagnostik.

47. Verwendung der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 45 zur Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines Tieres.

48. Verwendung gemäß Anspruch 47, wobei das Tier ein Säugetier ist.

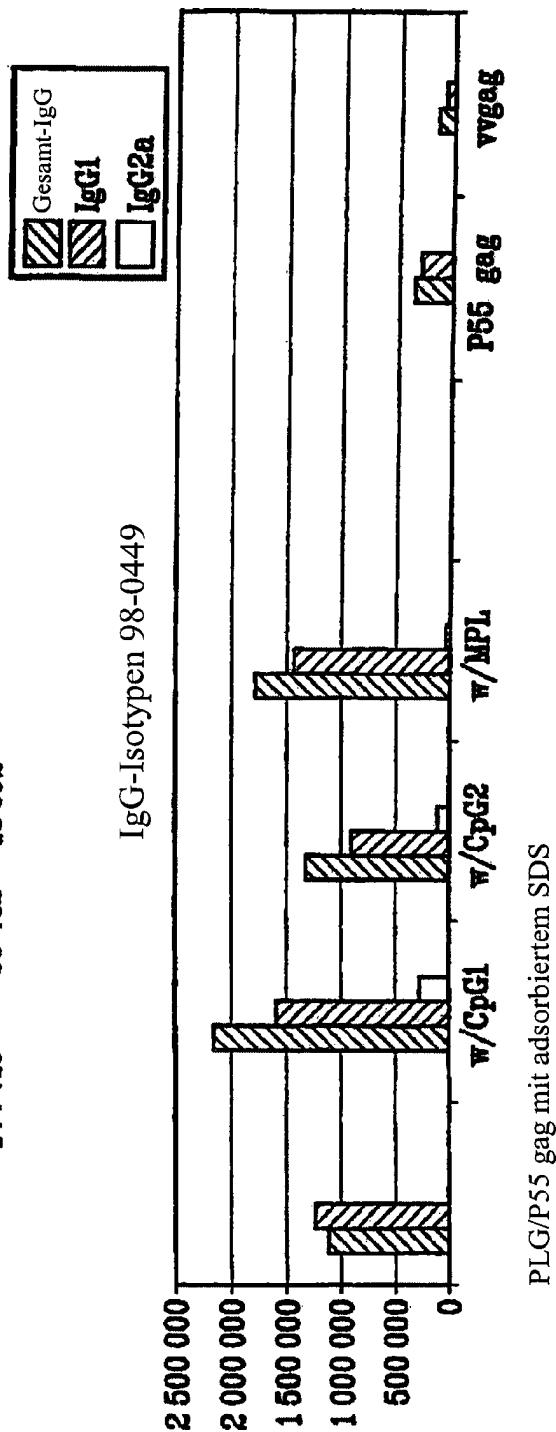
49. Verwendung gemäß Anspruch 48, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Gruppen Gesamt-IgG IgG1 IgG2a

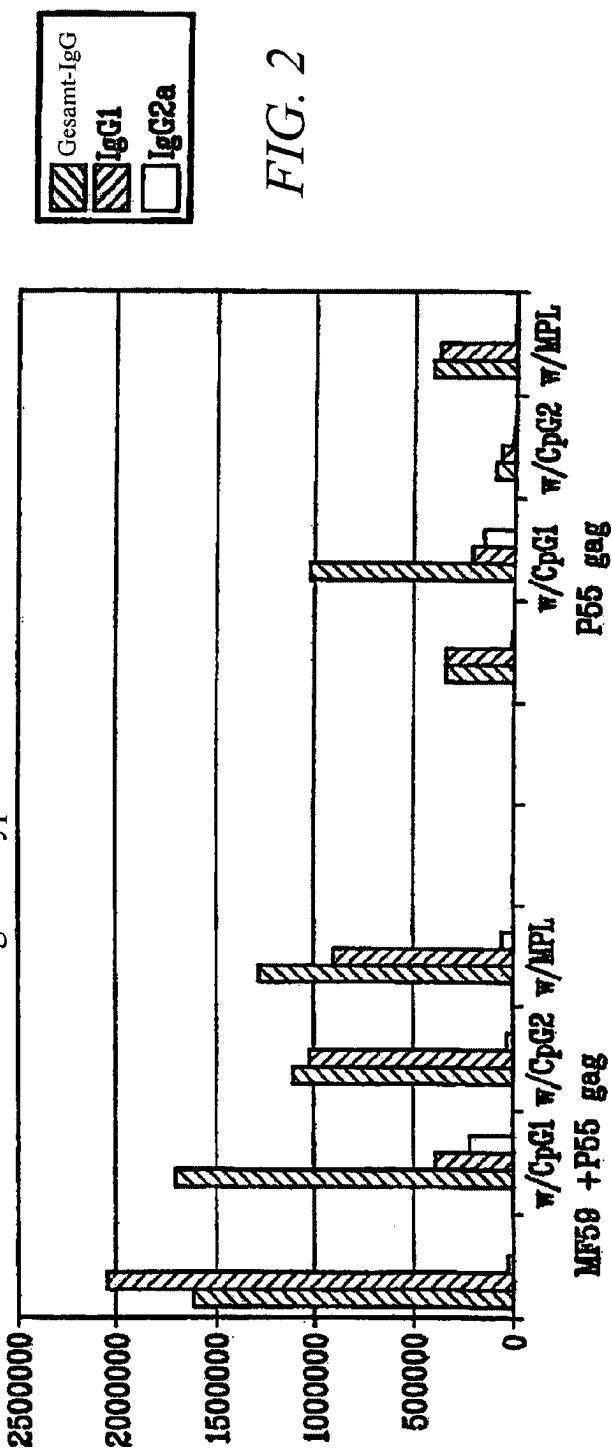
1	156 070	1213 515	12 337
W/CpG1	2 177 283	1 619 452	238 174
W/CpG2	1 300 018	914 905	84 834
W/MPL	1 775 948	1 441 437	32 085
P55 gag	281 840	254 977	13 582
Wvgag	144 719	65 432	13 692

FIG. 1



98-0450		Gruppen Gesamt-IgG	IgG1	IgG2a	IgG1/gesamt IgG2a/gesamt
		1627784.5	2039181	29038	125
w/CpG1		1684281.5	388655	21314	23
w/CpG2		1119387.5	1031058	42307	13
w/MPL		1288791	864820	81712	4
		365908.5	368601	9236	92
w/CpG1		1023830.5	230807	137205	23
w/CpG2		11442.5	75773	7029	68
w/MPL		426249.5	367840	14166	66
					3
					13
					6
					3

IgG-Isotypen 98-0450



**Serum-IgG
3wp2 - 7/27/99**

Gruppe	Hilfsmittel	Hilfsmitteldosis	Antigenname & -dosis	Weg	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	Verdünnung	Titer
1	MF59/ Dotap 80/CPG1	25 µl MF59-50 µg	CPG P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	988	854	911	100	9100
2	MF59/ Dotap 160/CPG1	25 µl MF59-60 µg	CPG P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	1201	914	1058	100	105750
3	MF59/ Dotap	25 µl MF59	P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	408	387	398	100	39750
4	MF59-0	25 µl MF59	P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	110	107	109	100	10850
5	MF59 + CPG1	25 µl MF59-50 µg	CPG P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	569	453	511	100	51100
6	DOTAP	-	P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	25	28	28	100	2550
7	CPG1	50 µg	P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	25	24	25	100	2450
8	CPG + DOTAP	-	P55-gag-Protein 25 µg	i.m. TA	52	50	51	100	5100
9	kein Hilfsmittel	-	v gag pol 1x10 ⁻⁷	i.p.	7	7	7	100	700

FIG. 3

Formulierungen von p55-Protein mit MF59/DOTAB/CPG

FIG. 4

GRUPPE	VERHÄLTNIS DER ZIELZELLEN	relevant	
Antigen Hilfsmittel Weg		SvB p7g	SvB gagB
1 MF59/Dotab 80/CPG1 p55-Protein (25 µg) i.m. TA spon. Freisetzung in %	60 15 4	30 11 2 12	-2 -2 -2 11
2 MF59/Dotab 160/CPG1 p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	49 21 6	4 1 0
3 MF59/Dotab p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	23 7 5	2 0 0
4 MF59-0 p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	13 2 -1	1 0 -2
5 MF59 + CPG1 p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	15 4 0	0 0 0
6 DOTAB p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	46 15 3	4 0 -1
7 CPG1 p55-Protein i.m. TA	60 15 4	23 7 0	-2 -2 -2
8 CPG + DOTAB p55-Protein (25 µg) i.m. TA	60 15 4	28 11 4	1 0 -1
9 vv-gag-pol 2 x 10 ⁷ PFU i.p.	60 15 4	70 31 19	1 -1 -1