



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 24 893 T2** 2006.07.06

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 410 805 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 24 893.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 078 635.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.12.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/295** (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9921146 07.09.1999 GB

(73) Patentinhaber:

GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, BE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Wettendorff, Martine Anne Cecile, 1330 Rixensart,
BE**

(54) Bezeichnung: **Impfstoff gegen HPV**

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

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

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Impfstoffformulierungen, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung in der Therapie. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Kombinationsimpfstoffe zur Verabreichung an Jugendliche.

[0002] Papillomaviren sind kleine DNA-Tumorzellen, die hochgradig artspezifisch sind. Bisher wurden mehr als 70 einzelne menschliche Papillomavirus (HPV)-Genotypen beschrieben. HPVs sind im Allgemeinen spezifisch entweder in Bezug auf die Haut (z.B. HPV-1 und -2) oder in Bezug auf Schleimhautoberflächen (z.B. HPV-6 und -11) und lösen normalerweise gutartige Tumoren (Warzen) aus, die über mehrere Monate oder Jahre bestehen bleiben. Solche gutartigen Tumore können für die Betroffenen quälend sein, sind jedoch bis auf wenige Ausnahmen eher nicht lebensbedrohlich.

[0003] Einige HPVs stehen ebenso mit Krebs in Verbindung. Die am meisten zutreffende Verbindung zwischen HPV und menschlichem Krebs ist diejenige, die zwischen HPV-16 und HPV-18 und Gebärmutterhalskrebs besteht. Gebärmutterhalskrebs ist die am häufigsten auftretende bösartige Geschwulst in den Entwicklungsländern, wobei jedes Jahr weltweit etwa 500.000 neue Fälle auftreten. Es ist nun technisch möglich, primäre HPV-16-Infektionen und sogar bestehenden HPV-16 enthaltenden Krebs unter Verwendung von Impfstoffen aktiv zu bekämpfen. Einen Überblick über die Aussichten der prophylaktischen und therapeutischen Impfung gegen HPV-16 geben Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293–306 und Hagenessee M.E., Infections in Medicine 1997-14(7) 555–556, 559–564.

[0004] Weitere HPVs von besonderem Interesse sind die Serotypen 31, 33 und 45.

[0005] Heutzutage wurden die verschiedenen Arten von HPVs mit Hilfe von Clonierungssystemen in Bakterien und in jüngster Zeit mit Hilfe von PCR-Amplifikation isoliert und charakterisiert. Der molekulare Aufbau der HPV-Genome wurde auf Basis von Vergleichen mit dem molekularen Aufbau des bestens charakterisierten Rinderpapillomavirus Typ 1 (BPV1) bestimmt.

[0006] Obwohl geringe Variationen auftreten, besitzen alle beschriebenen HPVs-Genome mindestens sieben frühe Gene, E1 bis E7, und zwei späte Gene L1 und L2. Zusätzlich besitzt eine stromaufwärts gelegene regulatorische Region die regulatorischen Sequenzen, die die meisten transkriptionellen Ereignisse des HPV-Genoms zu kontrollieren scheinen.

[0007] E1- und E2-Gene sind an der viralen Replikation bzw. der transkriptionellen Kontrolle beteiligt und neigen dazu, durch virale Integration zerstört zu werden. E6 und E7 und, wie jüngere Ergebnisse implizieren, auch E5 sind an der viralen Transformation beteiligt.

[0008] Bei den in Gebärmutterhalskrebs involvierten HPVs wie beispielsweise HPV 16 und 18 beginnt der onkogene Prozess nach Integration der viralen DNA. Die Integration führt zur Inaktivierung von Genen, die die Kapsidproteine L1 und L2 codieren, sowie zu einer andauernden Überexpression der beiden frühen Proteine E6 und E7, die zum stufenweisen Verlust der normalen Zelldifferenzierung und zur Entwicklung des Karzinoms führen werden.

[0009] Karzinome des Gebärmutterhalses kommen bei Frauen häufig vor und entwickeln sich über eine präkanzeröse Zwischenstufe zum invasiven Karzinom, das häufig zum Tod führt. Die Zwischenstufen der Erkrankung sind als cervikale intraepitheliale Neoplasie bekannt und werden als Grad I bis III in Bezug auf die zunehmende Schwere eingestuft.

[0010] Klinisch äußert sich die HPV-Infektion des weiblichen Anogenitaltrakts als flache cervikale Kondylome, deren besonderes Kennzeichen die Koilocytose ist, die hauptsächlich die oberflächlichen und intermediären Zellen des Cervix-Plattenepithels betrifft.

[0011] Koilocyten, die die Folge einer cytopathischen Wirkung des Virus sind, treten als Mehrkernzellen mit einem klaren perinukleären Halo auf. Das Epithel ist durch abnormale Keratinisierung verdickt, die für die warzenartige Erscheinung der Läsion verantwortlich ist.

[0012] Derartige flache Kondylome, wenn sie positiv für die HPV-16- oder -18-Serotypen sind, sind Hochrisiko-Faktoren für die Entwicklung zur cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und zum Oberflächenkarzinom (CIS), die selbst als Vorläuferläsionen des invasiven Gebärmutterhalskrebses betrachtet werden.

[0013] WO 96/19496 offenbart Varianten der menschlichen E6- und E7-Papillomavirus-Proteine, insbesondere Fusionsproteine von E6/E7 mit einer Deletion sowohl in den E6- und E7-Proteinen. Diese Deletionsfusionsproteine sollen immunogen sein.

[0014] Auf HPV-L1 basierende Impfstoffe werden in WO94/00152, WO94/20137, WO93/02184 und WO94/05792 offenbart. Solch ein Impfstoff kann das L1-Antigen als ein Monomer, ein Kapsomer oder ein virusähnliches Partikel umfassen. Solche Partikel können zusätzlich L2-Proteine umfassen. Auf L2 basierende Impfstoffe werden beispielsweise in WO93/00436 beschrieben. Andere HPV-Impfstoffe basieren auf den frühen Proteinen wie E7 oder Fusionsproteinen wie L2-E7.

[0015] Roden R. S. B. et al.: („Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition" Journal of Virology, The American Society for Microbiology, us, Bd. 70, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten (3298–3301) offenbaren Experimente, um einen Kreuzschutz bei genitalen HPV-Typen in VLP-basierten Impfungen in Betracht zu ziehen.

[0016] Wheeler C. M.: („Preventive Vaccines for Cervical Cancer" Salud de Publica de Mexico, Mexico, mx, Bd. 39, Nr. 4, Juli 1997 (1997-07), Seiten 283–287) stellt einen Überblick über Schutzimpfungen gegen Gebärmutterhalskrebs bereit.

[0017] Schiller J. T. et al.: („Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development" Seminars in cancer biology, Saunders scientific publications, Philadelphia, Pa, us, Bd. 7, Nr. 6, Dezember 1996 (1996-12), Seiten 373–382) offenbaren die Verwendung von VLPs bei Tieren, um Antikörper zu induzieren.

[0018] Suzich J. A. et al.: („Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas" Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, national academy of science. Washington, us, Bd. 92, 1 December 1995 (1995-12-01), Seiten 11553–11557) offenbaren die Verwendung von Li-Partikeln vom oralen Papillomavirus des Hundes, um Beagles zu impfen.

[0019] Lowe R. S. et al.: („Human papillomavirus type 11 (hvp-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with hvp-11 virus-like particles expressed in yeast" Journal of infectious diseases, Chicago, IL, us, Bd. 176, Nr. 5, 1997, Seiten 1141–1145) offenbaren die Impfung von Affen mit HPV11-VLPs, die auf einem Aluminium-Adjuvans formuliert sind.

[0020] WO9517209 offenbart Impfstoffe, die eine Öl-in-Wasser-Emulsion umfassen.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt eine Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 1 bereit.

[0022] Die erfindungsgemäße Impfstoffzusammensetzung ist für die Verabreichung an Jugendliche, für ein besonderes Risiko einer HPV-Infektion bestehen könnte, von besonderem Nutzen.

[0023] Eine Immunantwort kann grob in zwei extreme Kategorien eingeteilt werden, zum einen die humorale oder zum anderen die zellvermittelte Immunantwort (traditionell gekennzeichnet durch Antikörper- bzw. Zelleffektorschutzmechanismen). Diese Kategorien der Immunantwort wurden als TH1-Typ-Antworten (zellvermittelte Antwort) und TH2-Typ-Immunantworten (humorale Antwort) bezeichnet.

[0024] Extreme TH1-Typ-Immunantworten können durch die Produktion von antigenspezifischen, Haplo-typ-eingeschränkten cytotoxischen T-Lymphocyten und natürliche Killerzellantworten gekennzeichnet sein. Bei Mäusen sind TH1-Typ-Antworten oft durch die Produktion von Antikörpern des IgG2a-Subtyps gekennzeichnet, während diese bei Menschen den IgG1-Typ-Antikörpern entsprechen. TH2-Typ-Immunantworten sind durch die Produktion von einem weiten Spektrum an Immunglobulin-Isotypen, einschließlich IgG1, IgA und IgM bei Mäusen, gekennzeichnet.

[0025] Es kann in Betracht gezogen werden, dass Cytokine die treibende Kraft für die Entwicklung dieser beiden Arten von Immunantworten darstellen. Hohe Spiegel von TH1-Typ-Cytokinen neigen dazu, die Induzierung von zellvermittelten Immunantworten gegen das fragliche Antigen zu fördern, während hohe Spiegel von TH2-Typ-Cytokinen dazu neigen, die Induzierung von humoralen Immunantworten gegen das Antigen zu fördern.

[0026] Die Unterscheidung von TH1- und TH2-Typ-Immunantworten ist nicht eindeutig. In Wirklichkeit wird ein Patient eine Immunantwort unterstützen, die als vorherrschend TH1 oder vorherrschend TH2 beschrieben

ist. Jedoch ist es oft auch zweckmäßig, die Familien von Cytokinen in Bezug auf die in murinen CD4 +ve-T-Zell-clonen von Mosmann und Coffmann (Mosmann, T. R. und Coffman, R. L. (1989) TH1 und TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review Immunology, 7, S. 145–173) beschriebenen Familien in Betracht zu ziehen. Traditionell werden TH1-Typ-Antworten mit der Produktion der INF- γ - und IL-2-Cytokine durch T-Lymphocyten in Verbindung gebracht. Andere Cytokine, die oft direkt mit der Induktion von TH1-Typ-Immunantworten in Verbindung stehen, werden nicht von T-Zellen wie IL-12 produziert. Im Gegensatz dazu werden TH2-Typ-Antworten mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) in Verbindung gebracht.

[0027] Man weiß, dass bestimmte Impfstoff-Adjuvantien besonders zur Stimulierung entweder von TH1- oder TH2-Typ-Cytokinantworten geeignet sind. Traditionell schließen die besten Indikatoren des TH1:TH2-Gleichgewichts der Immunantwort nach einer Impfung oder Infektion die direkte Messung der Produktion der Herstellung der TH1- oder TH2-Cytokine durch T-Lymphocyten in vitro nach Restimulierung mit Antigen und/oder (zumindest bei Mäusen) die Messung des IgG1:IgG2a-Verhältnisses von antigenspezifischen Antikörperantworten ein.

[0028] Daher ist ein TH1-Typ-Adjuvans eines, das isolierte T-Zellpopulationen stimuliert, hohe Spiegel von TH1-Typ-Cytokinen zu produzieren, wenn sie mit Antigen in vivo restimuliert werden, und antigenspezifische Immunglobulinantworten, die mit TH1-Typ-Isotypen in Verbindung stehen, induziert.

[0029] Adjuvantien, die vorzugsweise TH1-Zellantworten stimulieren können, sind in den internationalen Patentanmeldungen WO 94/00153 und WO 95/17209 beschrieben.

[0030] 3-Des-O-acyliertes Monophosphoryl-Lipid A (3D-MPL) ist solch ein Adjuvans. Es ist aus GB 2220211 (Ribi) bekannt. Chemisch gesehen ist es ein Gemisch aus 3-Des-O-acyliertem Monophosphoryl-Lipid A mit 4-, 5- oder 6 acylierten Ketten und wird von Ribi Immunochem, Montana hergestellt. Eine bevorzugte Form von 3-Des-O-acyliertem Monophosphoryl-Lipid A ist im Europäischen Patent 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) offenbart.

[0031] Bevorzugt sind die Partikel von 3D-MPL klein genug, um steril durch eine 0,22 Micron-Membran gefiltert zu werden (wie im Europäischen Patent Nr. 0 689 454 beschrieben). 3D-MPL wird im Bereich von 10 μg –100 μg , vorzugsweise 25–50 μg pro Dosis vorhanden sein, wobei das Antigen typischerweise in einem Bereich von 2–50 μg pro Dosis vorhanden sein wird.

[0032] Ein Träger ist ebenfalls in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung vorhanden. Der Träger ist ein Aluminiumsalz wie Aluminiumphosphat oder Aluminiumhydroxid.

[0033] Die Antigene in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung werden mit 3D-MPL und Alaun kombiniert.

[0034] Typischerweise ist bei der Verabreichung an Menschen 3D-MPL in dem Impfstoff in einem Bereich von 1 μg –200 μg , wie 10–100 μg , vorzugsweise 10–50 μg pro Dosis vorhanden.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das HPV-Antigen in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung das Hauptkapsidprotein L1 von HPV und gegebenenfalls das L2-Protein, insbesondere von HPV 16 und/oder HPV 18. In dieser Ausführungsform ist die bevorzugte Form des L1-Proteins ein verkürztes L1-Protein. L1, gegebenenfalls in einer L1-L2-Fusion, liegt in Form eines virusähnlichen Partikels (VLP) vor. Das L1-Protein kann an ein anderes HPV-Protein, insbesondere E7, fusioniert sein, um eine L1-E7-Fusion zu bilden. Chimäre VLPs, die L1-E oder L1-L2-E umfassen, sind besonders bevorzugt.

[0036] Die Proteine der vorliegenden Erfindung werden bevorzugt in E. coli exprimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Proteine mit einem Histidinschwanz der zwischen 5 und 9 und bevorzugt sechs Histidinreste umfasst, exprimiert. Diese sind eine vorteilhafte Unterstützung für die Reinigung. Die Beschreibung der Herstellung derartiger Proteine ist in der ebenfalls anhängigen britischen Patentanmeldung Nr. GB 9717953.5 komplett beschrieben.

[0037] Das HPV-Antigen in der Impfstoffzusammensetzung kann auf $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert werden.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Impfstoffzusammensetzung ein multivalenter Impfstoff, beispielsweise ein tetra- oder pentavalenter Impfstoff.

[0039] Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung zeigen sogar in sehr geringen Antigendosen eine sehr hohe Wirksamkeit bei der Induzierung einer Schutzimmunität.

[0040] Sie stellen einen ausgezeichneten Schutz gegen Primärinfektionen bereit und stimulieren vorteilhafterweise sowohl durch spezifische humorale (neutralisierende Antikörper) als auch durch Effektorzellen (DTH) vermittelte Immunantworten.

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt in einer weiteren Ausführungsform wie hierin beschrieben eine Impfstoffformulierung für die Verwendung bei der medizinischen Therapie, insbesondere für die Verwendung zur Behandlung oder Prophylaxe von menschlichen Papillomavirusinfektionen bereit.

[0042] Der Impfstoff der vorliegenden Erfindung wird eine immunoprotektive Menge der Antigene enthalten und kann mittels herkömmlicher Techniken hergestellt werden.

[0043] Die Herstellung eines Impfstoffs ist allgemein beschrieben in Pharmaceutical Biotechnology, Bd. 61 Vaccine Design – the subunit and adjuvant approach, bearbeitet von Powell und Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, bearbeitet von Voller et al. University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Die Einkapselung in Liposomen ist beispielsweise in Fullerton, U.S. Patent 4,235,877 beschrieben.

[0044] Die Konjugation von Proteinen zu Makromolekülen ist beispielsweise in Likhite, U.S. Patent 4,372,945 und in Armor et al., U.S. Patent 4,474,757 beschrieben.

[0045] Die Menge an Protein in jeder Impfstoffdosis ist als Menge ausgewählt, die eine immunoprotektive Antwort ohne deutliche, gegenteilige Nebenwirkungen in typischen Geimpften induziert. Eine derartige Menge wird abhängig davon, welches spezifische Immunogen verwendet wird, variieren. Im Allgemeinen wird jede Dosis erwartungsgemäß 1–1000 µg Protein, bevorzugt 2–100 µg, am stärksten bevorzugt 4–40 µg umfassen. Eine optimale Menge eines bestimmten Impfstoffs kann mit Hilfe von Standardstudien, die die Beobachtung von Antikörpertitern und anderen Antworten in Patienten einschließen, bestimmt werden. Nach einer anfänglichen Impfung, können Patienten nach etwa vier Wochen eine Auffrischungsimpfung bekommen.

[0046] Zusätzlich zur Impfung von Personen, die anfällig für HPV-Infektionen sind, können die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Patienten, die an den viralen Infektionen leiden, mittels Immuntherapie verwendet werden.

[0047] Wenn gewünscht können andere Antigene in jeglicher nützlicher Reihenfolge zugegeben werden, um multivalente Impfstoffzusammensetzungen wie hierin beschrieben bereitzustellen.

[0048] Das folgende Beispiel veranschaulicht die Erfindung, schränkt diese jedoch nicht ein.

Beispiel 1: Vergleichende Immunogenität von HPV Ags/HBs/gD in monovalenten oder Kombinationsimpfstoffen, formuliert mit AS04.

EINLEITUNG

[0049] Eine Studie zur Immunogenität wurde in Balb/C-Mäusen unter Verwendung von vier verschiedenen Antigenen durchgeführt:

1. HPV16 L1-virusähnliches Partikel (VLP-16)
2. HPV18 L1-virusähnliches Partikel (VLP-18)
3. gD-Antigen von HSV-2
4. HBsAg

formuliert mit Alum/3D-MPL (AS04) unter Verwendung von voradsorbierten Mengeneinheiten von Antigen oder 3D-MPL auf Al(OH)₃ oder AlPO₄.

[0050] 3D-MPL/Al(OH)₃-Formulierungen werden als AS04D bezeichnet, wohingegen 3D-MPL/AlPO₄-basierende Formulierungen als AS04C bezeichnet werden.

[0051] Die folgenden Impfstoffe wurden analysiert:

1. VLP16 + VLP18 AS04D;

2. Gd AS04D;
3. HBs AS04C

und die Möglichkeit, diese zu kombinieren wurde untersucht.

[0052] Ziel dieses Experiments war der Vergleich der Immunogenität von zwei verschiedenen AS04-Kombinationen, die entweder aus:

1. VLP16 + VLP18 und gD oder
2. VLP16 + VLP18 und gD und HBsAg hergestellt wurden.

[0053] Das Protokolls des Experiments ist im Abschnitt Materialien und Methoden komplett beschrieben.

[0054] Insgesamt wurden Gruppen mit 10 Mäusen zweimal in einem Abstand von 3 Wochen mit verschiedenen Ag-basierenden Formulierungen intramuskulär immunisiert. Die Antikörperantwort auf VLPs, gD und HBsAg und das Isotypenprofil, das durch die Impfung hervorgerufen wurde, wurden durch ELISA an Tag 14 nach II beobachtet. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Cytokinproduktion (IFN γ /IL5) nach erneuter in-vitro-Re-stimulierung von Milzzellen mit entweder VLPs-, gD- oder HBs-Antigenen analysiert.

MATERIALIEN UND METHODEN

Formulierung

Formulierungszusammensetzungen

[0055] VLP16, VL18, gD und HBs, formuliert mit 3D-MPL auf Aluminiumsalz.

Verwendete Bestandteile

Bestandteil	Konzentration	Puffer
HPV 16 VLP	560 μ g/ml	Tris 20 mM/NaCl 500 mM
HPV 18 VLP	550 μ g/ml	NaCl 500 mM/NaPO ₄ 20 mM
AL(OH) ₃	10380 μ g/ml	H ₂ O
HBs	1219 μ g/ml	PO ₄ 10 mM/NaCl 150 mM
gD	443 μ g/ml	PBS pH 7,4
3D-MPL	1170 μ g/ml	Wasser zur Injektion
AlPO ₄	5 mg/ml	NaCl 150 mM

Adsorption

a) VLP Adsorption

[0056] Gereinigte VLP 16- und VLP 18-Einheiten werden auf 500 μ g/ml mit dem Reinigungspuffer eingestellt, anschließend wird Al(OH)₃ zugegeben, um ein Verhältnis von 2 μ g VLP/10 μ g Al(OH)₃ zu erhalten. Magnetisches Rühren wird bei Raumtemperatur 60 Minuten lang durchgeführt und das Gemisch wird bei 2 bis 8°C bis zur abschließenden Formulierung gelagert.

b) gD-Adsorption

[0057] 2 μ g gD werden mit 10 μ g Al(OH)₃ vermischt. Magnetisches Rühren wird bei Raumtemperatur 60 Minuten lang durchgeführt und das Gemisch wird bei 2 bis 8°C bis zur abschließenden Formulierung gelagert.

c) HBs Adsorption

[0058] 2 µg HBs werden mit 10 µg AlPO_4 vermischt. Magnetisches Rühren wird bei Raumtemperatur 60 Minuten lang durchgeführt und das Gemisch wird bei 2 bis 8°C bis zur abschließenden Formulierung gelagert.

d) 3D-MPL Adsorption

[0059] 5 µg 3D-MPL werden mit 10 µg Al(OH)_3 vermischt. Magnetisches Rühren wird bei Raumtemperatur 60 Minuten lang durchgeführt und das Gemisch wird bei 2 bis 8°C bis zur abschließenden Formulierung gelagert.

[0060] 5 µg 3D-MPL werden mit 10 µg AlPO_4 vermischt. Magnetisches Rühren wird bei Raumtemperatur 60 Minuten lang durchgeführt und das Gemisch wird bei 2 bis 8°C bis zur abschließenden Formulierung gelagert.

Formulierung

[0061] H_2O und NaCl werden vermischt (10 × konzentriert) und nach 10 Minuten Schütteln bei Raumtemperatur werden die verschiedenen Bestandteile zugegeben: adsorbiertes Antigen, 3D-MPL adsorbiert und Al(OH)_3 (vgl. nachstehende Tabelle). Die Bestandteile werden bei Raumtemperatur 10 Minuten lang geschüttelt und bis zur Injektion bei 4°C gelagert.

	Antigen(e)	Immunostimulantien			Vehikel	
Gruppe	Typ	µg	Typ	µg	Typ	µg
A	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH)_3	10
	VLP16	2			Al(OH)_3	10
	VLP18	2			Al(OH)_3	10
					Al(OH)_3	10
					Al(OH)_3	10
B	gD	2			Al(OH)_3	10
	VLP16	2			Al(OH)_3	10
	VLP18	2			Al(OH)_3	10
	HBs	2			AlPO_4	10

			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
C	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30
D	VLP16	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	20
E	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30

Mausserologie

Anti-VLP-16- und anti-VLP-18-Serologie

[0062] Die Quantifizierung der anti-VLP16- und anti-VLP18-Antikörper wurde mittels ELISA unter Verwendung von VLP16 503/1 (20/12/99) und VLP18 504/2 (25/10/99F) als Hüllantigene durchgeführt. Die Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen adsorbiert (Maxisorb Immuno-Platte, Nunc, Dänemark). Die Platten wurden anschließend eine Stunde lang bei 37°C mit 1% Rinderserumalbumin enthaltendem PBS inkubiert. Zweifache Serumverdünnungen (beginnend bei 1/400-Verdünnung) in dem Sättigungspuffer wurden zu den VLP-beschichteten Platten zugegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1% Tween 20 gewaschen und Biotinkonjugiertes Anti-Maus-Ig (Amersham, UK), das 1/1500 in Sättigungspuffer verdünnt war, wurde in jede Vertiefung zugegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde der Streptavidin-biotinylierte Peroxydasekomplex (Amersham, UK), der 1/1000 in Sättigungspuffer verdünnt war, für zusätzliche 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie vorstehend gewaschen und 20 Minuten lang mit einer Lösung von o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04% H₂O₂ 0,03% in 0,1% Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2N H₂SO₄ abgestoppt und bei 490/630 nm gelesen. ELISA-Titer wurden von einem Referenzwert durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) ausgerechnet und in EU/ml ausgedrückt.

Anti-gD-Antwort

[0063] Die Quantifizierung des Anti-gD-Antikörpers wurde mittels ELISA unter Verwendung von gD (gD 43B318) als Hüllantigen durchgeführt. Die Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-Platte, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden anschließend eine Stunde lang bei 37°C mit 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 enthaltendem PBS inkubiert (Sättigungspuffer; 100 µl/Vertiefung). Zweifache Serumverdünnungen (beginnend bei 1/100-Verdünnung) in dem Sättigungspuffer wurden zu den gD-beschichteten Platten zugegeben und 1 Stunde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1% Tween 20 gewaschen und Biotinkonjugiertes Anti-Maus-IgG1, IgG2a, IgG2b oder Ig (Amersham, UK), das 1/1000 in Sättigungspuffer verdünnt war, wurde in jede Vertiefung zugegeben und 1 Stunde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde der Streptavidinbiotinylierte Peroxydasekomplex (Amersham, UK), der 1/1000 in Sättigungspuffer verdünnt war, für zusätzliche 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie vorstehend gewaschen und 20 Minuten lang mit einer Lösung aus 0,04% o-Phenylendiamin (Sigma) 0,03% H₂O₂ in 0,1% Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2N H₂SO₄ abgestoppt und bei 490/630 nm gelesen. ELISA-Titer wurden von einem Referenzwert durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) ausgerechnet und in EU/ml ausgedrückt.

Anti-HBs-Serologie

[0064] Die Quantifizierung des anti-HBs-Antikörpers wurde mittels ELISA unter Verwendung von HBs (Hep 286) als Hüllantigen durchgeführt. Die Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 µl/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-Platte, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden anschließend 1 Stunde lang bei 37°C mit 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 enthaltendem PBS (Sättigungspuffer) inkubiert. Zweifache Serumverdünnungen (beginnend bei 1/100-Verdünnung) in dem Sättigungspuffer wurden den HBs-beschichteten Platten zugegeben und 1 Stunde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1% Tween 20 gewaschen und Biotin-konjugiertes Anti-Maus-Ig (Amersham, UK), das 1/1500 verdünnt war, oder IgG1, IgG2a, IgG2b (IMTECH, USA), das 1/4000, 1/8000 bzw. 1/4000 in dem Sättigungspuffer verdünnt war, wurde in jede Vertiefung zugegeben und 1 Stunde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde der Streptavidin-biotinylierte Peroxidasekomplex (Amersham, UK), der 1/1000 in dem Sättigungspuffer verdünnt war, für zusätzliche 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie vorstehend gewaschen und 20 Minuten lang mit einer Lösung von 0,04% o-Phenylendiamin (Sigma) 0,03% H₂O₂ in 0,1% Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2N H₂SO₄ abgestoppt und bei 490/630 nm gelesen. ELISA-Titer wurden von einem Referenzwert durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) ausgerechnet und in EU/ml ausgedrückt.

Cytokinherstellung

[0065] Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen wurde aseptisch entnommen und vereinigt. Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO), das 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 5% foetales Kälberserum enthielt, hergestellt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml in 1 ml pro Flachbodenplatte mit 24 Vertiefungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-1 µg/ml) der einzelnen Ag (VLPs-, gD- oder HBs-Antigen) gezüchtet. Die Überstände wurden 96 Stunden später geerntet und bis zum Test auf das Vorhandensein von IFN γ und IL5 mittels ELISA eingefroren.

IFN γ (Genzyme)

[0066] Die Quantifizierung von IFN γ wurde mittels ELISA unter Verwendung von Reagenzien von Genzyme durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-Platte, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl eines Hamster-Anti-Maus-IFN γ beschichtet, der zu 1,5 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5 verdünnt wurde. Die Platten wurden anschließend für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C mit 100 µl von 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 enthaltendem PBS (Sättigungspuffer) inkubiert. Zweifache Verdünnungen des Überstands von der in-vitro-Stimulierung (beginnend bei 1/2) in Sättigungspuffer wurden zu den Anti-IFN γ -beschichteten Platten zugegeben und für 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS Tween 0,1% (Waschpuffer) gewaschen und Biotinkonjugiertes Ziege-Anti-Maus-IFN γ , das in dem Sättigungspuffer zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml verdünnt war, wurde in jede Vertiefung zugegeben und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde das AMDEX-Konjugat (Amersham), das 1/10000 in dem Sättigungspuffer verdünnt war, für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie vorstehend mit 50 µl TMB (Bio-rad) 10 Minuten lang gewaschen. Die Reaktion wurde mit 2N H₂SO₄ abgestoppt und bei 450/630 nm gelesen. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (Maus-IFN γ -Standard) durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) ausgerechnet und in pg/ml ausgedrückt.

IL5 (Pharmigen)

[0067] Die Quantifizierung von IL5 wurde mittels ELISA unter Verwendung von Reagenzien von Pharmigen durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-Platte, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl eines Ratten-Anti-Maus-IL5, das zu 1 µl/ml in Carbonatpuffer pH9,5 verdünnt war, inkubiert. Die Platten wurden 1 Stunde lang bei 37°C in 100 µl 1% Rinderserumalbumin und 0,1% Tween 20 enthaltendem PBS (Sättigungspuffer) inkubiert. Zweifache Verdünnungen des Überstands von der in-vitro-Stimulierung (beginnend bei 1/2) in dem Sättigungspuffer wurden zu den Anti-IL-5-beschichteten Platten zugegeben und 1 Stunde 30 min lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1% Tween (Waschpuffer) gewaschen und Biotin-konjugiertes Ratten-Anti-Maus-IL5, das in dem Sättigungspuffer bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt war, wurde in jede Vertiefung zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde das AM-

DEX-Konjugat (Amersham), das 1/10000 in Sättigungspuffer verdünnt war, für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden wie vorstehend gewaschen und mit 50 µl TMB (Biorad) 15 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,4N H₂SO₄ abgestoppt und bei 450/630 nm gelesen. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (rekombinantes Maus-IL-5) durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) ausgerechnet und in pg/ml ausgedrückt.

GRUPPEN

[0068] Gruppen von 10 Balb/C-Mäusen wurden intramuskulär mit den folgenden Formulierungen immunisiert:

Tabelle 1: Gruppen und Formulierungen

GRUPPE	FORMULIERUNG
A	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH)₃ 50 µg
B	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / HBs 2 µg / gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH)₃ 40 µg / AlPO₄ 10 µg
C	gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH)₃ 50 µg
D	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH)₃ 50 µg
E	HBs 2 µg / 3D-MPL 5 µg / AlPO₄ 10 µg / Al(OH)₃ 40 µg

[0069] Details der Formulierungen sind vorstehend im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben.

ERGEBNISSE

1. Serologie:

a) Anti-VLP16-Antwort:

[0070] Humorale Antworten (Ig) wurden mittels ELISA unter Verwendung von VLP16 503-1 (20/12/99) als Hüllantigen gemessen. Seren von Tag 14 nach II wurden analysiert.

[0071] [Fig. 1](#) zeigt Anti-VLP16-Ig-Antikörper-Antworten, die in einzelnen Seren an Tag 14 nach II gemessen wurden.

[0072] Die Anti-VLP16-Titer, die nach der Immunisierung mit der Kombination aus VLPs-, gD- und HBs-Ag (Gruppe B) erhalten wurden, waren ein wenig niedriger als der Titer, der entweder mit der Kombination aus VLPs und gD (Gruppe A) oder der monovalenten VLPs-Formulierung (Gruppe D) erhalten wurde (allgemeiner Durchschnittstiter 27578 gegenüber 48105 EU/ml gegenüber 44448 EU/ml).

[0073] Vor der statistischen Analyse wurde ein T-Grubbs-Test auf jede Population zum Datenausschluss angewendet. Zwei Mäuse, die nicht ansprachen, in Gruppen A und D wurden zur Analyse herausgenommen. Die Unterschiede, die zwischen den Gruppen beobachtet wurden, wurden unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Tests als statistisch nicht signifikant bewertet.

b) Anti-VLP18-Antwort

[0074] Humorale Antworten (Ig) wurden mittels ELISA unter Verwendung von VLP18 504-2 (25/10/99) als Hüllantigen gemessen. Seren von Tag 14 nach II wurden analysiert.

[0075] [Fig. 2](#) zeigt die Anti-VLP18-Ig-Antikörperantwort, die in einzelnen Seren an Tag 14 nach II gemessen wurden.

[0076] Die Anti-VLP18-Titer, die nach der Immunisierung mit der Kombination aus VLPs, gD und HbsAg (Gruppe B) erhalten wurden, waren in der gleichen Größenordnung wie die Titer, die entweder mit der Kombination aus VLPs und gD (Gruppe A) oder der monovalenten VLPs-Formulierung (Gruppe D) erhalten wurden (allgemeiner Durchschnittstiter von 56078 gegenüber 88786 EU/ml gegenüber 76991 EU/ml).

[0077] Vor der statistischen Analyse wurde zum Datenausschluss ein T-Grubbs-Test für jede Population durchgeführt. Zwei Mäuse, die nicht ansprachen, in Gruppen A und D wurden zur Analyse herausgenommen.

[0078] Die Unterschiede, die zwischen den Gruppen beobachtet wurden, wurden unter Verwendung eines Einweg-Varianzanalysetests als statistisch nicht signifikant bewertet.

c) Anti-gD-Antwort

[0079] Humorale Antworten (Ig und Isotypen) wurden mittels ELISA unter Verwendung von gD als Hüllantigen gemessen. Seren von Tag 14 nach II wurden analysiert.

[0080] [Fig. 3](#) zeigt die Anti-gD-Antikörper-Antworten, die an Tag 14 nach II bei einzelnen Seren gemessen wurden:

In Bezug auf die Anti-gD-Antwort wurde ein leichter Rückgang im allgemeinen Durchschnittstiter, der mit der VLPs/gD/HBs-Kombination (Gruppe B) erhalten wurde, im Vergleich zu gD allein (Gruppe C) oder der VLPs/gD-Kombination (Gruppe A) beobachtet (allgemeiner Durchschnittstiter von 18631 gegenüber 32675 gegenüber 27058 EU/ml).

[0081] Vor der statistischen Analyse wurde zum Datenausschluss ein T-Grubbs-Test für jede Population durchgeführt. Zwei Mäuse, die nicht ansprachen, in Gruppen A und D wurden zur Analyse herausgenommen.

[0082] Eine Einweg-Varianzanalyse wurde mit den Anti-gD-Titern nach der Logarithmusumwandlung der Daten nach II durchgeführt. Es wurde kein statistischer bedeutsamer Unterschied zwischen den drei Formulierungen beobachtet.

[0083] Die Isotypenaufteilung, die bei den gepoolten Seren analysiert wurde, lautet wie folgt:

	Isotypenaufteilung (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe A	96	3	2
Gruppe B	96	3	2
Gruppe C	97	1	1

[0084] Es wurde kein Unterschied beim durch die drei Formulierungen induzierten Isotypenprofil beobachtet: hauptsächlich wurde eine IgG1-Antwort (96–97% von IgG1) in den drei Gruppen wie in der nachstehenden Tabelle gezeigt beobachtet.

d) Anti-HBs-Antwort

[0085] Humorale Antworten (Ig und Isotypen) wurden mittels ELISA unter Verwendung von HbsAg (Hep286) als Hüllantigen gemessen. Seren von Tag 14 nach II wurden analysiert.

[0086] [Fig. 4](#) zeigt die Anti-HBs-Antikörper-Antworten, die bei den einzelnen Seren an Tag 14 nach II gemessen wurden.

[0087] Eine geringfügig niedrigere Anti-HBs-Antigen-Antwort wurde bei der Kombinationsgruppe B, die die VLPs-, gD- und HBs-Antigene enthielt, im Vergleich zu HBs allein (Gruppe E) beobachtet (allgemeiner Durchschnittstiter von 28996 EU/ml gegenüber 20536 EU/ml).

[0088] Eine Einwegvarianzanalyse wurde mit den Anti-HBs-Titern nach der logarithmischen Umwandlung der Daten nach II durchgeführt. Unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Tests wurde kein statistischer be-

deutsamer Unterschied zwischen Gruppe B (VLP/HBs/gD) gegenüber Gruppe E (HBs AS04) beobachtet.

[0089] Die Isotypenaufteilung, die bei den gepoolten Seren analysiert wurde, lautete wie folgt und zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wobei ein Anteil von IgG2a in dem Kombinationsimpfstoff erhalten blieb.

	Isotypenaufteilung (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe B	54	24	21
Gruppe E	56	23	21

2. ZELLVERMITTELTE IMMUNANTWORT

[0090] Die zellvermittelten Immunantworten (IFN γ -/IL5-Produktion) wurden an Tag 14 nach II nach der in-vitro-Restimulation von Milzzellen entweder mit VLPs-, gD- oder HBs-Antigenen ausgewertet. Für jede Gruppe von Mäusen wurden Pools mit 5 Organen zusammengestellt.

[0091] Das experimentelle Verfahren ist im Abschnitt Materialien und Methoden im Ganzen beschrieben.

3. Cytokinproduktion

a) In-vitro-Restimulation mit VLP16 und VLP18

[0092] [Fig. 5](#) zeigt die Cytokinproduktion, die in Milzzellen nach 96 Stunden in-vitro-Restimulation mit VLP16 beobachtet wurde.

[0093] [Fig. 6](#) zeigt die Cytokinproduktion, die in Milzzellen nach 96 Stunden in-vitro-Restimulation mit VLP18 beobachtet wurde.

[0094] Unter Verwendung einer Dosis von 10 μ g und 1 μ g Ag für die Restimulation mit beiden VLP-Antigenen wurde keine deutliche Wirkung des Dosisbereichs auf die jeweilige Cytokinproduktion beobachtet.

[0095] Mit allen Formulierungen wurde ein klares TH1-Profil beobachtet.

Tabelle 2: IFN- γ /IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit VLP16 und VLP18.

Verhältnis IFN / IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP16 10 μ g/ml	5,2	8,9	11,8
VLP16 1 μ g/ml	15,1	14,3	16,5

Verhältnis IFN / IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP18 10 μ g/ml	19,6	11,1	16,1
VLP18 1 μ g/ml	23,2	14,3	18,2

b) In-vitro-Restimulation mit gD

[0096] [Fig. 7](#) zeigt die Cytokinproduktion, die in Milzzellen nach 96 Stunden in-vitro-Restimulation mit gD-Antigen beobachtet wurde.

[0097] Beim Vergleich der 10 und 1 μ g-Ag-Dosis zur Restimulation konnte keine deutliche Wirkung des Do-

sisbereichs beobachtet werden.

[0098] Das IFN- γ wird in einer viel höheren Konzentration im Vergleich zu IL-5 (Tabelle 3) produziert, was ein deutliches TH-1-Profil der Immunantwort bei allen ausgewerteten Gruppen (monovalent gegenüber Kombination) zeigt.

Tabelle 3: IFN- γ /IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit gD.

Verhältnis IFN / IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
gD 10 μ g/ml	6,2	7,2	3,1
gD 1 μ g/ml	6,2	11,2	2,3

c) In-vitro-Restimulation mit HBs

[0099] [Fig. 8](#) zeigt die Cytokinproduktion, die in Milzzellen nach 96 Stunden in-vitro-Restimulation mit HBs beobachtet wurde.

[0100] Für Gruppe B wurde ein deutlicher Spiegel von IFN- γ aber keine IL5-Produktion beobachtet. Wie in Tabelle 2 gezeigt, wurde bei Gruppe E eine höhere Produktion von IFN- γ im Vergleich zu Gruppe B beobachtet. Jedoch wurde bei Gruppe E (HBs monovalent) ein hoher Hintergrundwert von IFN- γ für die Kontrolle mit keinem Antigen zur Restimulation beobachtet. Es wurde ein sehr hohes IFN- γ /IL-5-Verhältnis bei dem monovalenten Impfstoff beobachtet, was anzeigt, dass eine starke TH1-Antwort induziert wird. In ähnlicher Weise wurde ein hohes IFN- γ /IL-5-Verhältnis mit dem Kombinationsimpfstoff gemessen, was zeigt, dass diese Formulierung ebenfalls eine TH1-Antwort induzieren kann.

Tabelle 4: IFN- γ /IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit HBs

Verhältnis IFN / IL-5	Gruppe B	Gruppe D
HBs 10 μ g/ml	15,8	65,3
HBs 1 μ g/ml	7,6	67,6

SCHLUSSFOLGERUNG

[0101] Die Wirkung der Kombination von VLPs/gD oder VLPs/gD/HBsAg, die in AS04 formuliert wurden, auf die Immunogenität wurde bei Balb/C-Mäusen gemessen:

In Bezug auf die serologische Analyse wurde kein Einfluss der Ag-Kombination auf die Anti-VLPs-, Anti-gD- und Anti-HBs-Serologie beobachtet.

[0102] Die Kombination aus VLPs- und gD- oder VLPs-, gD- und HBs-Antigenen beeinflusste das Isotypenprofil der von den monovalenten gD- und HBs-Impfstoffen gezeigten Antikörperantwort nicht.

[0103] Bei der Auswertung der Cytokine wurde das TH-1-Profil (IFN- γ /IL-5-Verhältnis), das mit jedem monovalenten Impfstoff beobachtet wurde, mit der Kombination der Impfstoffgruppen bestätigt.

Patentansprüche

1. Impfstoff, umfassend ein dem menschlichen Papillomavirus 16 L1 Virusähnliches Partikel, ein dem menschlichen Papillomavirus 18 L1 Virusähnliches Partikel, Aluminiumhydroxid und 3 Des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A.

2. Impfstoff nach Anspruch 1, wobei die Virus-ähnlichen Partikel unter Verwendung von voradsorbierten Mengeneinheiten von Antigen und 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A an Aluminiumhydroxid formuliert sind.

3. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, wobei die gereinigte Menge von dem menschlichen Papillomavirus

16 L1 Virus-ähnlichen Partikeln und vom dem menschlichen Papillomavirus 18 L1 Virus-ähnlichen Partikeln zu Aluminiumhydroxid hinzugefügt wird, um ein Verhältnis von 2 µg VLP/10 µg Al(OH)₃ zu erhalten.

4. Impfstoff, im wesentlichen bestehend aus einem dem menschlichen Papillomavirus 16 L1 Virus-ähnlichen Partikel, einem dem menschlichen Papillomavirus 18 L1 Virus-ähnlichen Partikel, Aluminiumhydroxid und 3 Des-O-acyliertem Monophosphoryl-lipid A.

5. Dem menschlichen Papillomavirus 16 L1 Virus-ähnliches Partikel, formuliert mit Alaun und 3 Des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A unter Verwendung von voradsorbierten Mengeneinheiten von Antigen und 3 Des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A an Aluminiumhydroxid oder AlPO₄.

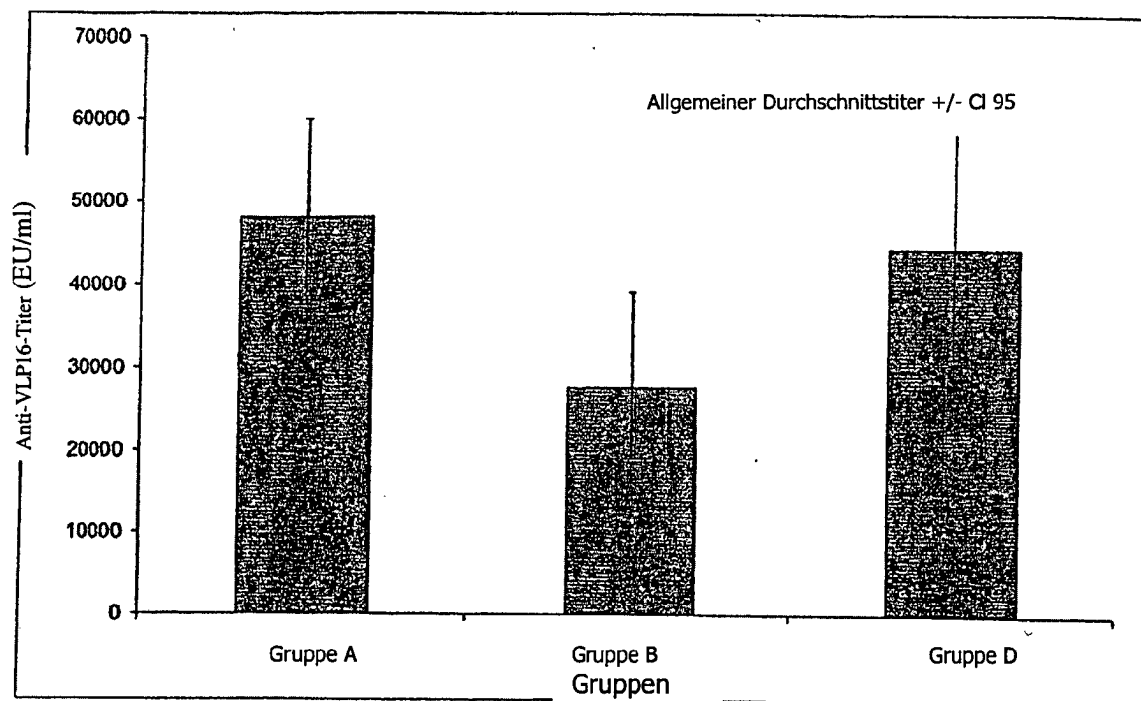
6. Dem menschlichen Papillomavirus 18 L1 Virus-ähnliches Partikel, formuliert mit Alaun und 3 Des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A unter Verwendung von voradsorbierten Mengeneinheiten von Antigen und 3 Des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A an Aluminiumhydroxid oder AlPO₄.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1: Anti-VLP16-Antwort an Tag 14 nach II

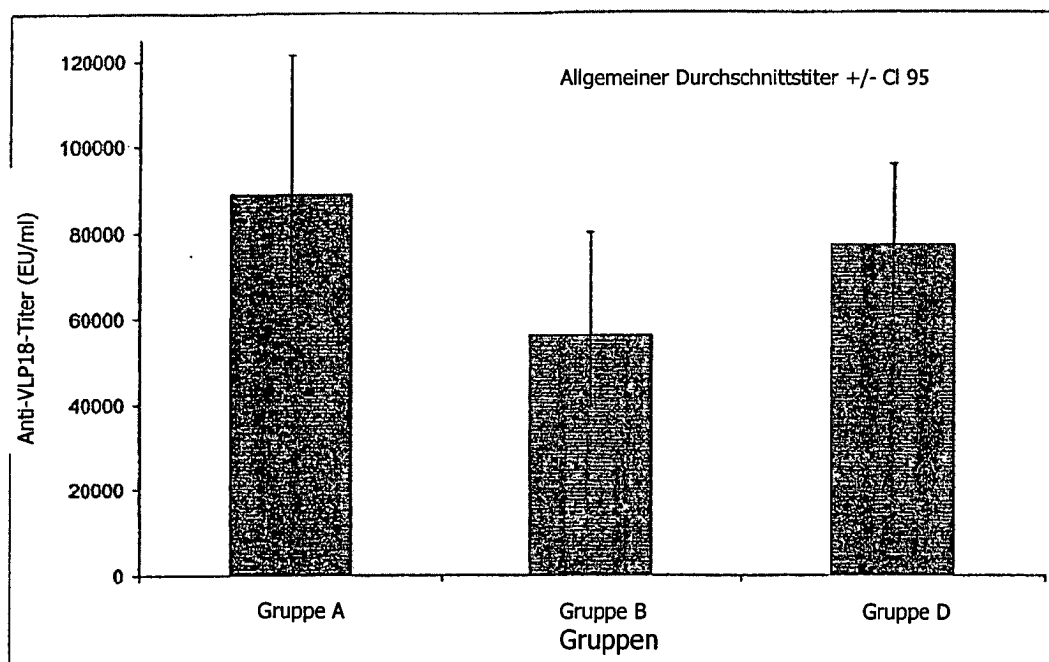
01. Dez. 2005

Ergebnisse mit einzelnen Seren (EU/ml)



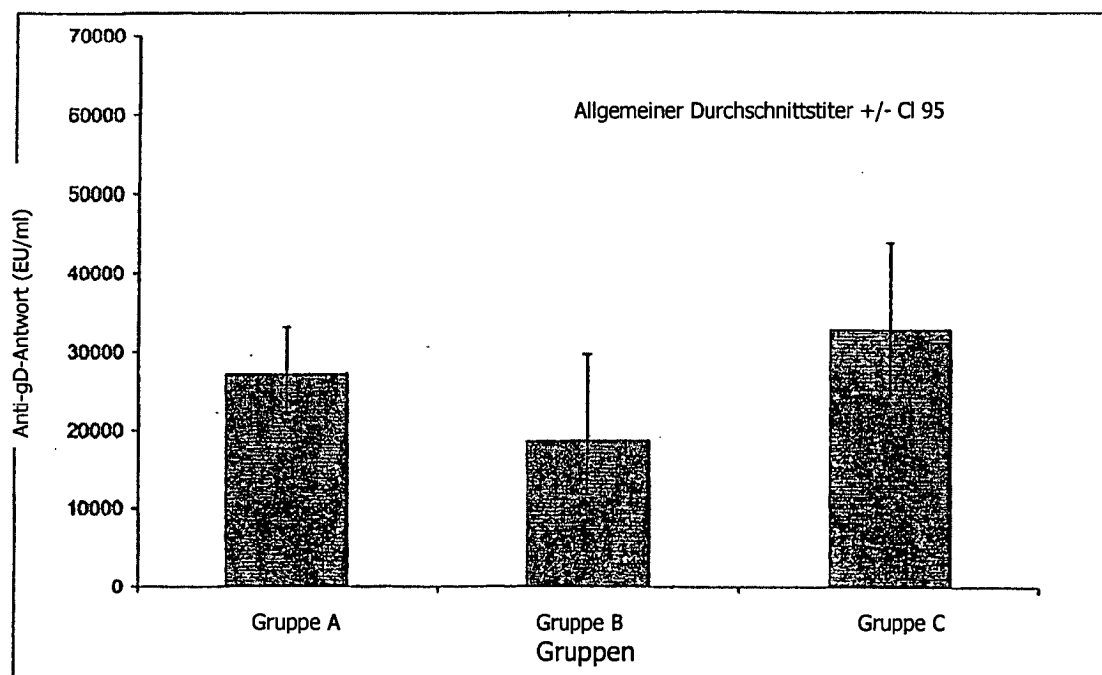
FIGUR 2: Anti-VLP18-Antwort an Tag 14 nach II

Ergebnisse mit einzelnen Seren (EU/ml)



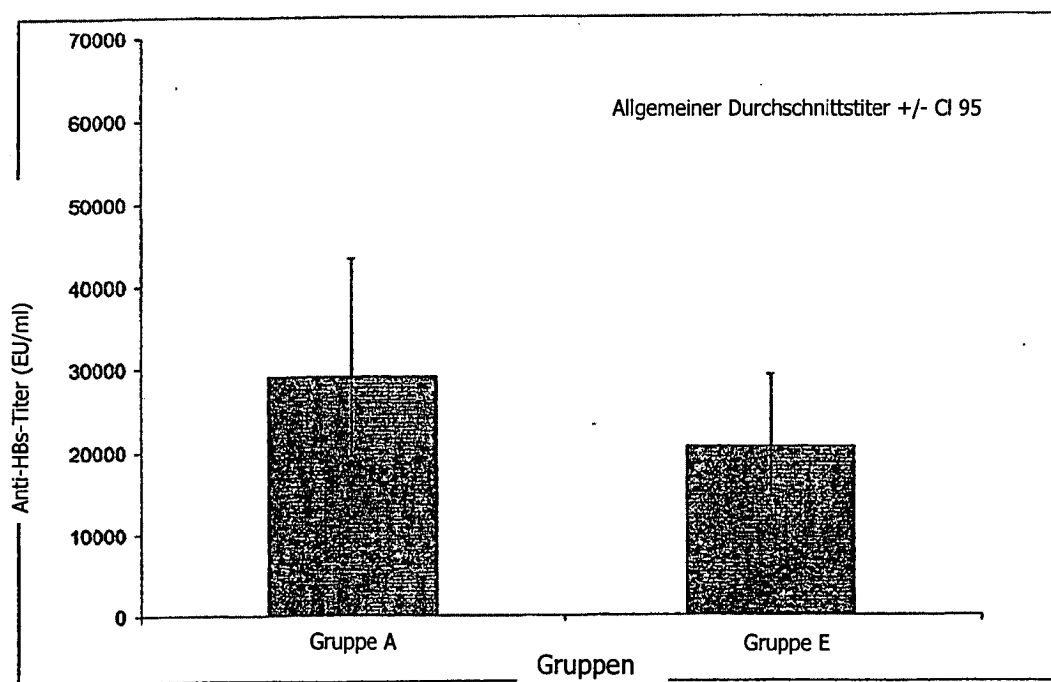
FIGUR 3: Anti-gD-Antwort an Tag 14 nach II

Ergebnisse mit einzelnen Seren (EU/ml)



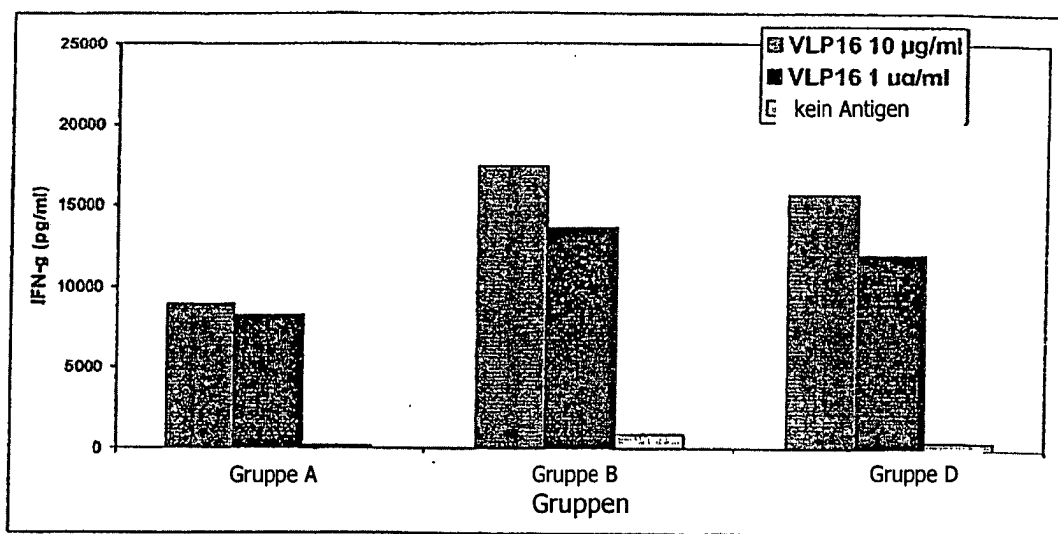
FIGUR 4: Anti-HBs-Antwort an Tag 14 nach II

Ergebnisse mit einzelnen Seren (EU/ml)

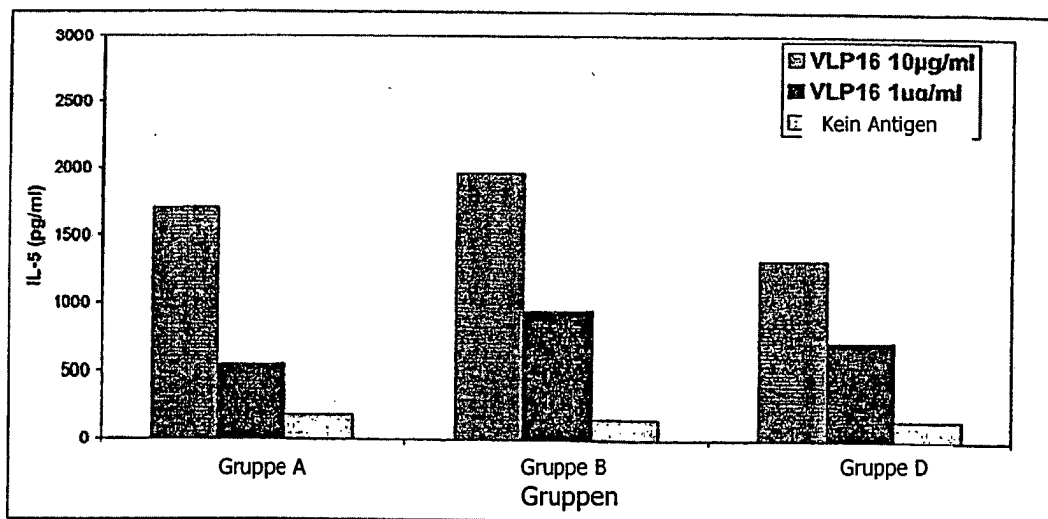


FIGUR 5: CYTOKIN-ERGEBNISSE – TAG 14 NACH II

IFN- γ -Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit VLP16

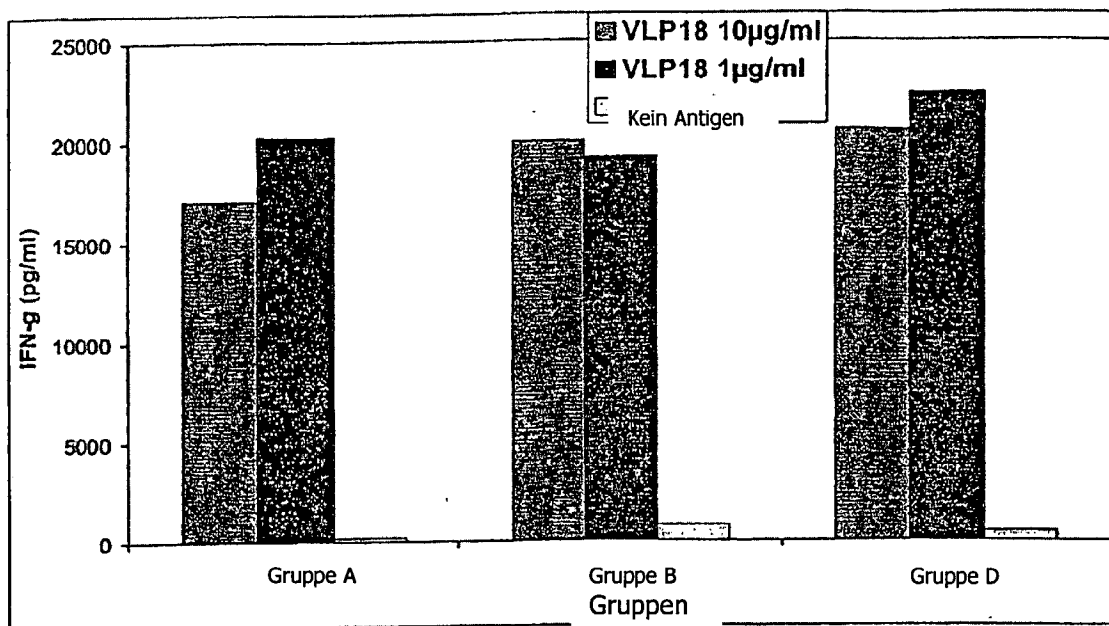


IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit VLP16

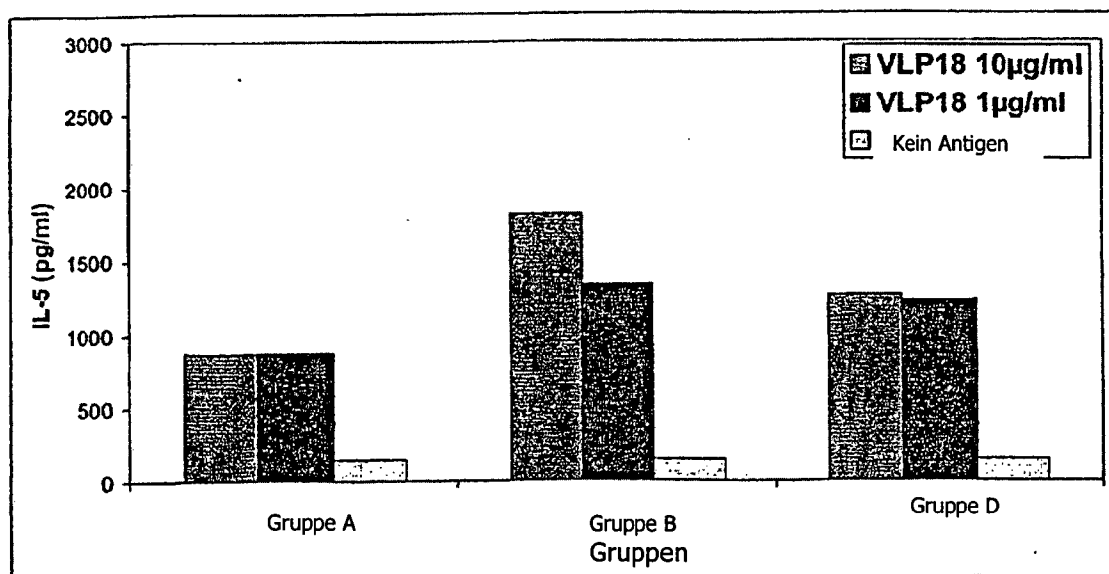


FIGUR 6: CYTOKIN-ERGEBNISSE TAG 14 NACH II

IFN-g-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit VLP18

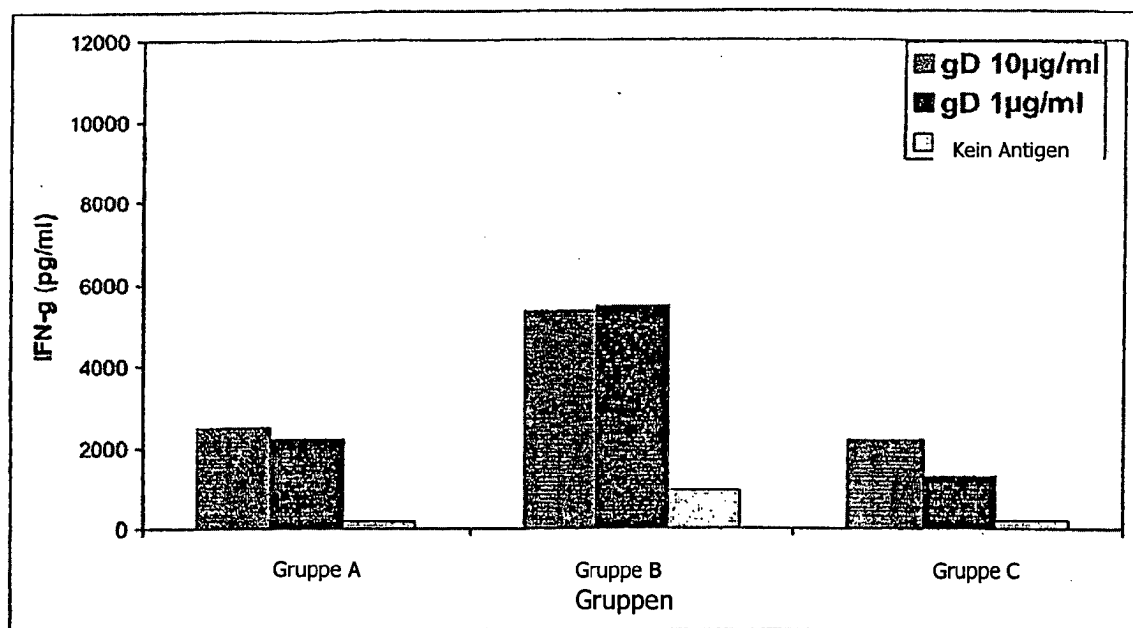


IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit VLP18

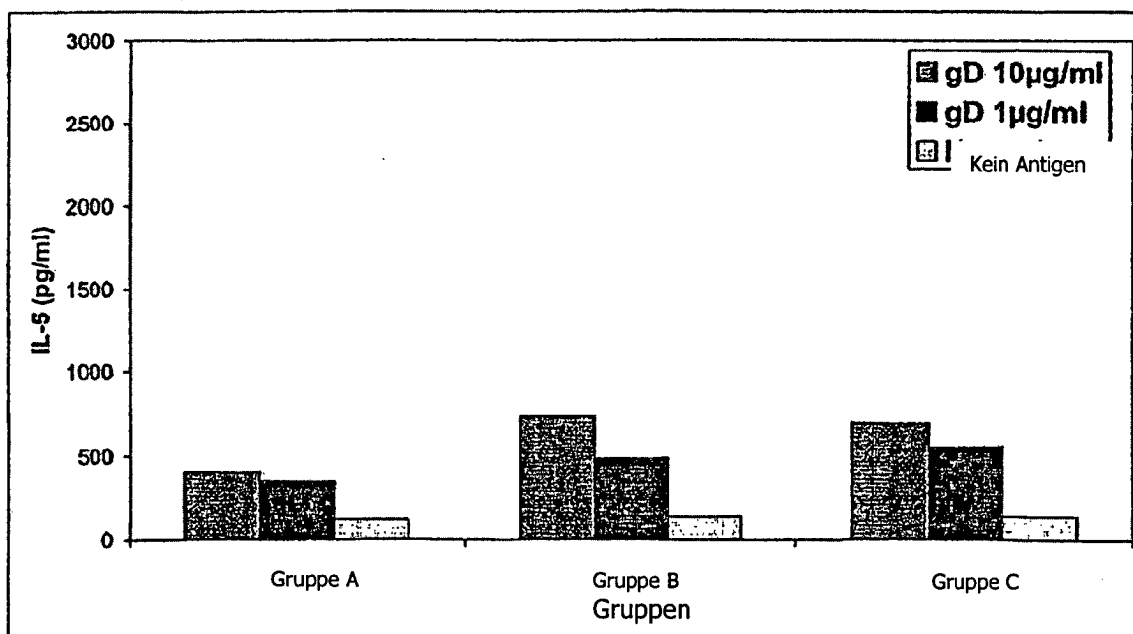


FIGUR 7: CYTOKIN-ERGEBNISSE – TAG 14 NACH II

IFN-g-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit gD

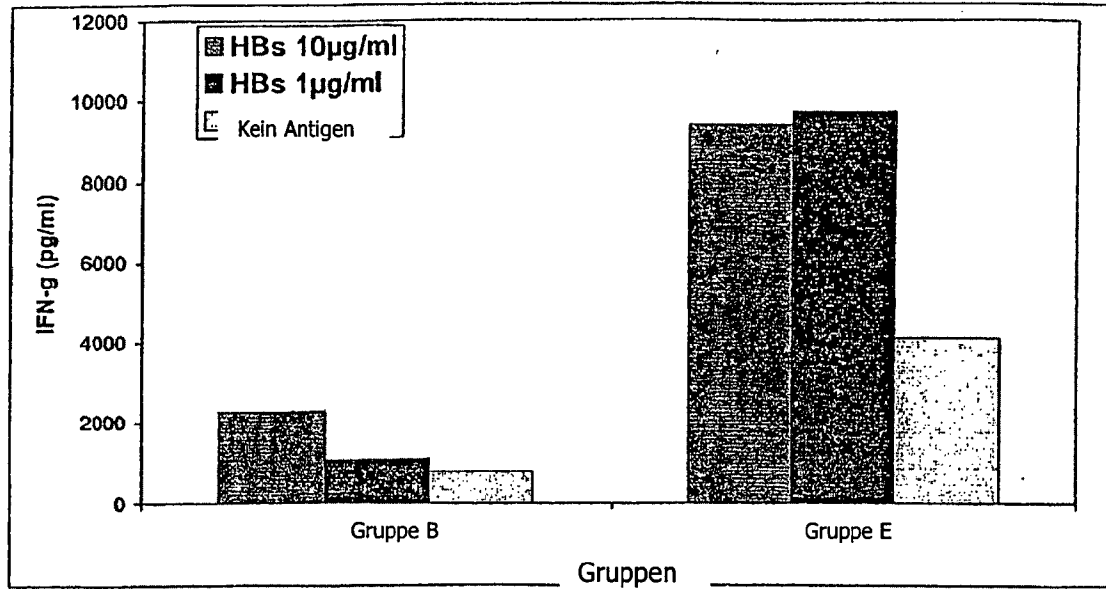


IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit gD



FIGUR 8: CYTOKIN-ERGEBNISSE – TAG 14 NACH II

IFN-g-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit HBs



IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulierung mit HBs

