



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 410 172 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 472/2000
(22) Anmeldetag: 21.03.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.07.2002
(45) Ausgabetag: 25.02.2003

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 39/00**
A61K 39/39, 39/395

(56) Entgegenhaltungen:
EP 159749A1

(73) Patentinhaber:
IGENEON GMBH
A-1235 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER VAKZINEFORMULIERUNG

AT 410 172 B

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung einer Vakzineformulierung mit einem Protein-Antigen und einem Adjuvans, wobei das Gemisch einer Temperatur von über 70° C ausgesetzt wird, die immunogenen Teile des Proteins aber durch die Bindung an das Adjuvans dem Immunsystem in der richtigen Form präsentiert werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung eines Impfstoffes mit Proteinen als Antigenen, wobei die Impfstoff-Formulierung auf mehr als 70°C erhitzt wird.

Der Begriff "Vakzine" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Agens zur aktiven Immunisierung, d.h. eine Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Verabreichung (z.B. subkutan, intradermal, intramuskulär, ev. auch oral, nasal) von geringen Mengen eines Antigens (eines Stoffes, der vom Immunsystem des vakzinierten Individuums als fremd und damit immunogen erkannt wird) in einer geeigneten immunogenen Formulierung. Das Antigen wird also als "Trigger" für das Immunsystem benutzt, um eine für das Antigen spezifische Immunantwort aufzubauen. Die dazu benötigten Mengen des Antigens können grundsätzlich sehr gering sein (manche Impfstoffe beinhalten nur ca. 5-10 µg Antigen pro Impfdosis).

Charakteristisch für eine aktive Immunisierung ist eine in großen Bereichen nur wenig Mengen-abhängige Dosis Wirkungskurve. Das heißt, daß die Immunantwort in einem weiten Dosisbereich in etwa gleich stark ausfällt. Daraus folgt, daß bei einer Vakzinierung der gewünschte Effekt, also die Induktion einer Immunantwort, bereits mit sehr geringen Antigenmengen erzielt werden kann, aber auch mit wesentlich höheren Antigenmengen in vergleichbarer Weise erzielt werden kann. Es ist aber naturgemäß wünschenswert, grundsätzlich mit möglichst niedrigen Dosierungen zu arbeiten, insbesondere im Hinblick auf Nebenwirkungen, Materialkosten etc., was bei einer Impfung zum Tragen kommt.

Vakzinen können für verschiedene Zwecke verwendet werden: Zur Etablierung eines derartigen Immunstatus der geimpften Personen oder Tiere, der sie vor pathogenen Mikroorganismen, wie z.B. vor bestimmten Viren oder Bakterien schützt.

Dazu gehören auch Impfstoffe gegen Krebs. Dabei soll das Immunsystem von Krebspatienten selektiv aktiviert werden, maligne Zellen zu bekämpfen. Das wird mittels verschiedenster Ansätze versucht. Dazu gehören Impfungen mit autologen oder allogenen Tumorzellen, chemisch oder molekularbiologisch modifizierten autologen oder allogenen Tumorzellen, isolierten oder mit Hilfe von chemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellten Tumor assoziierten Antigenen (TAA), daraus abgeleiteten Peptiden, anti-idiotypische Antikörper als Surrogat eines TAA.

Eine Vakzine im Sinne der vorliegenden Erfindung kann grundsätzlich sowohl im therapeutischen Sinne als auch im prophylaktischen Sinne (wie bei allen antimikrobiellen Impfstoffen) verwendet werden.

Durch Adjuvantien kann die Immunantwort verstärkt werden. Als Beispiele für Adjuvantien, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: Aluminium-hydroxid (Alu-Gel), Derivate von Lipopolysaccharid, Bacillus Calmette Guérin (BCG), Liposomenbereitungen, Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie z.B. Tetanus Toxoid, Pseudomonas Exotoxin, oder Bestandteile von Influenza-Viren, gegebenenfalls in einer Liposomenbereitung, biologische Adjuvantien wie Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin 2 (IL-2) oder Gamma Interferon (IFN γ).

Unter Proteinen werden in der vorliegenden Erfindung Polypeptide von mehr als fünf Aminosäuren verstanden, die zusätzlich noch andere Stoffe kovalent in der Molekülstruktur enthalten können (wie z.B. Zucker, Lipide, Phosphatgruppen). Die Seitengruppen sind nicht auf natürliche Polypeptidmodifikationen beschränkt, sondern können auch artifizielle Modifikationen sein (wie z.B. Polyethylenglykoll).

Beispielsweise werden in den US Patenten 4,438,098 und 4,565,697 Methoden beschrieben, wie Impfstoffe hitzebehandelt werden können. In beiden Fällen werden die Protein-Antigene vor der Formulierung mit dem Adjuvans auf 50 bis 70°C erhitzt, um mögliche Infektionserreger abzuschwächen, bzw. zu inaktivieren. In der EP 159 749 A1 wird eine Kurzzeiterhitzung von HBV-Antigenen in Abwesenheit von Aluminiumphosphat beschrieben; im Anschluss daran wird das Antigen mit einer Aluminiumphosphat-Suspension vermischt, in Glasampullen abgefüllt und bei 65°C pasteurisiert. Der Zweck der vorliegenden Erfindung ist nicht die Inaktivierung von möglichen Krankheitserregern, die in der Präparation der Antigene vorhanden sein könnten, obwohl dieser Vorteil auch durch die vorliegende Erfindung lukriert werden kann. Der wesentliche Unterschied zum Stand der Technik ist in der vorliegenden Erfindung die Mischung des Antigens mit dem Adjuvans vor der Hitzebehandlung.

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Herstellung eines Impfstoffes durch Mischen des Protein-Antigenes mit einem Adjuvans und deren darauffolgende Hitzebehandlung bei über 70°C,

vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 70 und 121°C und vorzugsweise mit Aluminium-hältigen Adjuvantien.

Bei einer derartigen Temperatur werden Proteine üblicherweise irreversibel denaturiert. Es wird vermutet, daß eine derartige Hitzebehandlung das Protein-Antigen zwar denaturiert, die immu-
 5 genen Teile des Proteins aber durch die Bindung an das Adjuvans dem Immunsystem in der richtigen Form präsentiert werden können. Es ist aber nicht unbedingt notwendig, die Proteine zu denaturieren, um die Vorteile der Erfindung durch die Hitzebehandlung zu erhalten. Es ist bekannt, daß die thermische Denaturierung von Proteinen nicht nur von der Temperatur, sondern auch von
 10 der Zeit, der das Protein dieser Temperatur ausgesetzt ist, abhängt. Darüberhinaus sind noch weitere physikalisch-chemische Parameter, wie z.B. Ionenstärke, Ionenzusammensetzung, pH-Wert, Art und Menge der aktiven Oberfläche im Gemisch für die Denaturierung eines Proteins verantwortlich. Es sind Bedingungen vorstellbar, bei denen das Protein nicht denaturiert wird, aber andere Vorteile der Erfindung, wie zum Beispiel schwächere Desorption von der Oberfläche des
 Adjuvans, genutzt werden können.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung einer Impfstoffformulierung mit einem
 15 Adjuvans und der darauffolgenden Hitzebehandlung, wodurch in der gesamten Formulierung infektiöse Erregern abgeschwächt, bzw. inaktiviert werden können. Dieser Vorteil kann sowohl in der Herstellung als auch bei der Lagerung und Distribution der Vakzine eine Rolle spielen. Es ist damit eine größere Sicherheit in Bezug auf bekannte und unbekannte Erreger von übertragbaren
 20 Krankheiten gegeben. Dieser Vorteil könnte vor allem bei Protein-Antigenen, die aus humanem oder tierischem Material stammen wichtig sein. Darüberhinaus ist, bei entsprechender Verpackung, eine Abfüllung ohne Konservierungsstoffe möglich, da die mikrobielle Konservierung des Impfstoffes durch Hitze erfolgt ist.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die mögliche erhöhte Immunogenität des
 25 Protein-Antigens, da die Erhitzung eine zumindest teilweise Denaturierung des Protein-Antigenes bewirken kann. Diese erhöhte Antigenität kann im Besonderen bei Proteinen, die vom Immunsystem als eigene Proteine erkannt werden würden, die Immunogenität erhöhen.

Als weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist eine mögliche zusätzliche Stabilisierung des
 30 Antigen-Adjuvans Komplexes durch die Hitzeinaktivierung, d.h. die Desorption des Protein-Antigens erfolgt nicht mehr schnell wie in Antigen-Adjuvans Formulierungen, die nicht hitzebehandelt worden sind. Dieser Vorteil erlaubt unter Umständen auch einen größeren zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Immunisierungen.

Eine neuartige Methode der Krebsvakzinierung ist in der WO 00/41722 beschrieben. Der darin
 35 beschriebene monoklonale Antikörper HE2, der als Vakzin-Antigen in einer Krebsimpfung verwendet wird, dient als Beispiel, jedoch nicht auf dieses eingeschränkt, für die Formulierung eines Impfstoffes nach der hier beschriebenen Methode.

Abbildung 1 zeigt die Immunantwort, die durch eine Antikörpervakzine, die hitzebehandelt wurde,
 40 in Affen erzeugt werden kann.

Die Erfindung soll durch nachfolgendes Beispiel veranschaulicht werden, ist aber nicht auf diese
 Anwendung beschränkt.

Beispiel:

Hitze-sterilisierte Formulierung des monoklonalen Antikörpers HE2 auf Aluminium-hydroxid:

45 HE2 ist ein monoklonaler Maus (IgG2a)-Antikörper und reagiert mit dem humanen „Epithelial Cell Adhesion Molecule“ (Ep-CAM). Die Aminosäuresequenzen der variablen Regionen des MAK HE2 sind wie folgt:

Schwere Kette:

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPQGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG
 50 KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAWFCARDGPWFAYWGQGLTVTVSA

Leichte Kette:

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGS
 55 ATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIK

0.5 mg HE2 absorbiert auf 1.67 mg Aluminium-hydroxid in 0.5 mL 1 mM Phosphat-Puffer pH
 6,0/155 mM NaCl wurde 30 min. auf 121°C erhitzt. Vier Rhesusaffen wurden jeweils an den Tagen

1, 15, 29 und 57 subcutan mit dieser Dosis immunisiert. Die Seren von verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels ELISA auf Induktion von Antikörpern gegen HE2 getestet. Als Vergleich wurde die gleiche Formulierung, allerdings ohne Hitzebehandlung, geimpft und ebenfalls analysiert (Figur 1).

Es ist zu sehen, daß mit der hitzebehandelten Vakzine kaum niedrigere Titer gegen das Protein-Antigen erzeugt wurden.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die geringere Desorption der hitzebehandelten Vakzineformulierung im Vergleich zur unbehandelten Formulierung:

Das Serum von immunisierten Affen (jeweils 4 Individuen) wurde im ELISA auf vorhandenes HE2 getestet. Auf den ELISA-Platten wurde affinitätsgereinigtes Ziegen-anti-HE2 Serum immobilisiert. Die Sera wurden in verschiedenen Verdünnungen mit anti-Human-IgG-Peroxidase-Konjugat auf spezifische Antikörper getestet. Die Sensitivität des Tests lag bei 10 ng HE2/mL. Die Proben wurden vor der ersten Immunisierung, sowie 1, 4 und 24 Stunden nach der Immunisierung gezogen. Als externer quantitativer Standard wurde HE2 verwendet. Man kann sehen, daß die hitzebehandelte Vakzineformulierung keinen meßbaren HE2-Spiegel im Blut verursachte, während die nicht-hitzebehandelte Vakzineformulierung einen Großteil des HE2 innerhalb von 24 Stunden an das Serum abgibt.

Zeitpunkt	Hitzebehandelte Vakzine	nicht behandelte Vakzine
0	0; 0; 0; 0 ng/mL	0; 0; 0; 0 ng/mL
1 Stunde	0; 0; 0; 0 ng/mL	13; 17; 74; 280 ng/mL
4 Stunden	0; 0; 0; 0 ng/mL	200, 280, 400, 740 ng/mL
24 Stunden	0; 0; 0; 0 ng/mL	960, 960, 1000, 740 ng/mL

PATENTANSPRÜCHE:

- Verfahren zur Herstellung einer Vakzineformulierung mit einem Protein-Antigen und einem Adjuvans, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch einer Temperatur von über 70°C ausgesetzt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein-Antigen ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern ist.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein-Antigen ein monoklonaler Antikörper ist.
- Verfahren nach Ansprüchen 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper gegen ein menschliches zelluläres Membranantigen gerichtet sind.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Membranantigen ein Tumor-assoziiertes Antigen ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Membranantigen ein Antigen epithelialer Zellen ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Membranantigen eine Rolle bei Adhäsionsvorgängen spielt.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Membranantigen zur Selbstadhäsion fähig ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Membranantigen Ep-CAM, N-CAM oder CEA ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper HE2 verwendet wird.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper dieselbe Bindungsfeinspezifität wie der Antikörper HE2 aufweist.

12. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Proteinantigen folgende Aminosäuresequenz enthält:
QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG
KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDGPWFAYWGQGTLLTVSA
- 5 13. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Proteinantigen folgende Aminosäuresequenz enthält:
NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENWTWSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGS
ATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGTKLEIK
- 10 14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Hitzebehandlung bei 121°C 30 Minuten durchgeführt wird.

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Figur 1: Induktion von Antikörpern gegen HE2 (ELISA) in Rhesusaffen - Vergleich von zwei Formulierungen

