



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 228 737 A1

4(51) A 61 K 39/145

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 269 132 2	(22)	06.11.84	(44)	23.10.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Institut für Angewandte Virologie, 1190 Berlin, Britzer Straße 1-3, DD

(72) Glathe, Horst, VR Dr. sc. med. vet.; Kunze, Martina, Dipl.-Biochem.; Klenz, Gebhard, Dr. rer. nat.; Malur, Johannes, Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Influenza-Inaktivimpfstoffen mit geringer Stammabhängigkeit

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung neuartiger Influenza-Inaktivimpfstoffe zur Anwendung im Bereich der Human- und Veterinärmedizin beschrieben. Das Ziel der Erfindung ist die Entwicklung von Influenza-Inaktivimpfstoffen, deren Schutzwirkung sich unabhängig vom verwendeten Produktionsstamm auf mehrere Varianten des Influenzavirus erstreckt. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß spezielle Antigen determinanten der leichten Kette des Hämagglutinins (HA2), die bei allen Typen und Subtypen des Influenzavirus nahezu identisch sind, durch das erfindungsgemäße Verfahren durch Modifikation des HA-Gesamtmoleküls freigelegt bzw. in eine Form gebracht werden, in der sie ihre immunogenen Eigenschaften entfalten können. Dabei wird entweder durch Einwirkung von geeigneten Proteasen oder durch reduzierende und/oder proteindesintegrierende Substanzen die schwere Kette (HA1) des HA-Moleküls völlig oder zum überwiegenden Teil von der HA2-Kette getrennt, so daß die biologisch als Fusionsfaktor wirkenden Determinanten der HA2-Kette freigelegt werden.

Titel der Erfindung:

Verfahren zur Herstellung von Influenza-Inaktivimpfstoffen
mit geringer Stammabhängigkeit

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Influenza-Inaktivimpfstoffen, die eine vom verwendeten Impfstamm unabhängige Schutzwirkung auslösen und daher für die Influenzaimmunprophylaxe beim Menschen und bei Tieren unabhängig von der epidemiologischen Situation anwendbar sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Bei den bekannten und beschriebenen Methoden zur Herstellung von Influenza-Inaktivimpfstoffen wird der Erreger der Influenza (Orthomyxovirus influenzae) zunächst in embryonierten Hühnereiern zur Vermehrung gebracht, wobei solche Stämme des Influenzavirus verwendet werden, die in der Struktur der Antigen determinanten der Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) zum aktuellen Stamm eine möglichst enge Verwandtschaft aufweisen. Das auf diese Weise vermehrte Influenzavirus wird danach durch Einwirkung chemischer Agenzien oder durch physikalische Einflüsse in eine nicht mehr vermehrungsfähige Form überführt und anschließend mittels physikalischer Verfahren, vorzugsweise Dichtegradientenzentrifugation, konzen-

triert und gleichzeitig von den aus dem Brutei stammenden Begleitstoffen weitgehend befreit.

Das auf diese Weise gereinigte und konzentrierte Virusmaterial kann nach Einstellung auf die für die Stimulierung der Immunantwort erforderliche Viruskonzentration, gegebenenfalls nach Zugabe eines Adjuvans, direkt zu einem Impfstoff verarbeitet werden. Impfstoffe dieses Typs, sog. Vollvirus- oder Virionenimpfstoffe, befinden sich seit vielen Jahren in der Anwendung.

Andere Typen von in Anwendung befindlichen Influenza-Inaktivimpfstoffen sind die Spalt- und Subeinheitenimpfstoffe. Bei diesen wird das gereinigte und konzentrierte Virusmaterial zusätzlichen Produktionsschritten unterworfen, wobei entweder durch Einwirkung von oberflächenaktiven Substanzen die für die Auslösung der Immunantwort verantwortlichen Oberflächenglykoproteine HA und NA vom Restvirus abgelöst und danach isoliert werden, oder bei denen durch die Einwirkung von Lipidlösungsmitteln eine völlige Solubilisierung der Viruspartikel und die weitgehende Entfernung der Lipide der äußeren Virusmembran erfolgt.

Die immunologische Wirkungsweise von Inaktivimpfstoffen ist, unabhängig vom gewählten Verfahren, nahezu identisch. Sie beruht in erster Linie auf der Stimulierung der humoralen Immunantwort. Dabei werden vorwiegend Antikörper gebildet, die gegen Antigendeterminanten der Oberflächenglykoproteine HA und NA gerichtet sind. Obwohl die gegen die NA gerichteten Antikörper durch die Beeinflussung der letzten Phase der Virus-Zellbeziehung, der Virusausschleusung, einen Einfluß auf die Virusverbreitung im Organismus ausüben, besitzen die gegen das HA-Antigen gerichteten Antikörper für die Protektivität die größere Bedeutung. Es ist bekannt, daß das HA-Molekül, zwei Polypeptide, eine schwere (HA1) und eine leichte (HA2) Kette aufweist, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Das Gesamtmolekül ist durch das proximale Ende der leichten Kette in der Lipiddoppelmembran der Virushülle verankert, während das distale Ende mit der schweren Kette identisch ist.

Nach der Immunisierung mit den genannten Typen von Inaktivimpfstoffen werden Antikörper gebildet, die gegen Antigen-determinanten der schweren Kette gerichtet sind. Diese Antikörper besitzen u.a. auch virusneutralisierende Eigenschaften. Diese Antigen-determinanten der schweren Kette sind infolge der molekularbiologisch determinierten Variabilität des Influenzavirus einem ständigen, im Shift- und Driftphänomen ihren Ausdruck findenden Veränderungen unterworfen. Daraus erwächst die Notwendigkeit einer ständigen Aktualisierung der zur Impfstoffherstellung verwendeten Stämme an die jeweilige epidemiologische Situation und die Gefahr, daß im Falle einer Veränderung der Antigenstruktur der kursierenden Epidemiestämme oder beim Auftreten völlig neuer, für den Menschen bisher nicht als pathogen bekannter Antigenvarianten, diese bei der Impfstoffzusammensetzung nicht berücksichtigt werden konnten, so daß ein wirksamer Schutz durch die Impfung nicht erzielt werden kann.

Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Inaktivimpfstoffen, die im Gegensatz zu den nach bisher bekannten und beschriebenen Verfahren, eine von den verwendeten Impfstämmen unabhängige Wirksamkeit aufweisen. Das soll auf der Grundlage von antigenen Determinanten des HA erfolgen, die bei allen Typen und Subtypen des Influenzavirus identisch sind und die durch das erfindungsgemäße Verfahren durch Modifikation des HA-Gesamtmoleküls freigelegt bzw. in eine Form gebracht werden, in der sie ihre immunogenen Eigenschaften entfalten können.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Influenza-Inaktivimpfstoffen zu entwickeln, die einen vom verwendeten Impfstamm und der jeweiligen epidemiologischen Situation unabhängigen Schutz nach ihrer Anwendung bei Mensch und Tier vermitteln oder die zumindest geeignet sind, nach einer Infektion mit dem Influenzavirus die Krankheitsdauer und den Schweregrad der Erkrankung nachhaltig zu beeinflussen. Das soll auf der Grundlage von antigenen Determinanten des Hämagglutinins (HA) erfolgen, die allen bisher bekannten Typen und Subtypen gemeinsam sind.

Es wurde nun gefunden, daß nach der Infektion des Menschen mit einem Myxovirus influenzae Antikörper gebildet werden, die gegen die am proximalen Ende der leichten Kette lokalisierten und funktionell als Fusionsfaktor wirksamen Peptidsequenzen gerichtet sind und die, da diese Sequenzen bei allen Influenzaviren identisch sind, eine von der aktuellen Erregervariante unabhängige Hemmung der Virusvermehrung durch die Verhinderung der Fusionierung der Virusmembran mit der Zellmembran auslösen.

Es wurde weiterhin gefunden, daß diese Antikörper nicht nur nach einer natürlichen Infektion gebildet werden, sondern auch nach Immunisierung mit Impfstoffen, die als wirksames Prinzip die nach besonderer Behandlung freigelegten antigenen Determinanten des Amino-terminalen Endes der leichten Kette des Hämagglutinins enthalten.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet man durch an sich bekannte Verfahren konzentrierte und gereinigte Suspensionen eines Stammes des Influenzavirus, der sich durch besonders hohe Vermehrungsfähigkeit im embryonierten Hühnerei auszeichnet oder isoliertes reines HA, das ebenfalls durch an sich bekannte Verfahren gewonnen wurde.

Nach Inkubation dieser Virussuspension oder des isolierten reinen HA im schwach sauren Milieu im Bereich von pH 4.5

bis 5.8, vorzugsweise bei pH 5.2 für eine Dauer von 2 bis 30 Minuten, vorzugsweise 10 Minuten und der sich anschließenden Einstellung auf den neutralen pH-Bereich, wird die schwere Kette entweder völlig oder zum überwiegenden Teil durch die Einwirkung einer Protease vom Typ des Trypsins oder durch die Auflösung der die schwere und leichte Kette verbindenden Disulfidbrücke mittels reduzierender Substanzen nach vorheriger Molekülauffaltung von der leichten Kette getrennt. Als reduzierende Substanz können Sulfhydryl(=SH)-Verbindungen, wie z.B. Mercaptoäthanol und zur Proteinauffaltung strukturbrechende Substanzen, wie z.B. Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, verwendet werden.

Bei der Anwendung bestimmter Substanzen, wie z.B. Natriumtrichlorazetat in Kombination mit Mercaptoäthanol kann auch die Ablösung der schweren Kette ohne vorherige Inkubation im sauren Bereich erfolgen. Es kann aber auch die Abspaltung des größten Teils der schweren Kette durch Proteasen, die unter sauren Bedingungen wirken, direkt bei niedrigen pH-Werten erfolgen.

Im Falle der Abspaltung der schweren Kette an sonst intakten Viruspartikel kann vorzugsweise die Abtrennung durch Zonazentrifugation im saccharosehaltigen Dichtegradienten erfolgen. Dabei werden die für die Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigten Fraktionen mit den modifizierten Viruspartikeln in dem Teil des Gradienten angereichert, dessen Saccharosekonzentration der Dichte dieser Partikel entspricht. Es ist aber auch möglich, die nach bekannten Verfahren gereinigte und konzentrierte Virussuspension auf einen Gradienten aufzubringen, der außer Saccharose auch die reduzierenden Substanzen enthält, um dadurch die Abspaltung des HA1 zu bewirken.

Wird die Abtrennung des HA1 vom HA2 an isoliertem HA durchgeführt, dann ist die Isolierung des HA2 vorzugsweise durch Gelchromatographie durchführbar, wobei für die Trennung solche Substanzen eingesetzt werden, die eine Trennung dieser Polypeptide auf der Grundlage ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte (HA1 : 75000, HA2 : 25000) oder Polarität erlauben.

Bei der Verwendung von Virusmaterial, bei dem die Freilegung des HA2 am sonst intakten Virion erfolgt, kann die Weiterverarbeitung zu einem Impfstoff direkt oder nach Zugabe einer die Immunantwort verstärkenden Substanz erfolgen. Wird die Abspaltung des HA2 vom HA1 am isolierten HA-Molekül vollzogen, dann ist die Inkorporation des isolierten HA2 in Liposomen oder seine Kopplung an ein geeignetes Makromolekül, welches keine sensibilisierenden Eigenschaften entfaltet, für die Immunogenität vorteilhaft. Das gleiche gilt auch, wenn die an sich bekannten Polypeptidsequenzen des HA2 auf gentechnologischem oder völlig synthetischem Wege dargestellt werden.

Beispiel 1:

10 - 11 tägige Hühnerembryonen werden mit 1000 mittleren Ei-infektiösen Dosen (EID_{50}) eines definierten Influenzastammes, z.B. A/PR/8/34, in einem Inokulationsvolumen von 0.1 ml intraallantoidal infiziert und 48 h bei 33°C bis 35°C inkubiert. Danach werden die virushaltigen Allantoisflüssigkeiten gewonnen und vereinigt. Nach Entfernung zellulärer Verunreinigungen durch Zentrifugation (1500 g, 20 min) wird das Virusmaterial durch Einleiten in einen mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (0 % - 60 %) beladenen Durchflußzonalrotor gereinigt und konzentriert. Das Virusmaterial wird in den Fraktionen, deren Saccharosekonzentration der Dichte des Influenzavirus entspricht, weitgehend rein erhalten. Durch Pelletierung oder Dialyseverfahren kann der Saccharosegehalt des Virusmaterials vermindert oder gänzlich entfernt werden. Die Virussuspension wird nunmehr, nachdem der Proteingehalt durch geeignete Verfahren, z.B. nach Lowry bestimmt wurde, mit phosphatgepufferter Natriumchloridlösung so verdünnt, daß eine Proteinkonzentration von 5 - 10 mg/ml resultiert.

Durch Zugabe einer schwachen organischen Säure, z.B. Zitronensäure, wird der pH-Wert dieser Suspension auf 5.2 eingestellt, 10 min bei diesem Wert belassen und danach, z.B. mit Natriumhydrogenphosphat, auf einen pH-Wert von 7.2 zurückgestellt. Danach wird 30 min mit Trypsin, (mit einer spezifischen Aktivität von ca. 40 U/mg) im Verhältnis von 1:15 (1 mg Trypsin pro 15 mg Virusprotein) bei 37°C inkubiert, die Reaktion mit einem geeigneten Trypsin-inhibitor gestoppt und 90 min bei 5°C in einem Schwerfeld von 75000 g zentrifugiert. Die weitgehend vom HA1 befreiten Viruspartikel befinden sich im Sediment, das nach zweimaliger Waschung mit phosphatgepufferter Natriumchloridlösung und entsprechender Verdünnung zu einem Impfstoff verarbeitet wird.

Beispiel 2:

Eine Virussuspension, die analog zum Beispiel 1 hergestellt und der Behandlung bei niedrigen pH-Werten unterzogen wurde, wird mit Harnstoff und 2-Mercaptoäthanol versetzt (Endkonzentration an Harnstoff 4.5 M, 2-Mercaptoäthanol 0.4 M, Protein 40 mg/ml) und 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Verdünnen mit isotonischer Natriumchloridlösung wird danach die Konzentration des 2-Mercaptoäthanol unter 0.1 M gesenkt. Danach werden die weitgehend vom HA1 befreiten Virionen entsprechend Beispiel 1 pellettiert, gewaschen und zu einem Impfstoff verarbeitet.

Beispiel 3:

Eine Virussuspension, die analog zum Beispiel 1 hergestellt wurde, wird im Saccharosegradienten oder im Batch-Verfahren mit einem geeigneten anionischen (z.B. Natriumdesoxycholat) oder neutralen Detergens (z.B. Triton X-100) behandelt, so daß eine Trennung der Oberflächenglykoproteine HA

und NA vom Restvirus erfolgt. Das in der entsprechenden Gradientenfraktion bzw. im Überstand befindliche HA wird durch Säulenchromatographie gereinigt. Die ggf. eingengte Lösung wird mit Harnstoff und 2-Mercaptoäthanol entsprechend Beispiel 2 versetzt und die Subeinheiten in bekannter Weise isoliert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von inaktivierten Influenza-impfstoffen, die aufgrund gemeinsamer und vom jeweils verwendeten Virusstamm unabhängiger Strukturen oder Peptidsequenzen des Hämagglutinin-(HA)moleküls eine von der aktuellen epidemiologischen Situation unabhängige Wirksamkeit besitzen, gekennzeichnet dadurch, daß die dafür erforderlichen Oberflächenstrukturen auf der Oberfläche ansonsten intakter Viruspartikel freigelegt oder in künstliche Lipidvesikel (Virosomen) inkorporiert werden, wobei entweder durch Einwirkung von geeigneten Proteasen oder durch reduzierende und/oder proteindesintegrierende Substanzen die schwere (HA1)-Kette des HA-Moleküls völlig oder zum größten Teil von der leichten (HA2)Kette getrennt wird und dadurch eine Freilegung der biologisch als Fusionsfaktor wirksamen Determinanten der leichten Kette erfolgt oder durch Inkorporation von isolierten Teilen des HA-Moleküls, z.B. der HA2-Kette oder synthetisch oder gentechnologisch hergestellter Peptidsequenzen des HA-Moleküls in Virosomen bzw. durch chemische Verknüpfung dieser Molekülteile mit geeigneten Trägermolekülen immunologisch wirksame Strukturen erzeugt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Abspaltung des HA1 nach 1 bis 30 min Aufbewahrung, vorteilhaft 10 min, im sauren Bereich von pH 4.5 bis 5.5, vorteilhaft bei pH 5.2, durch Einwirkung von Proteasen, die einen dem Trypsin ähnlichen Wirkungsmechanismus aufweisen, erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Abspaltung des HA1 nach 1 bis 30 min Aufbewahrung, vorteilhaft 10 min, im sauren Bereich von pH 4.5 bis 5.5, vorteilhaft bei pH 5.2, durch Einwirkung von reduzierenden Substanzen erfolgt.

4. Verfahren nach einen der Ansprüche 1-3, gekennzeichnet dadurch, daß die durch die Abspaltung des HA1 modifizierten Viruspartikel direkt zu einem Impfstoff verarbeitet werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, gekennzeichnet dadurch, daß die durch die Abspaltung des HA1 modifizierten Viruspartikel nach Zugabe eines organischen oder anorganischen Adjuvans zu einem Impfstoff verarbeitet werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, gekennzeichnet dadurch, daß die durch die Abspaltung des HA1 modifizierten Viruspartikel nach Mischung mit durch an sich bekannten Verfahren inaktivierten und gereinigten Viruspartikeln eines aktuellen Epidemiestammes zu einem Impfstoff verarbeitet werden.