



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

391 080 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1716/86

(51) Int.Cl.⁵ : A61K 39/104

(22) Anmeldetag: 24. 6.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1990

(45) Ausgabetag: 10. 8.1990

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR
CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE
A-1220 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

DORNER FRIEDRICH DR.
WIEN (AT).
EIBL JOHANN DR.
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFektIONEN WIRKSAMEN PRÄPARATIONEN

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von gegen Pseudomonas aeruginosa-Infektionen wirksamen Präparationen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung, u.zw. von gereinigten Pseudomonas Flagella(H)-Antigenen und von gegen Bakterium Pseudomonas aeruginosa Infektionen wirksamen Flagella(H)-Antikörper enthaltenden Präparationen beschrieben.

Das Verfahren zur Herstellung der Antigene besteht darin, daß aus Kulturen von Pseudomonas aeruginosa gewonnene gereinigte neue Flagella(H)-Antigene, ausgewählt vom H-Serotyp a₀' a₃' a₄', vom H-Serotyp a₀' a₃' vom H-Serotyp a₀', vom H-Serotyp b, vom H-Serotyp a₀' a₁' a₂ und vom H-Serotyp a₀' a₂' sterilfiltriert, gegebenenfalls mit einem Adjuvans vermischt, gewünschtenfalls mit einem Präservans versetzt und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

Das Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin G-hältigen, gegen Bakterium Pseudomonas aeruginosa Infektionen wirksamen Präparationen, die Flagella(H)-Antikörper enthalten, besteht darin, daß Plasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren mit Proteinfällungsmitteln behandelt, die ausgefällte Immunglobulin G-hältige Fraktion gelöst und gereinigt wird.

B
391 080 AT

Die Erfundung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen wirksamen Präparationen. Im besondern betrifft die Erfundung die Herstellung von Vakzinen, die protektive *Pseudomonas aeruginosa* Flagella(H)-Antigene enthalten und zur aktiven Immunisierung bestimmt sind, sowie die Herstellung von Immunglobulin-G-hältigen, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksamen Präparationen, die zum passiven Schutz bestimmt sind.

Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein opportunistischer, pathogener Keim, der häufig bei Krankenhausinfektionen auftritt, hauptsächlich bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr, wie bei Verbrennungspatienten, bei Personen, die an cystischer Fibrose leiden oder organische Fehlfunktionen aufweisen, und bei Tumorpatienten. Antibiotika sind gegen *Pseudomonas*-infektionen infolge des Auftretens von Resistzenzen nur beschränkt wirksam, weshalb man bemüht ist, immunologische Methoden zur Bekämpfung von Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* zu finden.

Infektionen können durch eine Vielzahl von Stämmen ausgelöst werden, die O-Gruppenantigene und H-Antigene produzieren. Gemäß dem H-Antigenschema nach Ansorg (Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 242, 228 - 238 (1978)) wird unter Verwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei *Pseudomonas aeruginosa* ein komplexes Flagella(H)-Antigen a mit den Partialantigenen a₀, a₁, a₂, a₃, a₄ und ein uniformes Flagella(H)-Antigen b differenziert. Die Partialfaktoren a₀ - a₄ sind unabhängige Determinanten, so daß ein flagellares Antigenschema mit mehreren H-Typen resultiert. O-Gruppen und H-Typ zeigen freie Kombinationen.

Die zur Bereitung von *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterienkulturen verwendeten Stämme und die produzierten Antigene sind in der folgenden Tabelle 1 angeführt.

20

Tabelle 1

		<u>Stamm</u>	<u>H-Typ</u>
25			
	1	170001	-
		M-2	b
	2	5142	-
30	3	5940	a ₀ , a ₂
	4	5939	a ₀ , a ₃
	5	5933	a ₀ , a ₁ , a ₂
		1210	a ₀ , a ₁ , a ₂
		16990	a ₀ , a ₁ , a ₂
35	6	170018	a ₀ , a ₃ , a ₄

Isolierte Filamente der Flagellen-Antigene, die durch Schütteln, Homogenisieren und anschließendes Zentrifugieren gewonnen werden können (R. Ansorg, W. Schmitt, Med. Microbiol. Immunol. (1980) 168: 217-226), bestehen aus Flagellen und Flagellenbruchstücken, vereint in einem Komplex bestehend aus Lipopolysacchariden (LPS) und Verunreinigungen aus dem Nährmedium; solche Präparationen sind naturgemäß pyrogen und ungeeignet für die Anwendung am Menschen.

Nach einem unveröffentlichten Vorschlag der Anmelderin können polydisperse native *Pseudomonas*-Flagella(H)-Antigene (FAg) gewonnen werden, die frei sind von pyrogenen Substanzen. Diese Antigene bestehen aus monomeren Bestandteilen, wobei jeder monomere Bestandteil

- a) folgende Aminosäuren: Asparaginsäure bzw. Asparagin (Asp/Asn), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure bzw. Glutamin (Glu/Gln), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) enthält,
- b) die N-terminale Aminosäuresequenz Ala-Leu-Thr-Val-Asn-Thr-Asn-Ile-Ala aufweist,
- c) ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.000 aufweist und
- d) frei ist von Prolin (Pro), Methionin (Met), Cystein (1/2 Cys) und Histidin (His).

Die einzelnen Flagella(H)-Antigentypen enthalten die monomeren Formen die Aminosäuren Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin in bestimmten Verhältnissen zueinander enthalten. In Tabelle 2 sind diese Verhältniszahlen und die Molekulargewichte der monomeren Flagella(H)-Antigene angeführt.

60

Anzahl AS/Molekül Flagellin

Stämme mit zugehörigem H-Serotyp

5	Aminosäuren	170018	5939	5142	M-2	1210	5940
10	Asparaginsäure	64	69	74	74	76	68
	Threonin	33	35	50	48	44	41
	Serin	35	38	49	48	40	37
	Glutaminsäure	42	44	49	49	52	46
	Glycin	44	47	49	51	50	44
	Alanin	68	73	89	91	81	73
15	Valin	29	30	37	38	32	29
	Isoleucin	29	30	29	30	32	29
	Leucin	37	60	44	43	41	37
	Tyrosin	3	3	5	4	4	3
	Phenylalanin	10	12	14	13	12	10
	Lysin	19	21	17	18	20	16
20	Arginin	15	16	16	18	18	16
	$\Sigma =$	450	478	522	525	502	449
25	MG =	43.500	46.700	52.720	53.050	51.250	45.900

Zur Gewinnung der polydispersen nativen *Pseudomonas aeruginosa* Flagella(H)-Antigene werden nach dem Vorschlag der Anmelderin Bakterienkulturen in Minimalmedium angezüchtet und anschließend mit einem Detergens behandelt, wonach die Flagella(H)-Antigene aus der Kultur abgetrennt werden. Dabei kann die Bakterienkultur vor der Detergentsbehandlung desintegriert und einem Scherprozeß unterworfen werden. Durch den Zusatz von Detergens wird die Trennbarkeit des Antigens von der Bakterienmasse bewirkt; die sich dann in Lösung befindlichen Antigene können abgetrennt werden.

Anschließend können die, wie oben beschrieben, von der Bakterienmasse abgetrennten Antigene durch eine chromatographische Reinigung von anhaftenden Verunreinigungen wie Lipopolysacchariden, Nucleinsäuren, Salzen, Polysacchariden u. a. befreit werden. Das noch vorhandene Detergens kann durch einen weiteren säulenchromatographischen Reinigungsschritt entfernt werden.

Es war bisher nicht bekannt, ob diese Antigene protektive Wirkung haben oder nicht. Es wurde nun gefunden, daß allen vorstehend angeführten Typen der Flagella(H)-Antigene protektive Wirkung zukommt, so daß die Herstellung bzw. Bereitstellung von monovalenten und polyvalenten Vakzinen möglich ist. Diese Aufgabe liegt der vorliegenden Erfindung zugrunde.

Im besondern ist es ein Ziel der Erfindung, eine aktive Immunprophylaxe gegen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* zu ermöglichen, insbesondere für Personengruppen, die ein hohes Risiko haben, Verbrennungen zu erleiden, z. B. für Angehörige von Feuerwehren oder militärisches Personal oder Patienten, die mit immunsupprimierenden Medikamenten behandelt werden sollen.

45 Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Immunglobulin G-hältige Präparationen zur Verfügung zu stellen, die zur passiven Immunisierung bei *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* gewonnene gereinigte *Pseudomonas*-Flagella(H)-Antigene, bestehend aus monomeren Bestandteilen, wobei jeder monomere Bestandteil

50 a) folgende Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) und Methionin (Met) enthält,

b) die N-terminale Aminosäuresequenz Alanin (Ala) - Leucin (Leu) - Threonin (Thr) - Valin (Val) - Asparagin (Asn) - Threonin (Thr) - Asparagin (Asn) - Isoleucin (Ile) - Alanin (Ala) - aufweist,

55 c) ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.050 aufweist und

d) frei ist von Prolin, Halb-Cystin und Histidin insbesondere:

das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_3, a_4 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 enthält und ein Molekulargewicht von 43.500 aufweist;

60 das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_3 , dessen monomere Form die Aminosäuren:

Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 46.700 aufweist;

5 das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 50 : 49 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 52.720 aufweist;

10 das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp b, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 53.050 aufweist;

15 das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_1, a_2 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 51.250 aufweist;

20 das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_2 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 45.900 aufweist;

25 sterilfiltriert, gegebenenfalls mit einem Adjuvans, wie $\text{Al}(\text{OH})_3$ vermischt, gewünschtenfalls mit einem Präservans, wie Merthiolat, versetzt und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

Weiters umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin G-hältigen, gegen Bakterium Pseudomonas aeruginosa-Infektionen wirksamen Präparationen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung, die Flagella(H)-Antikörper mit einer motilitätshemmenden Wirkung sowie mit der Fähigkeit einer erhöhten Phagocytose und einer erhöhten intrazellulären Abtötung von Pseudomonas aeruginosa-Bakterien aufweisen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß Plasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren mit Proteinfällungsmitteln, wie Ammoniumsulfat, behandelt, die ausgefällte Immunglobulin G-hältige Fraktion gelöst und gereinigt wird.

30 Vorteilhaft wird die Reinigung der Immunglobulin G-hältigen Fraktion durchgeführt, indem die Lösung über ein Trägermedium geleitet wird, an welchem gereinigtes Flagella-Antigen in monomerer oder polymerer Form kovalent gebunden ist, die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrope Agentien, wie NH_4SCN , vom Gel eluiert und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

35 Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert, wobei die Beispiele 1 bis 3 die Herstellung von Vakzinen und Beispiel 4 die Herstellung von Immunglobulin G-hältigen Präparationen veranschaulichen.

Beispiel 1:

Vakzine-Formulierung für eine Pseudomonas aeruginosa M-2 Flagellenvakzine

Eine aus Bakterium Pseudomonas aeruginosa M-2-Kultur gewonnene und in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösung wurde mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde die Lösung durch Sartorius-Eimfilter (0,2 μm) sterilfiltriert.

40 Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler NaCl-/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 μg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl-/Merthiolatlösung auf 20 μg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt pro ml:

20 μg Flagellenprotein

2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$

50 9 mg NaCl
0,1 mg Merthiolat als Stabilisator.

Beispiel 2:

Vakzine-Formulierung für eine Pseudomonas aeruginosa 1210 Flagellenvakzine

Eine aus Bakterium Pseudomonas aeruginosa 1210-Kultur gewonnene und in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösung wurde mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde die Lösung durch Sartorius-Eimfilter (0,2 μm) sterilfiltriert.

60 Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler

NaCl-/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 µg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl-/Merthiolatlösung auf 20 µg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt somit pro ml:

5 20 µg Flagellenprotein
 2 mg Al(OH)₃
 9 mg NaCl
 0,1 mg Merthiolat als Stabilisator

10 Beispiel 3:

Vakzine-Formulierung für eine *Pseudomonas aeruginosa* polyvalente Flagellenvakzine

Aus Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen der Typen M-2, 1210, 5142, 5939, 5940 und 170018 gewonnene, in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösungen wurden mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von jeweils 100 µg/ml eingestellt, zu gleichen Teilen vermischt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde durch Sartorius-Einmalfilter (0,2 µm) sterilfiltriert.

Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler NaCl-/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 µg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl-/Merthiolatlösung auf 20 µg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt somit pro ml:

25 20 µg Flagellenproteine
 2 mg Al(OH)₃
 9 mg NaCl
 0,1 mg Merthiolat als Stabilisator#

Beispiel 4:

Pyrogentest

In beschriebener Weise bereitete Vakzine wurde auf das Freisein von pyrogenen Bestandteilen geprüft. Das Versuchsprinzip besteht darin, daß nach der i. v.-Injektion des Produktes in drei oder mehr gesunde, ausgewachsene Kaninchen drei Stunden lang die Temperatur gemessen wird (Eur. Ph., 2nd Ed., 1980, Part 1, V.2.1.4.); der maximale Temperaturanstieg wird für jedes Kaninchen aufgezeichnet und gilt als ein Maß für die Pyrogenität des Produktes.

35 Für die Durchführung des Versuches wurden verwendet:
Thermoden (Cu-Konstantan Thermoelemente für Kaninchen, Ph-Schenk); Temperaturschreiber (Sechsfarbenpunktdrucker Type STD 62A, Meßbereich 36 bis 42° C, Meßgenauigkeit +0,08° C); sterile, pyrogenfreie Plastikinjektionsspritzen; sterile, pyrogenfreie Injektionsnadel; Stahlpyrogentestbox mit Halsfixierung; Wagen für sechs Pyrogentestboxen; Wasserbad mit Thermostat; Thermometer; Waage: Sauter ES 120.

Als Versuchstiere wurden gesunde, ausgewachsene Kaninchen beiderlei Geschlechts eingesetzt, die mindestens 1500 g wogen, mit einer vollwertigen antibiotikafreien Standarddiät gefüttert wurden und in der dem Versuch vorausgegangenen Woche keinen Gewichtsabfall zeigten.

45 Als Probe wurde eine nicht adjuvantierte M2-Flagellenvaccine verwendet und vor der Injektion auf etwa 38° C erhitzt. Der Versuch wurde mit einer Gruppe von drei Kaninchen durchgeführt, die mindestens 90 min vor Testbeginn in die Pyrogentestboxen gebracht wurden.

Für jedes Kaninchen wurde als Anfangstemperatur der Mittelwert aus zwei in einem Abstand von 30 min und in dem Bereich von 40 min vor Verabreichung der Prüflösung erfolgenden Temperaturmessungen bestimmt; Kaninchen, die bei der Bestimmung der Anfangstemperatur zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen eine größere Temperaturabweichung als 0,2° C zeigten, wurden nicht für den nachfolgenden Versuch eingesetzt. Für die Prüfung wurden nur Kaninchen eingesetzt, die sich in ihrer Anfangstemperatur um nicht mehr als 0,1° C unterschieden. Alle Kaninchen, die eine Anfangstemperatur hatten, die höher als 39,8° C oder niedriger als 38,0° C lag, wurden nicht im Hauptversuch eingesetzt. Es wurden 1 ml der Probe/kg Körpergewicht langsam in die Ohrrandvene eines jeden Kaninchens injiziert. Die Injektionsdauer betrug höchstens 4 min. Als Maximaltemperatur wurde für jedes Kaninchen die höchste registrierte Temperatur in drei Stunden nach der Injektion bestimmt. Die Temperatur eines jeden Kaninchens wurde in Abständen von höchstens 30 min aufgezeichnet, beginnend mindestens 90 min vor Verabreichung der Prüfsubstanz und endend drei Stunden nach der Injektion. Die Differenz zwischen der Anfangstemperatur und der Maximaltemperatur eines jeden Kaninchens wurde als Ergebnis gewertet. Negative Differenzen wurden als Null gewertet.

Auswertung:

Zur Auswertung wurden die Temperaturdifferenzen summiert. Bei einer Gruppe von drei Kaninchen entspricht die Probe den Anforderungen, wenn die Summe der Einzelwerte kleiner als $1,15^{\circ}\text{C}$ ist. Ist die Summe größer als $2,65^{\circ}\text{C}$, so entspricht die Probe nicht den Anforderungen.

Bei Ergebnissen, die zwischen den beiden oben genannten Werten liegen, muß der Test wie oben beschrieben wiederholt werden. Es wurden maximal drei Wiederholungen durchgeführt.

Zur Auswertung nach Wiederholungen wurden alle getesteten Tiere (3, 6, 9 oder maximal 12) herangezogen. Die Prüfkriterien sind in der folgenden Tabelle enthalten:

10	Anzahl Kaninchen	Die Substanz entspricht der Prüfung auf Pyrogenfreiheit, wenn die Summe der Einzelwerte kleiner ist als	Die Substanz entspricht nicht der Prüfung, wenn die Summe der Einzelwerte größer ist als
15			
	3	$1,15^{\circ}$	$2,65^{\circ}$
	6	$2,80^{\circ}$	$4,30^{\circ}$
	9	$4,45^{\circ}$	$5,59^{\circ}$
20	12	$6,60^{\circ}$	$6,60^{\circ}$

Die Probe entspricht den Prüfungserfordernissen, wenn die Summe der drei Einzelwerte kleiner als $1,15^{\circ}\text{C}$ ist, oder bei Wiederholung die in der obigen Tabelle angeführten Bedingungen erfüllt.

25 Die erhaltenen Ergebnisse bei dem geprüften M-2-Flagellenimpfstoff nach Injektion von 1 ml/kg Kaninchen bei individuellen Δt -Werten von drei Kaninchen waren die folgenden:

Impfstoffkonzentration

30	10 µg/ml	0,1°	0,1°	0,3°	$\Sigma\Delta t$ 0,5° C
	10 µg/ml	0,3°	0,4°	0,2°	$\Sigma\Delta t$ 0,9° C
	20 µg/ml	0,3°	0,5°	0,2°	$\Sigma\Delta t$ 1,0° C
	20 µg/ml	0,2°	0,1°	0,2°	$\Sigma\Delta t$ 0,5° C
	20 µg/ml	0,1°	0,4°	0,2°	$\Sigma\Delta t$ 0,7° C

35 Die geprüfte Präparation ist somit als frei von pyrogenen Substanzen anzusprechen.

Beispiel 5:

Isolierung der IgG-Fraktion aus Maus-Hyperimmunplasma zur Verwendung bei passiver Immunisierung
40 Plasma von mit protektivem Flagella(H)-Antigen des Typs M-2 immunisierten Mäusen wurde gesammelt, 30 min bei 56°C unter Schütteln erhitzt, um Fibrin auszufällen. Nach Zentrifugieren während 30 min bei 10.000 x g wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 % (w/v) eine Fällung durchgeführt. Die Suspension wurde 20 min gerührt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierauf wurde die Suspension während 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert und einmal mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Die Fällung wurde in 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH-Wert 7,5, 50 mM NaCl, gelöst und anschließend über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Nach Zentrifugation wurde eine Ionenaustrauschchromatographie (DE-52 Cellulose (Whatman)) durchgeführt. Der Durchlauf enthielt Immunglobulin-G (IgG). Nach Austestung auf IgG wurde die Lösung auf das Ausgangsvolumen mit einer Amicon-Zelle konzentriert und über Nacht gegen eine 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Anschließend wurde eine Gelchromatographie mit Sephadex G-200 durchgeführt. Die IgG-positiven Fraktionen wurden unter Verwendung einer Amicon-Zelle auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert.

Dieses Verfahren stellt eine Modifikation der von D.M.Weir in Edition Handbook of Experimental Immunology, 3rd Edition 1978, Chapter VII, VIII beschriebenen Methode dar.

Im Rahmen der Herstellung von gegen Flagella Antigene der Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* monospezifisch wirksamen Immunglobulinen können jedoch auch andere bekannte Methoden außer der Ammonsulfatfällung herangezogen werden, z. B. eine DEAE-Chromatographie, eine Protein A-Affinitätschromatographie oder kombinierte Methoden, die dem Fachmann bekannt sind. Die Immunglobulin G-Präparationen können durch immunaffinitätschromatographische Arbeitsweisen zu monospezifischen Immunglobulinen wieder weitergereinigt werden.

60 Für die Präparation der monospezifischen Immunglobuline wird mit Vorteil als Immunosorbens ein Trägermedium - vorzugsweise Sepharose 4B - verwendet, woran gereinigtes Flagellenantigen in monomerer oder

polymerer Form kovalent gebunden ist.

Die IgG-hältige Lösung kann sodann mit einer Flußrate von vorzugsweise 1 bis 2 Säulenvolumina pro Stunde über das Affinitätsharz gepumpt werden. Nach dem Waschen des Harzes mit Pufferlösungen höherer Ionenstärken (z. B. 0,5 M NaCl) können die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrope Agentien (z. B. 3 M NH₄SCN) vom Gel eluiert werden.

5 Die Wirksamkeit von erfindungsgemäßen protektiven Antigenen und Antikörpern ist im folgenden dargestellt:

Der Nachweis der protektiven Wirksamkeit von erfindungsgemäß für Vakzine zu verwendenden Antigenen erfolgt durch den Nachweis von Flagella(H)-Antikörpern im Serum von Personen, die eine Infektion mit Pseudomonas aeruginosa erlitten haben.

10 Zur Konzentrationsbestimmung von anti-Flagella Antikörpern wird ein Immunabsorbent Assay, u. zw. ein "Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay" (ELISA) oder Radio Immunoassay (RIA) verwendet. Die erfindungsgemäß beschriebenen, hochgereinigten Flagella(H)-Antigene werden mit einem starken Detergens depolymerisiert, anschließend über unspezifische Wechselwirkung an eine Kunststoffoberfläche gebunden und mit Proben von Humanserum in Kontakt gebracht. Befinden sich im Humanserum anti-Flagella(H)-Antikörper, so binden diese spezifisch an das auf der festen Phase immobilisierte Antigen. Mit einem markierten anti-Human-IgG-Antikörper werden auf der Kunststoffoberfläche gebildete Flagella(H)-Antigen-Antikörperkomplexe nachgewiesen.

15 Dieses Verfahren lässt sich leicht quantitativ auswerten. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse eines Screenings von Serumproben auf Antikörper gegen verschiedene Flagella-Serotypen.

20

Tabelle 3

Flagella(H)-Antikörpertiter in Humanseren

25

	Pseudomonas aeruginosa-Stamm	M2	1210	5939	5940	5142	170018
30	H-Serotyp	b	a ₀ a ₁ a ₂	a ₀ a ₃	a ₀ a ₂	a ₀	a ₀ a ₃ a ₄
	Serum #						
35	1	-	-	+	-	-	+
	2	(+)	(+)	++++	+	+	++++
	3	++	++++	++++	++++	++	++++
	4	-	-	-	-	-	-
	5	+	(+)	++	+	-	+
40	6	++	-	(+)	-	+	-
	7	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	++	-	-	++
	9	-	-	-	-	-	-
	10	-	+	+	+	-	+
45	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	13	-	+	(+)	(+)	-	++
	14	+	-	-	-	+	-
	15	+	+	+	+	+	++
50	- keine Antikörper nachweisbar			++ Titer > 1 : 100		++++ Titer > 1 : 300	
	(+) knapp über der Nachweisgrenze			+++ Titer > 1 : 200			
	+ Titer > 1 : 20 > 1 : 100						

55 Durch die in Tabelle 3 angeführten Ergebnisse über die Auffindung von Flagella(H)-Antikörpern in Seren von nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Spendern ist die Immunogenität von nativen Pseudomonas aeruginosa Flagella(H)-Antigenen demonstriert.

Antikörper initiieren die Abwehr von in den Körper eingedrungenen Fremdorganismen in verschiedener Weise. Zusammen mit dem humoralen Abwehrsystem (Komplementsystem) werden von Antikörpern erkannte Fremdorganismen in einer Aufeinanderfolge von Reaktionen durch Lyse abgetötet. Weiterhin können an den Fremdorganismus gebundene Antikörper im Zusammenwirken mit Bestandteilen des Komplementsystems die Aufnahme (Phagocytose) des Fremdorganismus in die Abwehrzellen des Immunsystems (z. B. Granulocyten)

induzieren. Im Inneren der Granulocyten kommt es üblicherweise zu einer Abtötung der phagocytierten Fremdzelle.

Im Falle flagellenträgender Bakterien kann eine Schutzwirkung von Antikörpern, die gegen den Bewegungsapparat der Zelle gerichtet sind, auch auf die Hemmung der Motilität und damit der Ausbreitung eines Infektionsherdes zurückgeführt werden.

Die Motilitäthemmung durch Flagella(H)-Antikörper kann dadurch demonstriert werden, daß Flagella(H)-Antigene der in Tabelle 1 aufgeführten Serotypen zur Immunisierung von Mäusen verwendet und das so gewonnene anti-Flagella(H)-Serum bei Motilitäts-Hemmversuchen eingesetzt wird. Mit Antiserum getränkte Filterpapierringe werden auf Motilitäts-Agarplatten gelegt und der Agar innerhalb dieser Ringe mit einer Suspension des homologen Pseudomonasstammes beimpft. Die Zellmenge, die nach 24 h Inkubation außerhalb des Filterpapierringes sichtbar wird, dient als Maß für die Beurteilung der Motilitäthemmung. Die Ergebnisse der Tabelle 4 zeigen, daß mit Flagella(H)-Antigenen gewonnene Maus-Antisera die Motilität des homologen Pseudomonas Bakterienstammes hemmen.

15

Tabelle 4

20

Motilitäthemmung bei verschiedenen Mengen an homologem Antiflagellenserum

25

30

40

	Stamm	homologes Antiflagellenserum (µl Serum/µl Keimsuspension*)			
		30/5	20/10	10/10	5/10
	M-2	-	-	+-	+-
	1210	-	+	+	+
	5939	-	-	-	-
	5940	-	-	-	-
	5142	-	+-	+-	+-
	170018	-	+-	+-	+-

*) Keimsuspension 10^3 Keime/ml

- keine Zellen außerhalb des Filterpapierringes

+- Zellen nur an einigen Stellen außerhalb des Filterpapierringes

+ geringes Zellwachstum außerhalb des Filterpapierringes

++ deutliches Zellwachstum außerhalb des Filterpapierringes mit normalem Mausserum immer deutliches Zellwachstum (++)

45

Durch die Hemmung der Motilität der in einem Infektionsherd befindlichen Bakterien wird zwar deren weitere Ausbreitung nach der Kolonisierung im Körper des Patienten verhindert, die im Herd befindlichen Bakterien bleiben jedoch weiterhin in der Lage, den Organismus des Patienten durch Abgabe z. B. von Toxinen, Proteasen, etc. zu belasten. Ein echter Schutz gegen Infektion ist nur dann gewährleistet, wenn die bei der aktiven Immunisierung gebildeten Antikörper zu einer schnellen Abtötung der eingedrungenen Bakterien führen.

Im folgenden wird der Nachweis geliefert, daß Flagella(H)-Antikörper Phagocytose und intrazelluläre Abtötung des homologen Pseudomonas Bakterienstammes induzieren.

50

Zum Phagocytosetest wurden ein in Tabelle 3 nicht aufgeführtes Serum (# 16) sowie die Sera # 3 und # 5 mit einer flagellenlosen (*fla*⁻) Mutante des *Pseudomonas aeruginosa* Stammes M-2 (Montie, T.C., D. Doyle-Huntzinger, R.C. Craven, and I.A. Holder (1982) Infect. Immun. 38, 1296-1298) vorinkubiert, um alle nicht Flagella-spezifischen Antikörper aus den Sera zu entfernen. Isolierte Humangranulocyten wurden zur Bestimmung der intrazellulären Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* M-2 und der isogenen flagellenlosen Mutante in unbehandeltem und in vorabsorbiertem Serum eingesetzt. Die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Flagella(H)-Antikörper die Phagocytose und die darauffolgende intrazelluläre Abtötung des flagellenträgenden Stammes von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren, und damit im Sinne der Erfindung eine Schutzwirkung gegen Infektionen mit diesem Keim haben.

60

Tabelle 5

Phagocytose und intrazelluläre Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* M-2 und einer isogenen flagellenlosen Mutante

5	Serum #	Verdünnung	Intrazelluläre Abtötung			Pseudomonas aeruginosa M-2 fla ⁻		
			Pseudomonas aeruginosa M-2 Serum	Serum abs.	Serum ohne Granulocyten	Serum	Serum abs.	Serum ohne Granulocyten
10	3	1 : 25	94 %	59 %	n. b.	92 %	0 %	n. b.
		1 : 100	52 %	24 %	n. b.	36 %	0 %	n. b.
		1 : 250	19 %	13 %	n. b.	16 %	3 %	n. b.
15	5	1 : 25	95 %	51 %	0 %	92 %	1 %	0 %
		1 : 100	72 %	29 %	0 %	58 %	2 %	0 %
		1 : 250	35 %	25 %	0 %	21 %	0 %	0 %
20	16	1 : 25	95 %	57 %	0 %	93 %	0 %	0 %
		1 : 100	78 %	24 %	n. b.	70 %	0 %	n. b.
		1 : 250	5 %	0 %	n. b.	10 %	0 %	n. b.

Der direkte Nachweis der Schutzwirkung von Antigenen, die zu aktiver Immunisierung verwendet werden sollen, kann nur im Tiermodell geführt werden. Um die Situationen zu simulieren, die Patienten für *Pseudomonas*-Infektionen prädisponieren, fanden zwei in der Literatur beschriebene Tiermodelle Verwendung: das burned mouse Modell (Stieritz, D.D., and I.A. Holder (1975) J. Infect. Dis. 131, 688-691) und das Endoxan Modell (Cryz, S.J.Jr., Furer, E., Germanier, R. (1983) Infect. Immunity 40, 659-664).

Für beide Modelle wurden die LD₅₀ Dosis von *Pseudomonas aeruginosa* in nicht immunisierten Tieren ermittelt, die im Falle des Endoxan Modelles immunsupprimiert wurden; beim burned mouse Modell wurde eine Verbrennung definierter Größe gesetzt. Nach der Immunisierung mit den in Tabelle 6 angeführten Flagella(H)-Antigenen wurden Tiere mit Verbrennungen bzw. immunsupprimierte Tiere mit einem Vielfachen der vorher ermittelten LD₅₀ Keimzahl des homologen *Pseudomonas*-Stammes infiziert. Tabelle 6 zeigt die Vielfachen der LD₅₀ Keimzahlen, die von 100 % der mit der angegebenen Konzentration von Antigen immunisierten Tiere im Endoxan- und im burned mouse-Modell toleriert werden.

Tabelle 7 zeigt die Abhängigkeit der Schutzwirkung des M-2 Flagella-Antigens. In diesem Fall wurden die Tiere mit steigenden Mengen von M-2 Antigen immunisiert und in beiden Modellen getestet. In beiden Fällen ist eine eindeutige Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung des zur Immunisierung verwendeten M-2 Flagella-Antigens zu erkennen.

Tabelle 6

40 Aktive Schutzversuche mit *Pseudomonas aeruginosa* Flagella(H)-Antigenen

45	Antigen	Menge/Maus adjuvantiert mit Al(OH) ₃	Immunisierung Tage vor Chall.	Endoxanmodell	Burned mouse Modell
				x LD ₅₀	x LD ₅₀
50	M-2	1 µg	14	10	>10 ³
		3 µg	14	30	>10 ⁴
		3 µg	14 + 7	30	> 10 ⁴
55	1210	3 µg	14 + 7	30	>10 ⁴
	M-2 + 1210	je 1,5 µg	14	10 ² M-2 10 1210	>10 ⁴ M-2 >10 ⁴ 1210
		1210			
	Polyva- lent (6 Typen)	je 3 µg	14 + 7	10 ² M-2 10 1210	10 ⁴ M-2 10 ⁴ 1210

Tabelle 7

Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung des M-2 Flagella(H)-Antigens

	Zahl der Challenge-Keime (x LD ₅₀)	Zahl der überlebenden Tiere:		a) Endoxanmodell		b) burned mouse modell	
		3 µg a)	1 µg a)	0,3 µg a)	0,1 µg a)	0,03 µg a)	0,01 µg a)
10	10	100 %	80 %	89 %	90 %	100 %	90 %
	30	100 %	80 %	100 %	30 %	90 %	20 %
	100						
15	300	80 %	60 %	90 %	20 %	90 %	10 %
	1000	90 %	50 %	90 %	10 %	100 %	0 %
		100 %	30 %	100 %	20 %	70 %	0 %

Der direkte Nachweis der Schutzwirkung von Antikörpern, die zu passiver Immunisierung verwendet werden sollen, kann nur im Tiermodell geführt werden. Um eine der Situationen zu simulieren, die Patienten für Pseudomonas-Infektionen prädisponieren, fand das in der Literatur beschriebene Endoxan-Modell (Cryz, S.J.Jr., Fürer, E., Germanier, R. 1983: Passive Protection Against Pseudomonas aeruginosa Infection in an Experimental Leukopenic Mouse Model. Infect. Immunity 40, 659-664) Verwendung.

In diesem Test wird die LD₅₀ Dosis von Pseudomonas aeruginosa Keimen in immunsupprimierten Tieren ermittelt; - im Falle des hier beschriebenen Experiments lag diese bei $9,5 \times 10^2$ Keimen. Zwei Stunden nach der passiven Immunisierung mit einem Maus anti-Pseudomonas aeruginosa M-2 Hyperimmunplasma, für das im Antikörper-ELISA eine Titerstufe von 1 : 1600 bestimmt wurde, werden die immunsupprimierten Tiere mit einem Vielfachen der vorher ermittelten LD₅₀-Keimzahl des homologen Pseudomonas-Stammes infiziert.

Tabelle 8 zeigt, daß passiv immunisierte Tiere bis zu einer 30-fachen LD₅₀-Dosis des Challenge Keims geschützt sind.

Tabelle 8

Passiver Pseudomonas-Schutzversuch

	Inoculum 2 Stunden von Infektion	Zahl der überlebenden Tiere nach 3 Tagen (Zahl der Tiere im Versuch)	
		0,1 ml Kontrollplasma i. v.	0,1 ml Hyperimmunplasma i. v.
40	3 LD ₅₀ von M-2	0 (10)	9 (10)
	10 LD ₅₀ von M-2	0 (10)	8 (10)
	30 LD ₅₀ von M-2	0 (10)	6 (10)
	100 LD ₅₀ von M-2	0 (10)	0 (10)
45	300 LD ₅₀ von M-2	0 (10)	0 (10)

PATENTANSPRÜCHE

5

1. Verfahren zur Herstellung von gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen wirksamen Präparationen, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* gewonnene gereinigte *Pseudomonas*-Flagella(H)-Antigene, bestehend aus monomeren Bestandteilen, wobei jeder monomere Bestandteil a) folgende Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) und Methionin (Met) enthält,
 - b) die N-terminale Aminosäuresequenz Alanin (Ala) - Leucin (Leu) - Threonin (Thr) - Valin (Val) - Asparagin (Asn) - Threonin (Thr) - Asparagin (Asn) - Isoleucin (Ile) - Alanin (Ala) - aufweist,
 - c) ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.050 aufweist und
 - d) frei ist von Prolin, Halb-Cystin und Histidin insbesondere:
das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_3, a_4 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 enthält und ein Molekulargewicht von 43.500 aufweist;
 - das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_3 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 46.700 aufweist;
 - das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 50 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 52.720 aufweist;
 - das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp b, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 53.050 aufweist;
 - das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_1, a_2 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 51.250 aufweist;
 - das neue Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a_0, a_2 , dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 45.900 aufweist;
sterilfiltriert, gegebenenfalls mit einem Adjuvans, wie Al(OH)_3 vermischt, gewünschtenfalls mit einem Präservans, wie Merthiolat, versetzt und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.
2. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin G-hältigen, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksamen Präparationen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung, die Flagella(H)-Antikörper mit einer Motilitätshemmenden Wirkung sowie mit der Fähigkeit einer erhöhten Phagocytose und einer erhöhten intrazellulären Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien aufweisen, **dadurch gekennzeichnet**, daß Plasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen gemäß Anspruch 1 immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren mit Proteinfällungsmitteln, wie Ammoniumsulfat, behandelt, die ausgefällte Immunglobulin G-hältige Fraktion gelöst und gereinigt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reinigung der Immunglobulin G-hältigen Fraktion durchgeführt wird, indem die Lösung über ein Trägermedium geleitet wird, an welchem gereinigtes Flagella-Antigen in monomerer oder polymerer Form kovalent gebunden ist, die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrop Agentien, wie NH_4SCN , vom Gel eluiert und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

60