



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 34 460 T2 2008.01.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 204 420 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 34 460.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/03223**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 954 737.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/013942**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/00 (2006.01)**

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9919732 19.08.1999 GB

(73) Patentinhaber:

Immunobiology Ltd., Babraham, Cambridge, GB

(74) Vertreter:

Murgitroyd & Company, 48149 Münster

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**COLACO, Camilo Anthony, Cambridge CB2 2JN,
GB**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON TREHALOSE PRODUZIERENDEN PROKARYOTISCHEN ZELLEN ALS IMPF-STOFFE**

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] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Impfstoffe. Genauer gesagt bezieht sie sich auf Verfahren zum Produzieren von Impfstoffen von Trehalose enthaltenden prokaryotischen Zellen und die dadurch erhaltenen Zusammensetzungen.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK:

[0002] Prokaryotische Zellen, insbesondere Bakterien, werden weitreichend und zunehmend in medizinischen, landwirtschaftlichen und industriellen Anwendungen verwendet. Landwirtschaftliche oder ökologische Anwendungen umfassen biologische Pestizide und biologische Sanierung. Medizinische Anwendungen umfassen die Verwendung von Bakterien in Impfstoffen sowie zur Produktion von pharmazeutischen Produkten für andere Behandlungen.

[0003] Damit die prokaryotischen Zellen effektiv verwendet werden können, sowohl in Hinsicht auf die erwünschten Ergebnisse als auch in Hinsicht auf die Kosten, müssen die Zellen über signifikante Zeiträume gelagert werden können, während ihre Lebensfähigkeit bewahrt bleibt. Der Begriff Lebensfähigkeit wird hierin verwendet, um anzudeuten, dass die Zellen die Merkmale eines funktionierenden, lebenden Organismus aufzeigen, wie etwa Metabolismus und Zellteilung.

[0004] Verfahren zum Bewahren lebender prokaryotischer Zellen leiden unter verschiedenen ernsthaften Nachteilen, wie etwa, dass sie viel Energie verbrauchen und Kühlagerung erfordern. So wird häufig Gefriertrocknung zur Bewahrung und Lagerung von prokaryotischen Zellen verwendet. Sie weist jedoch die unerwünschte Eigenschaft auf, die Lebensfähigkeit der Zellen signifikant zu reduzieren, sowie, dass sie viel Zeit und Energie verbraucht und daher teuer ist.

[0005] PCT WO98/24882 beschreibt einen Prozess des Stabilisierens von prokaryotischen Zellen durch die Induktion einer Trehalosesynthese und das Trocknen der sich daraus ergebenden Zellen in einer glasartigen Kohlenhydratmatrix. Dieser Prozess ergibt stabilisierte Zellen, die bei Umgebungstemperaturen ohne Verlust von Lebensfähigkeit gelagert werden können. Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid) ist ein natürlich vorkommendes, nicht reduzierendes Disaccharid, von dem ursprünglich herausgefunden wurde, dass es mit der Verhinderung von Dehydratisierungsschäden bei gewissen Pflanzen und Tieren assoziiert war, die ohne Schaden austrocknen können und sich wiederbeleben lassen, wenn sie rehydriert werden. Es wurde gezeigt, dass Trehalose dafür nützlich ist, die Denaturierung von Proteinen, Viren und Lebensmitteln während der Dehydratisierung zu verhindern, siehe

U.S.-Patente Nr. 4,891,319; 5,149,653; 5,026,566; Colaco et al. (1992), Bio/Tech. 10: 1007-1011.

[0006] Die Trehalosesynthese wird in prokaryotischen Zellen durch eine Anzahl von Verfahren induziert, einschließlich des osmotischen Schocks, der die endogene Produktion von Trehalose induziert, Welsh et al. (1991), J. Gen. Microbiol. 137: 745-750.

[0007] Die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 95/03395 beschreibt einen Prozess der Verbesserung der Lebensfähigkeit von getrockneten bakteriellen Zellen durch die Induktion von Trehalosesynthese mittels Nährstoffbegrenzung, Hitzeschock oder Osmoadaptation. Die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 98/24882 beschreibt ein Verfahren für die Bewahrung von prokaryotischen Zellen durch das Trocknen der Zellen in einer Kohlenhydratmatrix nach der Induktion der Trehalosesynthese. Die letztere Erfindung stellt Zusammensetzungen aus getrockneten Zellen bereit, die bei Umgebungstemperaturen gelagert werden können und somit eine Anzahl von industriellen Anwendungen ermöglichen.

[0008] Überraschenderweise haben wir nun herausgefunden, dass getrocknete, stabilisierte prokaryotische Zellen, die durch die obigen Verfahren produziert werden, stärker als frische, lebende Zellen immunogen sind und somit einen besonderen Wert als der immunogene bestimmende Wirkstoff in Impfstoffzusammensetzungen aufweisen. Des Weiteren haben wir auch herausgefunden, dass diese erhöhte Immunogenität der stabilisierten prokaryotischen Zellen nicht von dem Trocknungsprozess abhängig ist, der bei den obigen Stabilisierungsprozessen als essenziell angesehen wird, sondern sich aus der Induktion der Trehalosesynthese ergibt. Obwohl sie bei getrockneten Zellen stärker hervortritt, wird diese erhöhte Immunogenität auch bei Zellen gesehen, die induziert wurden, Trehalose zu produzieren, die aber keinem Trocknungsprozess unterzogen wurden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG:

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt somit ein Verfahren zum Erhöhen der Immunogenität einer Impfstoffzusammensetzung, die prokaryotische Zellen als den immunogenen bestimmenden Wirkstoff beinhaltet, bereit, wobei das Verfahren die folgenden Schritte beinhaltet:

- a. Behandeln von prokaryotischen Zellen in vitro unter Bedingungen, so dass eine Erhöhung der Konzentration von Trehalose innerhalb prokaryotischer Zellen durch die Synthese von Trehalose innerhalb der Zelle induziert wird;
- b. Verwenden der induzierten Zellen, die Trehalose beinhalten, als den immunogenen bestimmenden Faktor bei der Produktion einer Impfstoffzusammensetzung.

[0010] Vorzugsweise wird die Behandlung der prokaryotischen Zellen ausgeführt, um eine Konzentration von Trehalose innerhalb der Zellen von mindestens 10 mM zu erhalten.

[0011] Vorzugsweise werden die induzierten Zellen, die die Trehalose enthalten, vor ihrer Verwendung bei der Produktion der Impfstoffzusammensetzung getrocknet, besonders in Gegenwart eines nicht reduzierenden Kohlenhydrats wie etwa Trehalose, um einen lagerungsstabilen, aber lebensfähigen immunogenen bestimmenden Faktor für die Lagerung vor der Verwendung in einer Impfstoffzusammensetzung bereitzustellen.

[0012] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Immunisieren eines Tieres bereit, das das Verabreichen einer pharmazeutisch effektiven Menge einer Impfstoffzusammensetzung der Erfindung an ein Tier beinhaltet, wobei die Menge ausreicht, um in dem Tier eine Immunreaktion hervorzurufen.

[0013] Die Impfstoffzusammensetzung enthält vorzugsweise ein Adjuvans für den immunogenen bestimmenden Faktor, wird in einem wässrigen Trägermedium aufgesetzt und mittels Injektion verabreicht.

[0014] Die prokaryotischen Zellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind solche, die dazu fähig sind, Trehalose zu synthetisieren. Diese Fähigkeit kann arteigen oder durch rekombinante Techniken vermittelt sein. Die Fähigkeit einer prokaryotischen Zelle, Trehalose zu synthetisieren, kann bestimmt werden, indem die Trehalosekonzentration wie unten beschrieben gemessen wird.

[0015] Der Begriff prokaryotisch wird hier verwendet, um Zellen zu bezeichnen, die Eigenschaften von Prokaryoten aufzeigen, bei denen es sich typischerweise um einzellige Organismen handelt, denen Organellen (wie etwa Mitochondrien, Chloroplasten und der Golgi-Apparat) fehlen, denen ein Zytoskelett fehlt und denen ein separater Zellkern fehlt. Beispiele prokaryotischer Zellen für die vorliegende Verwendung umfassen Bakterien, wie etwa Eubakterien, Cyanobakterien und Prochlorophyten; Archäobakterien; und andere Mikroorganismen wie etwa Rickettsien, Mykoplasmen, Spiroplasma und Chlamydien. Bevorzugte prokaryotische Zellen für die vorliegende Verwendung sind Bakterien.

[0016] Im Allgemeinen sollte jede prokaryotische Zelle oder Mischung von Zellen, insbesondere Bakterien, die Trehalosesynthasegene enthalten, fähig sein, Trehalose zu synthetisieren. Bakterien weisen zwei Gene auf, die an der Trehalosesynthese beteiligt sind (d. h. T-Phosphatsynthase und T-P-Phosphatase), wohingegen Hefen mindestens drei Gene aufweisen, und Kombinationen dieser Gene können verwendet werden, um die Trehalosesynthese zu er-

möglichen. Beispiele von Bakterien, die das Trehalosesynthasegen enthalten, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Enterobacteriaceae, wie etwa Salmonella und Escherichia (z. B. S. typhimurium und E. coli); halophile und halotolerante Bakterien, wie etwa Ectothiorhodospira (z. B. E. halochloris); Micrococcaceae, wie etwa Micrococcus (z. B. M. luteus); Rhizobium-Species wie etwa R. japonicum und R. leguminosarum bv. phaseoli; Cyanobacteria; Mycobacteria-Species wie etwa M. tuberculosis, M. bovis und M. smegmatis.

[0017] Prokaryotische Zellen können induziert werden, Trehalose zu synthetisieren, indem die Zellen in vitro unter anstrengenden Bedingungen, z. B. osmotischem Schock, Wärme oder Sauerstoffbegrenzung (Schock), Kohlenstoff-/Stickstoffentzug oder einer beliebigen Kombination der obigen kultiviert werden. Geeignete Bedingungen umfassen diejenigen Bedingungen des Wärmeschocks und andere, die zum Beispiel in den PCT-Veröffentlichungen Nr. WO 95/03395 und WO 98/24882 beschrieben werden. Alternativ dazu kann die Verwendung von Inhibitoren, wie etwa Valinomycin, von (einem) Enzym(en) wie etwa Trehalase, die an dem Trehaloseabbau beteiligt sind, ebenfalls zu einer Erhöhung der Trehalosekonzentration innerhalb der Zellen führen. Alternativ dazu kann die genetische Struktur des prokaryotischen Organismus modifiziert werden, um denjenigen Abschnitt der genetischen Struktur zu entfernen oder zu inhibieren, der die Synthese von Trehalose innerhalb der Zellen inhibiert oder einschränkt, so dass die Zellen ohne die Notwendigkeit, externe Stimuli anzuwenden, Trehalose konstitutiv synthetisieren, während sie kultiviert werden. Eine derartige genetische Modifizierung kann unter Verwendung einer beliebigen geeigneten Technik erreicht werden. Aus praktischen Gründen wird die Erfindung im Folgenden in Hinsicht auf die Verwendung externer Stimuli zum Induzieren der Produktion von Trehalose innerhalb der Zelle beschrieben, statt in Hinsicht auf die Verwendung einer prokaryotischen Zelle, deren genetische Struktur modifiziert wurde.

[0018] Der Begriff osmotischer Schock wird hier verwendet, um anzudeuten, dass die Konzentration gelösten Stoffs in dem Wachstumsmedium, in dem die Zellen kultiviert werden, oberhalb eines Niveaus liegt, bei dem eine Zelle in ihrer arteigenen Umgebung existiert und/oder wächst. Der gelöste Stoff kann eine Mischung von Salzen sein, und die Konzentration liegt typischerweise 0,2 bis 0,5 Mol oberhalb des Niveaus, bei dem die Zelle normalerweise kultiviert wird.

[0019] Wir glauben, dass die Induktion der Trehalosesynthese unter anstrengenden Bedingungen auch die Synthese oder Akkumulierung anderer Moleküle, die für die Bewahrung vorteilhaft sein können, induzieren kann, wie etwa von Betain und Chaperoninen,

oder die die Impfwirkung der induzierten Zellen verstärken.

[0020] Für Bakterien, insbesondere Escherichia, wird die Trehalosesynthese vorzugsweise induziert, indem die Zelle(n) unter Bedingungen hoher Osmolarität gezüchtet wird/werden, d. h. bei Salzkonzentrationen, die ausreichen, um die Trehaloseproduktion zu stimulieren. Um die Trehalosesynthese durch osmotischen Schock zu induzieren, sollte die Gesamtkonzentration von Salz(en) in dem Medium mindestens etwa 0,2 M, vorzugsweise mindestens etwa 0,4 M, besser mindestens etwa 0,5 M betragen. Die Gesamtkonzentration von Salz(en) sollte 0,6 M nicht übersteigen, da die Trehalosesynthese bei E. coli oberhalb dieses Niveaus abnimmt. Die Salzkonzentrationen entsprechen Osmolaritäten von mindestens etwa 350 mOsmol bis etwa 1,5 Osmol, vorzugsweise mindestens etwa 400 mOsmol bis 1 Osmol, am besten 250 mOsmol bis 500 mOsmol. Im Allgemeinen ist eine minimale Osmolarität von etwa 200 mOsmol erforderlich, da diese üblicherweise eine höhere Konzentration gelösten Stoffs bereitstellt als die, unter der die Zellen üblicherweise kultiviert werden.

[0021] Der notwendige gelöste Stoff kann durch die Verwendung eines einzigen Salzes, zum Beispiel 200 mM NaCl, KCl und/oder CaCl₂, bereitgestellt werden. (NH₄)₂SO₄ kann auch verwendet werden, doch dabei wird nur etwa die Hälfte der Menge an Trehalose im Vergleich zu der, die in Gegenwart von KCl, NaCl und/oder CaCl₂ produziert wird, produziert. Eine Mischung von Salzen kann ebenfalls verwendet werden. Zusätzlich dazu kann, wenn zum Erhöhen der Osmolarität des Mediums verwendet, ein nicht eindringender gelöster Stoff wie etwa Sorbit und/oder Glukose dazu beitragen, die Trehalosesynthese zu stimulieren.

[0022] Die Salzkonzentration (d. h. die Osmolarität), die erforderlich ist, um die Trehalosesynthese zu stimulieren und/oder zu induzieren, hängt von der Gattung, der Spezies und/oder dem Stamm der verwendeten prokaryotischen Zelle ab. Vorzugsweise wird eine Zelle/werden Zellen in einem Minimalmedium gezüchtet, das gelöste Stoffe enthält, und im Handel erhältliche Minimalmedien können mit gewünschten Salzen und/oder anderen gelösten Stoffen ergänzt werden. Die Verwendung eines Minimalmediums ist nicht essenziell, und es können auch definierte Medien verwendet werden. Die erforderliche Zeit, um das gewünschte Niveau an Trehalosekonzentration innerhalb der Zellen zu initiieren und zu erreichen, hängt von dem Niveau der Osmolarität sowie von der Gattung, der Spezies und/oder dem Stamm der verwendeten prokaryotischen Zelle ab. Die Trehalosesynthese beginnt im Allgemeinen innerhalb einer Stunde nach der Platzierung der Zellen in die Bedingungen, die entworfen sind, um die Trehaloseproduktion zu stimulieren. Im Allgemeinen erreicht die Syn-

these von Trehalose bei E. coli ein Maximum nach etwa 15-20 Stunden.

[0023] Die Synthese von Trehalose kann auch stimuliert werden, indem rekombinante Verfahren verwendet werden, die auf dem Gebiet wohl bekannt sind. Zum Beispiel können prokaryotische Zellen mit einem DNA-Plasmid transfiziert werden, das eine DNA-Sequenz beinhaltet, welche das angemessene Trehalosesynthasegen kodiert. Das Gen wiederum ist operativ mit einem geeigneten Promoter verknüpft, der konstitutiv oder induzierbar sein kann. Geeignete rekombinante Techniken sind zum Beispiel in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, zweite Ausgabe (Sambrook et al., 1989) beschrieben.

[0024] Die Konzentration von Trehalose, die innerhalb der prokaryotischen Zellen synthetisiert wird, kann unter Verwendung jeder geeigneten Assay-Technik gemessen werden, zum Beispiel durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), gekoppelt mit einer elektro-chemischen Erkennung und Glukose-Assay (Trinder-Assay unter Verwendung von Trehalase) zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Trehalose.

[0025] Dünnschichtchromatographie kann als ein qualitatives Verfahren zur Trennung unterschiedlicher Kohlenhydrate verwendet werden.

[0026] Die Erkennung des Brechungsindex stellt ein anderes Mittel zur quantitativen Erkennung von Zuckern bereit.

[0027] Beim Messen von Trehalose mittels HPLC werden Zellen zerstört, und die Trehalose wird vorzugsweise in 70 % Ethanol löslich gemacht, gefolgt von der Entfernung von Triglyceriden durch Chloroformextraktion. Die Trehalosekonzentration wird bestimmt, indem die Trehalosekonzentration (wie durch eine Standardkurve bestimmt) mit der Fraktion des Endvolumens von Überstand, geteilt durch das Niederschlagvolumen, multipliziert wird. Eine ausführlichere Beschreibung dieses Assays ist in Beispiel 1 bereitgestellt.

[0028] Vorzugsweise wird die Synthese ausgeführt, um eine Konzentration von Trehalose innerhalb der Zellen von mindestens etwa 10 mM, zum Beispiel mindestens etwa 30 mM, vorzugsweise mindestens etwa 50 mM, besonders mindestens etwa 100 mM bereitzustellen.

[0029] In einem bevorzugten Aspekt umfasst die Erfindung somit das Kultivieren der prokaryotischen Zellen unter Bedingungen, die die intrazelluläre Produktion von Trehalose stimulieren, wobei die intrazelluläre Konzentration von Trehalose mindestens etwa 10 mM, vorzugsweise mindestens etwa 30 mM, besser mindestens etwa 50 mM, besonders mindestens

etwa 100 mM erreicht. Es wird besonders bevorzugt, dass die Konzentration mindestens etwa 150 mM beträgt.

[0030] Die zum Stimulieren der Trehalosesynthese erforderliche Zeit hängt unter anderem von der Natur der prokaryotischen Zellen (einschließlich der Gattung, der Spezies und/oder des Stamms) und den Bedingungen, unter denen die Trehaloseinduktion auftritt (d. h. ob durch osmotischen Schock, Sauerstoffmangel etc.), ab. Für die Trehaloseinduktion durch osmotischen Schock hängt die Zeit, die für die maximale Konzentration von Trehalose erforderlich ist, wiederum von dem Grad an Osmolarität sowie den bestimmten verwendeten Salzen ab. Die besten Bedingungen für die Trehalosesynthese lassen sich durch einfache Tests mit Versuch und Irrtum leicht bestimmen.

[0031] Die kultivierten prokaryotischen Zellen, die intrazelluläre Trehalose enthalten, können dann zur Lagerung vor ihrer Verwendung als Impfstoff gefroren werden. Alternativ dazu kann die Lagerung des Impfstoffes herbeigeführt werden, indem die prokaryotischen Zellen unter Bedingungen kultiviert werden, die die Trehalosekonzentration auf ein Niveau erhöhen, das effektiv ist, um die Lagerstabilität zu erhöhen, indem die Zellen mit einer Trocknungslösung gemischt werden, die einen Stabilisator enthält, und indem die Zellen unter Bedingungen getrocknet werden, so dass ein Glas produziert wird, das weniger als etwa 5 % Restfeuchtigkeit aufweist. Wenn eher ein Totimpfstoff als ein Lebendimpfstoff erforderlich ist, können die Zellen durch jedes geeignete Verfahren abgetötet werden, zum Beispiel durch chemische Fixierung und Bestrahlung vor der Verarbeitung für die Lagerung. Obwohl die prokaryotischen Zellen als der einzige immunogene bestimmende Inhaltsstoff in dem Impfstoff verwendet werden können, kann in einer Menge, die ausreicht, um die Immunreaktion auf den prokaryotischen Impfstoff zu verstärken, ein Adjuvans hinzugefügt werden. Das Adjuvans kann vor dem Trocknen zu den prokaryotischen Zellen hinzugegeben werden, zum Beispiel kann eine 8-Untereinheit von Cholera-Toxin gleichzeitig mit *V. cholera* getrocknet werden. Alternativ dazu kann das Adjuvans separat erhalten und getrocknet und zusammen mit den prokaryotischen Zellen rekonstituiert werden.

[0032] Geeignete Adjuvantien umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Aluminiumhydroxid, Alaun, QS-21 (U.S.-Patent Nr. 5,057,540), DHEA (U.S.-Patente Nr. 5,407,684 und 5,077,284) und seine Derivate (einschließlich Salzen) und Vorläufer (z. B. DHEA-S), Beta-2-Mikroglobulin (WO 91/16924), Muramyl-dipeptide, Muramyl-tripeptide (U.S.-Patent Nr. 5,171,568), Monophosphoryl-Lipid A (U. S.-Patent Nr. 4,436,728; WO 92/16231) und seine Derivate (z. B. Detox™) und BCG (U.S.-Patent Nr. 4,726,947). Andere geeignete Adjuvantien umfassen Aluminium-

salze, Squalenmischungen (SAF-1), Muramylpeptid, Saponinderivate, Zellwandzubereitungen von *Mycobacterium*, Mykolsäurederivate, nicht ionische Blockcopolymertertside, Quil A, B-Untereinheit von Cholera-Toxin, Polyphosphazenen und Derivate, und immunstimulierende Komplexe (ISCOMs) wie etwa die von Takahashi et al. (1990), *Nature* 344: 873-875 beschriebenen. Die Wahl des Adjuvans hängt zum Teil von der Stabilität des Impfstoffes in Gegenwart des Adjuvans, von dem Weg der Verabreichung und der regulatorischen Zulässigkeit des Adjuvans, insbesondere wenn für den menschlichen Verbrauch gedacht, ab. Zum Beispiel ist Alaun von der Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (Food and Drug Administration, FDA) zur Verwendung als Adjuvans für Menschen genehmigt.

[0033] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Behandlung eines Tieres mit einem Impfstoff der Erfindung durch das Verabreichen einer pharmazeutisch akzeptablen Menge des Impfstoffs der Erfindung, wahlweise in Kombination mit einem Adjuvans, bereit, wobei die Menge ausreicht, um eine Immunreaktion in dem Tier hervorzurufen. Das Tier ist typischerweise ein Mensch. Die Erfindung kann jedoch auch für die Behandlung anderer Säugetiere wie etwa von Pferden, Rindern, Ziegen, Schafen oder Schweinen und für die Behandlung von Vögeln, besonders Geflügel wie etwa Hühnern oder Truthähnen, angewendet werden.

[0034] Die Impfstoffzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können durch jedes geeignete Mittel verabreicht werden, wie etwa oral, mittels Inhalation, transdermal oder mittels Injektion und in jedem geeigneten Trägermedium. Es wird jedoch bevorzugt, den Impfstoff als wässrige Zusammensetzung mittels Injektion unter Verwendung einer beliebigen geeigneten Nadel- oder nadellosen Technik zu verabreichen.

[0035] Die Impfstoffe der Erfindung können jede geeignete Konzentration der induzierten prokaryotischen Zellen enthalten. Wir ziehen es vor, dass die Zellen in Dosierungen in dem Bereich von 10-600 µg, vorzugsweise 10-100 µg, am besten 25 µg pro kg Körpergewicht des behandelten Tieres verabreicht werden. Es versteht sich, dass der Impfstoff der Erfindung als eine anfängliche Behandlung angewendet werden kann, gefolgt von einer oder mehreren nachfolgenden Behandlungen mit der gleichen oder einer anderen Dosierungsrate in einem Intervall von 1 bis 26 Wochen zwischen jeder Behandlung, um eine langfristige Immunisierung gegen das Pathogen bereitzustellen.

[0036] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um die Erfindung zu veranschaulichen, sollen sie aber nicht beschränken.

Beispiel 1: Induktion von Trehalose in *E. coli* durch osmotischen Schock:

[0037] *E. coli* (NCIMB-Stamm 9484) wurde in Evans-Medium (pH 7,0), das 5 mM Ammoniumchlorid enthielt, kultiviert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C in dem anfänglichen Evans-Medium wurde eine 4-ml-Kultur von *E. coli*, die in Evans-Medium unter Stickstoffbegrenzung gezüchtet wurde, verwendet, um eine 200-ml-Kultur von Evans-Medium zu beimpfen, die modifiziert war, um einen osmotischen Schock zu induzieren, indem die Salzkonzentration (KCl) auf 0,5 M erhöht wurde.

[0038] Die Trehalosekonzentration wurde durch Analyse mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen, und signifikante Zunahmen der Trehalosekonzentrationen wurden 15-17 Stunden nach Initiierung des osmotischen Schocks beobachtet, wobei die Höchstwerte nach weniger als 20 Stunden erreicht wurden.

Beispiel 2: Induktion von Trehalosesynthese in *Salmonella*:

[0039] *Salmonella typhimurium* (1344) wurde über Nacht bei 37°C in (Minimal-)Medium M9 mit und ohne 0,5 M NaCl gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen und auf Trehalosekonzentration durch HPLC-Analyse analysiert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Wachstum in Medium mit hoher Salzkonzentration zeigte eine 4 bis 5fache Induktion von Trehalosesynthese im Vergleich zu dem Medium mit geringer Salzkonzentration.

Beispiel 3: Trocknen von prokaryotischen Zellen nach Induktion von Trehalosesynthese:

[0040] *E. coli* und *Salmonella typhimurium* wurden über Nacht bei 37°C in (Minimal-)Medium M9 mit und ohne 0,5 M NaCl gezüchtet, und Trehalosesynthese wurde wie in Beispielen 1 und 2 beschrieben induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch 10 min lange Zentrifugation bei 10 000 U/min gewonnen, und die Zellniederschläge wurde in einer Trocknungslösung, die 45 % Trehalose, 0,1 % CMC (Natriumcarboxymethylcellulose, Blanose 7HF, Aqualon) enthielt, auf eine typische Zelldichte von $0,5-1,2 \times 10^9$ KbE/ml resuspendiert. Aliquots von 300 µl und 500 µl wurden in pharmazeutische Fläschchen von 3 ml ausgegeben und unter Vakuum ohne Gefrieren über Nacht bei Umgebungstemperatur und einem Vakuumdruck von 30 mTorr getrocknet. Alternativ dazu können die Aliquots unter Verwendung des folgenden Protokolls gefriergetrocknet werden: mit 2,5°C/min auf eine anfängliche Absatztemperatur von -40°C bringen; erstes Trocknen wurde bei einem Vakuumdruck von 30 mT bei -40° durchgeführt, der über 40 Stunden gehalten wurde; für ein zweites Trocknen mit 0,05°C/min von -40 auf -30°C bringen

und über 12 Stunden halten.

Beispiel 4: Verwenden von induzierten prokaryotischen Zellen als Impfstoffe:

[0041] Zellen von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* wurden wie in den Beispielen 1 und 2 induziert, Trehalose zu synthetisieren, und verwendet, um Mäuse und Kaninchen zu immunisieren. Eine Titration der Bakterien zeigte, dass im Vergleich mit der Verwendung von nicht induzierten Bakterien ein 100 bis 1000fach niedrigerer Titer von Bakterien, die für die Trehalosesynthese induziert waren, erforderlich war, um eine gleichwertige Antikörperreaktion in den Tieren zu produzieren. Getrocknete Zubereitungen waren auf Basis der Zellanzahl im Allgemeinen 2-50fach effektiver als nicht getrocknete Zubereitungen, um eine schützende Immunität in den immunisierten Tieren hervorzurufen.

Beispiel 5: Verwendung induzierter prokaryotischer Zellen als Impfstoffe; wärmeinduzierte Trehalosesynthese:

[0042] *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Stämme wie in Beispielen 1 und 2) wurden über Nacht bei 37°C in LG-Medium gezüchtet. Aliquots von 4 ml der stationären Kulturen wurden verwendet, um 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben von 2 Liter zu beimpfen, und die Kulturen wurden 3 Std. lang bei 30°C gezüchtet. Die Kulturen in log-Phase wurden dann auf 40°C angehoben und weitere 3 Std. lang gezüchtet, bevor die Bakterien durch 10 Minuten lange Zentrifugation bei 10 000 U/min gewonnen wurden. Ein ähnliches Protokoll wurde für das Wachstum und die Induktion von *Mycobacterium bovis* und *vaccae* (NCTC 11659) verwendet, die über 2 Tage in Sauton-Medium gezüchtet wurden, bevor sie verdünnt wurden, um Kulturen in log-Phase zur Wärmeinduktion zu erhalten. Zellniederschläge wurden in Lyselösung, die 0,5 % Tween enthielt, resuspendiert, und die Trehalosekonzentration wurde mittels Analyse mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Es wurden typischerweise 3-5fache Zunahmen der Trehalosekonzentrationen im Vergleich zu Zellen, die nur bei 30°C gezüchtet wurden, beobachtet.

[0043] Bakterielle Zellen, die wie oben beschrieben induziert waren, um Trehalose zu synthetisieren, wurden durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen abgetötet und verwendet, um Kaninchen zu immunisieren. Antikörpertiter in den immunisierten Tieren wurden mittels 10facher Reihenverdünnungen unter Verwendung eines Dot-Blot-Assays an Gesamtzelllysaten, die wie oben für die Trehaloseanalyse beschrieben zubereitet waren, im Assay bestimmt. Tiere, die mit induzierten Bakterien geimpft worden waren, zeigten einen 10 bis 100fach höheren Antikörpertiter als die, die mit nicht induzierten Bakterien immunisiert wor-

den waren.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Erhöhen der Immunogenität einer Impfstoffzusammensetzung, die prokaryotische Zellen als den immunogenen bestimmenden Wirkstoff beinhaltet, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren die folgenden Schritte beinhaltet:

- a. Behandeln der prokaryotischen Zellen unter Bedingungen, so dass eine Erhöhung der Konzentration von Trehalose innerhalb prokaryotischer Zellen durch Synthese von Trehalose innerhalb der Zelle induziert wird;
- b. Verwenden der behandelten prokaryotischen Zellen als den immunogenen bestimmenden Faktor bei der Produktion einer Impfstoffzusammensetzung.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung der prokaryotischen Zellen ausgeführt wird, um eine Konzentration von Trehalose innerhalb der prokaryotischen Zellen von mindestens 10 mM zu erhalten.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bedingung, die die Synthese von Trehalose innerhalb der Zellen verursacht, Wärme, osmotischer Schock, Unterdrückung des Abbaus von Trehalose oder gentechnisch manipulierte konstitutive Synthese von Trehalose innerhalb der Zellen ist.

4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die induzierten, prokaryotischen Zellen, die die Trehalose enthalten, vor ihrer Verwendung bei der Produktion der Impfstoffzusammensetzung getrocknet werden.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotischen Zellen Bakterien sind.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotischen Zellen dadurch behandelt werden, dass sie in einem Medium kultiviert werden, das einen oder mehrere gelöste Stoffe enthält und eine Osmolarität von mindestens 350 mOsmol aufweist.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der gelöste Stoff aus einem Natrium-, Kalium-, Calcium- und/oder Ammoniumsalz ausgewählt ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung der prokaryotischen Zellen ausgeführt wird, um eine Konzentration von Trehalose innerhalb der prokaryotischen Zellen von mindestens 100 mM zu erhalten.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotischen Zellen, die die induzierte Trehalose enthalten, vor ihrer Verwendung bei der Impfstoffzusammensetzung abgetötet werden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen