

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 407 643 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 129/99
(22) Anmeldetag: 01.02.1999
(42) Beginn der Patentedauer: 15.09.2000
(45) Ausgabetag: 25.05.2001

(51) Int. Cl.⁷: **C12P 21/00**
A61K 39/00

(73) Patentinhaber:
INTERCELL BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNGS-
UND ENTWICKLUNGS GMBH
A-1030 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR SELEKTION UND HERSTELLUNG VON VAKZIN- UND DIAGNOSTIKA-PRÄPARATIONEN

AT 407 643 B

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Selektion und Herstellung von Vakzin- und Diagnostika-Präparationen gegen einen bestimmten pathogenen Organismus, bei welchem ein nicht-humaner Vertebrat mit einer Präparation des pathogenen Organismus immunisiert wird, Proben, die Antikörper gegen die Pathogen-Präparation enthalten, vom immunisierten Vertebraten entnommen werden, eine in Wirtszellen exprimierbare Genbank des Genoms des pathogenen Organismus hergestellt wird, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind, antigene Polypeptide durch Kontaktieren der Genbank mit der entnommenen, Antikörper-hältigen Probe identifiziert werden, diejenigen Klone der Genbank selektiert werden, deren exprimierte Polypeptide eine Antikörper-Bindung eingehen, und die identifizierten antigenen Polypeptide zu einer Vakzin- oder Diagnostika-Präparation fertiggestellt werden.

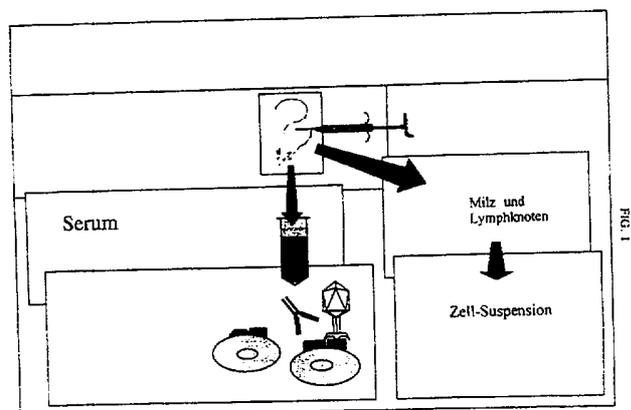


FIG. 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion und Herstellung von Vakzin- und Diagnostika-Präparationen gegen Pathogene verschiedenster Art.

Mit der systematischen Einführung von Schutzimpfungen konnten in unserem Jahrhundert viele schwere Infektionskrankheiten zurückgedrängt werden. Krankheiten, wie Kinderlähmung, Tetanus, Diphtherie, Pocken und Meningitis, die früher fatale Folgen hatten, haben durch gezielte flächendeckende Impfprogramme ihren Schrecken verloren. Pocken konnten sogar im Jahre 1980 von der WHO als ausgerottet erklärt werden. Mit der Einführung der rekombinanten DNA-Technologie gelang es auch, Impfstoffe zu entwickeln, die zuvor zwar prinzipiell möglich waren, deren breite Anwendung aber durch die geringe Menge an Impfstoff-Material nicht realisiert werden konnte. Beispiele hierfür sind die Vakzine gegen das Hepatitis B-Virus und gegen Keuchhusten (verursacht von *Bordetella pertussis*).

Leider zeigen Infektionskrankheiten gegenwärtig wieder einen starken Anstieg. Dies liegt zum einen daran, dass immer neue, komplexere Infektionskrankheiten auftreten, wie z.B. Hepatitis C, AIDS, hämorrhagische Darmerkrankungen, etc., zum anderen auch daran, dass manche Erreger gegen die etablierten Impfstoffe resistent geworden sind. Gleichzeitig sind auch viele Erreger, die bislang erfolgreich medikamentös behandelt werden konnten, resistent gegen diese Medikamente geworden. Besonders ist hier auf die Behandlung von Lungen- oder Hirnhautentzündungen, Darminfektionen oder Krankheiten, wie Tuberkulose oder Malaria, hinzuweisen. Vor allem die zunehmende Antibiotika-Resistenz bakterieller Krankheitserreger stellt die weltweite Gesundheitspolitik vor große Probleme.

Es erscheint daher wünschenswert, gegen diese Infektionskrankheiten wirksame Vakzine zur Verfügung zu stellen. Leider ist das Auffinden von effizienten und sicheren Impfstoffen eine aufwendige Tätigkeit. Effiziente Vakzine sind meist direkt vom Erreger abgeleitet, beispielsweise durch chemische oder physikalische Inaktivierung oder durch Attenuierung (Abschwächung) des Erregers. Derartige Vakzine stellen aber prinzipiell ein Sicherheitsrisiko dar, da es bei einer ungenügenden Inaktivierung zu tatsächlichen Infektionen kommen kann. Auf der anderen Seite kann eine zu drastische Inaktivierung zu Denaturierungen führen, die sowohl die Effizienz des Impfstoffes reduzieren als auch zu Nebenwirkungen führen können.

Die Herstellung von rekombinanten Vakzinen ist zwar prinzipiell einfach, vor allem hinsichtlich der Herstellung großer Mengen, die für eine weltweite Impfkampagne erforderlich sind, jedoch ist die Effizienz des rekombinant hergestellten Impfstoffes oft nicht mit der Effizienz des biogenen Vakzins vergleichbar. Die Gründe hierfür liegen oft in der nicht-Nativität der rekombinanten Vakzine, so dass in der vakzinierten Person nicht ganz exakt die Antikörper gebildet werden, die zu einer effizienten Bekämpfung einer Attacke mit dem Pathogen erforderlich wären.

Hierzu werden im Stand der Technik nunmehr aufwendige computerunterstützte Modellierungsverfahren vorgeschlagen, mit deren Hilfe rekombinante Vakzine optimiert werden sollen (Rappuoli et al., Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung (1997), Seiten 60-69). Bedingt durch die Tatsache, dass immer mehr von der genetischen Basis der wichtigsten Krankheitserreger bekannt wird (von zahlreichen Pathogenen liegt das gesamte Genom bereits vollständig sequenziert vor), erhofft man sich von diesem Ansatz besonders viel. Jedoch ist der Zeit- und Arbeitsaufwand bei derartigen Vakzinen enorm, da nicht nur das prinzipielle gezielte Design durch molekulares Modellieren erforderlich ist, sondern die aufgrund dieser Berechnungen geschaffenen Vakzine oft beim praktischen Einsatz von den vorausgesagten Bindungseigenschaften abweichen und daher zunächst umfangreichen grundlegenden Tests unterzogen werden müssen.

Bei einem anderen Ansatz wird versucht, zunächst über DNS-Vakzine, die aufgrund vorhergesagter ORFs geschaffen worden sind, in Mäusen eine Immunantwort zu erzeugen und über die Voraussage von HLA-Superfamilien bindenden T-Zell-Epitopen geeignete Vakzin-Kandidaten zu ermitteln (Hoffman et al., Nature Med.4 (1998), Seiten 1351-1353).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, ein Verfahren zur Herstellung von Vakzinen gegen Pathogene zur Verfügung zu stellen, mit welchem effiziente Vakzine rasch und kostengünstig entwickelt werden können. Dabei soll möglichst das Wissen um die genetische Information der Pathogene optimal genutzt werden. Weiters sollen Vakzine geschaffen werden, die vom Immunsystem des Geimpften leicht in einen sicheren Schutz gegen das jeweilige Pathogen transformiert werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Selektion und Herstellung

von Vakzin- und Diagnostika-Präparationen gegen einen bestimmten pathogenen Organismus, welches durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Immunisieren eines nicht-humanen Vertebraten mit einer Präparation des pathogenen Organismus,
- 5 - Entnehmen von Proben, die Antikörper gegen die Pathogen-Präparation enthalten, vom immunisierten Vertebraten und gegebenenfalls Aufarbeiten dieser Proben,
- Herstellen einer in Wirtszellen exprimierbaren Genbank des Genoms des pathogenen Organismus, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen, hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind,
- 10 - Identifizieren von antigenen Polypeptiden durch Kontaktieren der Genbank mit der entnommenen, Antikörper-hältigen Probe und Selektieren der Genbank auf diejenigen Klone, deren exprimierte Polypeptide eine Antikörper-Bindung eingehen,
- Isolieren und Fertigstellen der identifizierten antigenen Polypeptide zu einer Vakzin- oder Diagnostika-Präparation.

15 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es in schneller und effizienter Weise möglich, ein Vakzin oder ein Diagnostikum gegen ein beliebiges Pathogen zu entwickeln, das von einem zu impfenden Organismus optimal zu einer verlässlichen Immunisierung führt. Mit der Selektion der Genbank des Pathogens auf Bindung (= Erkennung) zu einem Antikörper, dessen Bildung durch das (native) Pathogen bereits im infizierten nicht-humanen Vertebraten sichergestellt worden ist, erhält man erfindungsgemäß jedenfalls ein Polypeptid, das natürlicherweise antigen ist, wobei
20 dessen Antigenizität eben durch die Selektion selbst sichergestellt wird.

Die erfindungsgemäßen Vakzine oder Diagnostika können zur Immunisierung oder Diagnose von beliebigen Tierarten herangezogen werden, jedoch ist die bevorzugte Anwendung im humanen Bereich. Bevorzugte Tierpathogene sind Pathogene für landwirtschaftliche Nutztiere oder für Haus-
25 tiere.

Mit den erfindungsgemäßen Diagnostika kann ein verlässliches Nachweissystem für die Infektion mit einem bestimmten Pathogen zur Verfügung gestellt werden, das - versehen mit einem geeigneten Marker - zur routinemäßigen Testung von potentiell mit diesem Pathogen infizierten Organismen verwendet werden kann.
30

Auf diese Weise erhält man mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Polypeptide, die in der Lage sind, Antikörper in einem Vertebraten zu erzeugen. Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Vakzine können dabei die unmittelbar aus der Genbank selektierten Polypeptide herangezogen werden, indem beispielsweise diese direkt durch Amplifizieren der Wirtszellen und anschließender Gewinnung des Polypeptides aus diesen Zellen aufgereinigt werden. Es ist aber
35 auch möglich, aufgrund der selektierten Polypeptide bzw. deren genetischer Information (die Teil der Wirtszellen ist und daher direkt erhalten werden kann) geeignete Vakzine zu designen. Beispielsweise können die selektierten Polypeptide im Gesamtgenom des Pathogens lokalisiert und bestimmten Pathogen-Proteinen zugeordnet werden, insbesondere wenn das gesamte Genom bereits sequenziert ist. Prinzipiell ist diese Vorgangsweise aber auch für Pathogene möglich, von denen nur eine grobe Kartierung vorliegt. Dann können diese Pathogen-Proteine entweder als
40 Ganzes oder in trunkierter Form zur Vakzin-Herstellung herangezogen werden. Welche Teile des Proteins gegebenenfalls trunkiert werden können, richtet sich nach den erfindungsgemäß selektierten Polypeptiden, die bevorzugterweise möglichst vollständig in ihrer antigenen Form im hergestellten Vakzin verbleiben sollten. Falls zwei oder mehrere antigene Polypeptide einem Pathogen-Protein zugeordnet werden können, kann die Kombination zumindest dieser Polypeptide oftmals zu
45 einem besonders vorteilhaften Vakzin führen. Falls die antigenen Polypeptide im Pathogen-Protein nicht aneinandergrenzend sind, kann es sich auch empfehlen, einen Spacer zwischen den Polypeptiden vorzusehen, bevor das Vakzin fertiggestellt wird.

Die erfindungsgemäße Isolierung und Fertigstellung der Vakzine oder Diagnostika kann daher die obigen Schritte der Designanpassung mitumfassen. Die Isolierung kann auch ausschließlich
50 auf DNA-Niveau vorgenommen werden, d.h. dass die genetische Information bezüglich der antigenen Polypeptide aus den selektierten Wirtszellen beispielsweise in einen weiteren Expressionsvektor übernommen, in pharmazeutisch geeigneten Expressionszellen exprimiert und zu einer pharmazeutischen Präparation aufgearbeitet wird. Auch das Vakzin oder das Diagnostikum selbst
55 kann auf DNA-Niveau zur Verfügung gestellt werden; die Technologie für DNA-Vakzine ist

prinzipiell bekannt und entsprechende Träger- oder Verabreichungssysteme, wie z.B. durch Powder-Ject-Injektionen, sind beschrieben.

Mit dem erfindungsgemäßen System können Vakzine oder Diagnostika gegen alle infektiösen Pathogene entwickelt werden, also beispielsweise gegen Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen, etc.. Das erfindungsgemäße Verfahren ist aber besonders gut für Pathogene geeignet, die ein vergleichsweise kleines Genom haben, das entweder leicht sequenziert werden kann oder schon vollständig sequenziert ist. Demgemäß sind erfindungsgemäß vor allem Vakzine oder Diagnostika gegen bakterielle oder virale Pathogene bevorzugt.

Als nicht-humaner Vertebrat, der erfindungsgemäß mit der Pathogen-Präparation infiziert wird, eignen sich alle Tiere, die auf Infektion mit einem Pathogen eine ausreichende Generierung von Antikörpern zeigen, also z.B. Amphibien, Reptilien, Vögel oder Säugetiere. Dabei kommen bevorzugt Tiere zum Einsatz, die bereits im immunologischen Labor etabliert sind, wie Frösche (z.B. *Xenopus laevis*), Hühner oder Nagetiere, insbesondere Hasen, Ratten oder Mäuse. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein nicht-humanes Säugetier mit einer Präparation des pathogenen Organismus immunisiert. In vielen Fällen kann davon ausgegangen werden, dass es vorteilhaft ist, wenn das Versuchstier dem Organismus, der das erfindungsgemäße Vakzin erhalten soll, dem infizierten Tier möglichst nahe verwandt ist, da so die Immunreaktionen weitgehend ähnlich verlaufen.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird zunächst einem nichthumanen Vertebraten eine Präparation des ausgewählten Pathogens verabreicht, so dass im Vertebraten eine Immunreaktion ausgelöst wird. Wesentlich ist, dass bei dieser Immunreaktion, die für die Zwecke der vorliegenden Erfindung der Einfachheit halber mit "Immunisierung" bezeichnet wird, Antikörper gegen das Pathogen im Vertebraten gebildet werden. Diese Antikörper werden im Anschluss an die Immunisierung dem Vertebraten entnommen und gegebenenfalls zu einer gereinigten Antikörper-Präparation mit üblichen Methoden aufgereinigt. Beispielsweise kann dem Vertebraten Serum entnommen werden, woraus die zur Selektion der Genbank verwendete Antikörper-Präparation hergestellt wird. Die Immunisierung der Vertebraten kann mit subletalen oder mit letalen Dosen durchgeführt werden; die Entnahme der Antikörper kann einmalig, z.B. nach Tötung der Tiere, oder in mehreren Chargen, z.B. nach mehreren Verabreichungen der Pathogen-Präparation, erfolgen.

Vorteilhafterweise werden die Vertebraten derart ausgewählt, dass neben der Bildung von Antikörpern auch eine Bildung von Antigen-erkennenden Zellen des zellulären Systems des Immunsystems durch die Verabreichung der Pathogen-Präparation verursacht wird. Diese Zellen können dann erfindungsgemäß zur weiteren Selektion der erfindungsgemäß identifizierten Polypeptide herangezogen werden, indem beispielsweise diese Peptide oder die diesen Peptiden zugehörigen Pathogen-Proteine auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber diesen Zellen getestet werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher neben Antikörper-enthaltenden Proben zusätzlich Antigen-erkennende Zellen des zellulären Systems des Immunsystems aus dem immunisierten Vertebraten entnommen, mit welchen die identifizierten antigenen Polypeptide weiter selektiert werden, indem die identifizierten antigenen Polypeptide oder die den identifizierten antigenen Polypeptiden zuzuordnenden vollständigen Proteine des Pathogens auf ihre Bindungsfähigkeit zu den Antigen-erkennenden Zellen getestet werden und diejenigen Polypeptide oder Proteine zum Fertigstellen ausgewählt werden, die eine Bindungsfähigkeit zu den Zellen zeigen.

Für diese Ausführungsform werden bevorzugterweise Vertebraten vorgesehen, bei welchen die zellulären Komponenten des Immunsystems leicht zu entnehmen und handzuhaben sind. Dazu gehören besonders Vögel und Säugetiere, die mit Thymus, Milz, (Bursa) und Lymphknoten leicht zu entnehmende Quellen für derartige Zellen haben, deren Entnahme seit langem etabliert ist. Bevorzugterweise werden T-Zellen als Antigen-erkennende Zellen des zellulären Systems des Immunsystems aus dem immunisierten Vertebraten entnommen. Erfindungsgemäß können daher vorzugsweise dem immunisierten Vertebraten Milz und Lymphknoten entnommen werden, woraus eine Antigen-erkennende Zellen-hältige Suspension hergestellt wird, mit der die Bindungsfähigkeit der identifizierten Polypeptide oder der zugeordneten Proteine gegenüber den Antigen-erkennenden Zellen getestet wird.

Bei der weiteren Selektion der identifizierten antigenen Polypeptide unter Verwendung der

Antigen-erkennenden Zellen kann entweder die Bindungsfähigkeit der Polypeptide selbst gegenüber diesen Zellen untersucht werden, oder es kann getestet werden, ob bestimmte andere Bereiche des Pathogen-Proteins, dem das Polypeptid zugeordnet werden kann, Bindungsfähigkeit gegenüber diesen Zellen aufweisen. Oft sind nämlich jene Bereiche des Pathogen-Proteins, die eine humorale Immunantwort auslösen können, nicht mit jenen identisch, die eine Bindungsfähigkeit zur zellulären Immunantwort aufweisen. Hierbei können daher Teile oder das gesamte Pathogen-Protein, welchem ein oder mehrere identifizierte antigene Polypeptide zugeordnet werden können, dem Bindungstest gegenüber den Antigen-erkennenden Zellen zugrundegelegt werden. Die Auswahl der Teilsequenzen wird daher praktischerweise anhand der bekannten oder vorhergesagten Proteinstruktur derart vorgenommen, dass antigene Motive möglichst vollständig erhalten bleiben. Ein bevorzugtes Verfahren zeichnet sich daher dadurch aus, dass eine Kombination aus Teilsequenzen des den antigenen Polypeptiden zugeordneten vollständigen Pathogen-Proteinen der Selektion hinsichtlich der Bindungsfähigkeit zugrunde gelegt werden.

Vorteilhafterweise wird zur einleitenden Infektion des Vertebraten eine Pathogen-Präparation eingesetzt, die das vollständige Pathogen enthält. Damit kann der Vertebrat eine Immunantwort produzieren, die ganz auf das native Pathogen gerichtet ist und daher gewährleistet, dass die erfindungsgemäß aufgefundenen Vakzine einen verlässlich Impfschutz gegen das native Pathogen verleihen.

Oft ist aber die Infektion des Vertebraten mit dem Gesamt-Pathogen nicht möglich, z.B. wenn es den Vertebraten tötet, bevor eine ausreichende zelluläre und humorale Immunantwort aufgetreten ist, so dass ein weiteres erfindungsgemäßes Vorgehen nicht stattfinden kann. Dann muss von einer inaktivierten Präparation des Pathogens ausgegangen werden. In dieser Hinsicht hat sich erfindungsgemäß bewährt, ein Homogenisat des Pathogens zum initialen Immunisieren des Vertebraten einzusetzen. Es hat sich gezeigt, dass auch hierbei ein effizienter Schutz gegen das native Pathogen erzielt werden kann, insbesondere, wenn bei der Homogenisierung darauf geachtet wird, die Pathogene nicht mit denaturierenden Methoden zu behandeln.

Auch fixiertes pathogenes Material (z.B. inaktiviertes oder cross-linked Material) ist erfindungsgemäß zur Immunisierung des Vertebraten verwendbar. Diese Vorgangsweise kann sich z.B. bei sehr infektiösen Pathogenen, deren Handhabung umständlich und gefährlich ist, empfehlen.

Eine besonders effiziente Immunantwort kann bei Vertebraten ausgelöst werden, wenn die zum Immunisieren eingesetzte Pathogen-Präparation ein Adjuvans umfasst. Vorteilhafterweise werden organische Polykationen oder eine Mischung organischer Kationen als Adjuvantien eingesetzt. Besonders bevorzugte Adjuvantien sind basische Polypeptide, insbesondere Polyarginin oder Polylysin.

Mit der vorliegenden Erfindung können wie erwähnt Vakzine und Diagnostika gegen eine Vielzahl von Pathogenen hergestellt werden. Bevorzugterweise werden allerdings Vakzine gegen Human-Pathogene zur Verfügung gestellt, für die keine oder nur eine unzureichende Immunisierungsalternative vorhanden ist und/oder bei denen Resistenzen bei vorhandenen chemischen oder immunologischen Behandlungen auftreten. Bevorzugte Pathogene, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung bekämpft werden sollen, können daher aus der Gruppe *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia* spp., Gruppe A-Streptokokken, Nicht-typisierbare *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Shigella* spp., *Toxoplasma gondii*, oder *Treponema pallidum* ausgewählt werden.

Weitere bevorzugte Pathogene sind pathogene *Aspergillus*-, *Candida*-, *Mycobacterium*-, *Rhizopus*-, *Trichophyton*-, *Microsporium*-, *Trypanosoma*-, *Pneumocystis*-, *Plasmodium*-, *Meningokokkus*- und *Chlostridien*-Stämme sowie Retroviren oder hämatogene Viren.

Da bei der zellulären Erkennung der pathogenen Proteine die exakte native räumliche Struktur nicht erheblich ist, werden bevorzugterweise dem Test zur Bindungsfähigkeit gegenüber den Antigen-erkennenden Zellen Polypeptide zugrundegelegt, die mit einem Polypeptid-Sequenzher hergestellt worden sind.

Die Wahl der Genbank oder der Wirtszellen kann beliebig erfolgen; wesentlich ist, dass die Genbank-Wirtszellen aufgrund der Bindung der exprimierten Polypeptide zu den dem Vertebraten entnommenen Antikörper selektiert werden. Demgemäß sollten einfacherweise die exprimierten Polypeptide an der Außenseite der Zellen präsentiert werden, etwa als Teil einer äußeren Domäne

eines Membranproteins. Die Länge der exprimierten Polypeptide wird dann anhand der jeweiligen Erfordernisse des Genbank/Wirtszell-Systems gewählt, liegt aber oft im Bereich zwischen 10 und 200 Aminosäuren, insbesondere zwischen 20 und 100 Aminosäuren. Die Selektion der Zellen kann dabei beispielsweise über ein System erfolgen, bei welchem durch die Bindung des Antikörpers an das exprimierte Polypeptid die Bindungsstelle für ein Selektions-Agens oder ein Transport-Kanal für das Selektions-Agens blockiert wird. Ein besonders vorteilhaftes System für eine derartige Selektion ist in der WO 99/30151 A beschrieben, deren Inhalt hiermit in die vorliegende Anmeldung inkludiert wird. Vorzugsweise werden daher die exprimierten Polypeptide als Teil eines Membranproteins der Genbank-Wirtszellen nach außen präsentiert. Weiters ist ein Selektions-System bevorzugt, bei welchem die Genbank-Wirtszellen aufgrund der Bindung eines Antikörpers zum exprimierten Polypeptid gegen ein Selektions-Agens resistent werden.

Besonders bewährt in diesem bevorzugten System haben sich diejenigen Ausführungsformen, bei welchen die Selektion durch ein virales Agens erzielt wird, das für die Genbank-Wirtszellen pathogen ist. Hierbei kann der Virus-Rezeptor in den Zellen derart konstruiert werden, dass dieser durch die Bindung des Antikörpers zum exprimierten Polypeptid blockiert wird, beispielsweise durch intermolekulare Wechselwirkung oder durch sterische Blockierung. Vorzugsweise weisen derartige Genbank-Wirtszellen ein OmpA-, LamB- oder FhuA-Selektionssystem auf.

Wenn durch die Genbank-Selektion ein oder mehrere Polypeptide identifiziert worden sind, die eine Bindung zu einem der im Vertebraten gebildeten Antikörpern eingehen, können diese im Genom des Pathogens lokalisiert und bestimmten Pathogen-Proteinen (oder ORFs) zugeordnet werden. Voraussetzung ist dabei natürlich, dass bereits zumindest eine grobe Genkartierung des Pathogens vorliegt. Besonders vorteilhaft ist allerdings, wenn bereits die vollständige Gensequenz des Pathogens vorliegt. Bevorzugterweise werden demgemäß die selektierten antigenen Polypeptide unter Zugrundelegen einer Genomanalyse des pathogenen Organismus definierten Proteinen dieses pathogenen Organismus zugeordnet werden und diejenigen antigenen Polypeptide, die demselben Protein zugeordnet worden sind, kombiniert.

Diese Polypeptid-Kombinationen können dann dem Bindungstest gegenüber Antigen-erkennenden Zellen zugrunde gelegt werden, gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Teilsequenzen des zugeordneten Pathogen-Proteins (oder auch als Gesamtprotein).

Die Bestimmung der Bindungseigenschaft kann mit einer Vielzahl von Tests vorgenommen werden. Die derzeit gebräuchlichsten sind in Romero et al. (Mol.Med.Today 4 (1998), Seiten 305-312) beschrieben, darunter auch der Elisspot-Assay, mit welchem T-Zellen, die eine Bindung mit einem (MHC-II-präsentierten) Antigen eingehen, aufgrund ihrer Cytokin-Ausschüttung (zumeist Interferon- γ) identifiziert werden können. Dieser Test ist nicht nur etabliert, standardisierbar und einfach handhabbar, er ist auch überaus empfindlich für die Zwecke der vorliegenden Erfindung, insbesondere da für diesen Test keinerlei zelluläre in vitro Proliferation erforderlich ist. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher die Bindungsfähigkeit gegenüber den entnommenen Antigen-erkennenden Zellen unter Verwendung des Elisspot-Assays bestimmt.

Bevorzugterweise umfasst die Fertigstellung der erfindungsgemäßen Vakzine oder Diagnostika das Zumischen eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers sowie weiterer Hilfs-Komponenten.

Die initiale Immunisierung ist für den Gegenstand der vorliegenden Erfindung nicht auf nicht-humane Vertebraten beschränkt. Gemäß einer bevorzugten Variante des Gegenstandes der vorliegenden Erfindung werden sowohl die Antikörper als auch gegebenenfalls die Antigen-erkennenden Zellen aus Menschen gewonnen und dem erfindungsgemäßen Selektions- und Herstellungsverfahren unterzogen. In diesem Fall wird die primäre Immunisierung allerdings entweder der Natur überlassen, d.h. es werden Antikörper und T-Zellen aus bereits immunisierten Patienten entnommen, oder aber es wird mit nicht-infektiösen Pathogen-Präparationen gearbeitet. Speziell für die Herstellung von effizienten Vakzinen gegen Human-Pathogene stellt die Entnahme von Antikörpern und T-Zellen aus Menschen, die bereits erfolgreich eine Infektion mit diesem Pathogen überstanden und einen ausreichenden zellulären und humoralen Schutz aufgebaut haben, eine besonders bevorzugte Variante der vorliegenden Erfindung dar.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ebenfalls eine Verfahrensvariante, bei welcher anstelle des Schrittes "Immunisieren eines nicht-humanen Vertebraten" der Verfahrensschritt "Auswählen einer Person, die eine Infektion mit dem bestimmten Pathogen überstanden und Antikörper sowie

Antigen-erkennende Zellen gebildet hat" gesetzt wird. Bei der Entnahme von Antikörpern oder Antigen-erkennenden Zellen muss selbstverständlich darauf Bedacht genommen werden, dass diese nach etablierten Methoden der Human-Medizin erfolgt und keine gravierenden Folgen für die Spenderperson hat. Aus dem obigen ergibt sich, dass ein derartiges Verfahren für die Spenderperson weder ein therapeutisches noch ein diagnostisches oder chirurgisches Verfahren darstellt, da diese Spenderperson bereits als immunisiert gilt und durch die Entnahme keinerlei therapeutischen Effekt erfährt.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Vakzin-Präparation, enthaltend ein ausgewähltes Polypeptid oder ein dieses Polypeptid enthaltendes Protein oder die DNA derselben, hergestellt oder erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung eine Diagnostika-Präparation, enthaltend ein ausgewähltes Polypeptid, hergestellt oder erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren, welches einen Marker zum Nachweisen des Polypeptids aufweist.

Als Marker, die zum Nachweis des Polypeptids verwendet werden können, kommen alle zum Nachweis von Bindungen zweier Substanzen in Betracht, vorzugsweise werden aber radioaktive, fluoreszente, chromogene oder amplifizierbare Marker an das erfindungsgemäße Diagnostikum gekoppelt. Die Diagnose kann sich - wie die Vakzinierung - auch auf Nukleinsäure-Niveau abspielen. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher ein Diagnose-Set, umfassend eine erfindungsgemäße Diagnostika-Präparation und Nachweisreagenzien für den Marker.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Set zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfassend

- eine Genbank des Genoms des pathogenen Organismus,
- Wirtszellen, in welchen die Genbank exprimierbar ist, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen, hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind, und
- ein Selektions-Agens.

Das Potential der Antigen-Selektion der vorliegenden Erfindung ist aber nicht auf Vakzine und Diagnostika gegen bestimmte Pathogene beschränkt. Es hat sich gezeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung von effizienten Tumor-Antigenen geeignet ist. Insbesondere mit der erfindungsgemäß bevorzugten Kombination aus humoraler und zellulärer Selektion können besonders geeignete Tumor-Antigene aufgefunden werden. Mit den erfindungsgemäß aufgefundenen Tumor-Antigenen lassen sich besonders wirkungsvolle Tumor-Vakzinierungen vornehmen. Anstelle der Immunisierung des nicht-humanen Vertebraten mit der Pathogen-Präparation wird allerdings der Vertebrat mit einer Präparation der jeweiligen Tumor-Zelle immunisiert oder Antikörper und gegebenenfalls Antigen-erkennende Zellen aus einem humanen Tumor-Patienten entnommen.

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Schema-Beispiels sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, näher erläutert.

Es zeigen: Fig.1: das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Antigenen (schematisch); Fig.2: die Konstruktion einer Genbank für ein mikrobielles Genom; Fig.3 und 4: die Selektion der Antikörper-bindenden Zellen durch OmpA oder LamB-Selektion; Fig.5 und 6 die Zuordnung der identifizierten Polypeptide zu Pathogen-Proteinen via Genomics; Fig.7: die Generierung von überlappenden Peptid-Fragmenten zur weiteren Charakterisierung mittels T-Zell-Bindungstest; und Fig.8: das Screenen der Antigen-bindenden Polypeptide mittels Elisspot-Assay.

Beispiel:

Eine Maus wird mit einer homogenisierten pathogenen Mikrobe immunisiert, wobei dem Homogenisat Polyarginin zugesetzt worden ist. Nach erfolgter Immunisierung wird der Maus Serum entnommen, sowie Milz und Lymphknoten entfernt. Das Serum wird zur Identifizierung von Antigenen, die von den Antikörpern im Serum erkannt werden, verwendet; aus Milz und Lymphknoten wird eine Suspension von T-Zellen hergestellt (Fig.1).

Eine Expressionsgenbank wird gemäß der WO 99/30151 A hergestellt, wobei das mikrobielle Genom auf etwa 150 bp lange Fragmente verdaut und in geeignete Selektions-/Expressionsvektoren eingesetzt wird. Mit diesen Expressions-Vektoren werden Wirtszellen transformiert, wobei

eine selektierbare Genbank generiert wird (Fig.2).

Die der Maus entnommenen Antikörper werden mit den Genbankwirtszellen versetzt, wobei die Antikörper an geeignete exprimierte Strukturen binden können (Fig.3). Fig.4 zeigt ein System, bei welchem mit Phagen selektiert wird. Durch Bindung des Antikörpers an das exprimierte Polypeptid an der Außenseite der Zellen kommt es zu einer sterischen Blockierung der Phagen-Bindungsstelle. Dadurch kann die Zelle nicht mit dem normalerweise letalen Phagen infiziert werden und wird positiv selektiert, womit es zu einer Anreicherung (z.B. um den Faktor 10^3 bis 10^6 , höhere oder niedrigere Anreicherungen je nach Selektionssystem) derjenigen Klone, die antigene mikrobielle Peptide aufweisen.

Aufgrund der Sequenz des exprimierten Polypeptids wird über eine genomische Datenbank des mikrobiellen Pathogens die Lokalisation des Polypeptids im Pathogen-Genom vorgenommen und das Polypeptid einem bestimmten Protein oder ORF zugeordnet (Fig.5). Da humorale und zelluläre Antigene oft getrennte Strukturen auf einem Protein sind (Fig.6), werden überlappende Peptid-Fragmente der über die genomische Datenbank aufgefundene Gesamt-Proteinsequenz generiert, z.B. durch automatisierte Peptid-Synthesizer (Fig.7).

Die identifizierten antigenen Polypeptide und die generierten Proben werden mit einem Elispot-Assay auf ihre Bindung zu T-Zellen untersucht. Dabei werden die Polypeptid-Proben in einem geeigneten Reaktionsgefäß, z.B. einer Mikrotiterplatte, die mit einem Cytokin-spezifischen Antikörper gecoatet ist, vorgesehen und mit der Milz- und Lymphknoten-Suspension aus der Maus versetzt. T-Zellen, die an ein Antigen binden (das ihnen beispielsweise durch MHC-II-tragende Antigen-präsentierende Zellen präsentiert wird), geben bei Bindung an das Antigen Cytokine ab, z.B. Interferon- γ . Dieses bindet an den immobilisierten Antikörper und kann z.B. durch einen markierten sekundär-Antikörper detektiert werden. Diejenigen Näpfcchen in der Mikrotiter-Platte, bei welchen eine T-Zell-Bindung erfolgt ist, zeigt eine positive Cytokin-Reaktion.

Es zeigt sich, dass mit der vorliegenden Erfindung ein besonders effizientes High-Throughput-Verfahren zum Auffinden und Herstellen von geeigneten, stark immunogenen Vakzinen und verlässlichen Diagnostika für Infektionen mit Pathogenen zur Verfügung gestellt wird.

Mit diesem System können in kurzer Zeit ganze Genome pathogener Organismen hinsichtlich ihrer ganz besonders antigenen Proteine oder Polypeptidsequenzen durchsucht werden, wodurch umgehend geeignete antigene Vakzin-Kandidaten für die praktische Anwendung erschlossen werden können.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Selektion und Herstellung von Vakzin- und Diagnostika-Präparationen gegen einen bestimmten pathogenen Organismus, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - Immunisieren eines nicht-humanen Vertebraten mit einer Präparation des pathogenen Organismus,
 - Entnehmen von Proben, die Antikörper gegen die Pathogen-Präparation enthalten, vom immunisierten Vertebraten und gegebenenfalls Aufarbeiten dieser Proben,
 - Herstellen einer in Wirtszellen exprimierbaren Genbank des Genoms des pathogenen Organismus, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind,
 - Identifizieren von antigenen Polypeptiden durch Kontaktieren der Genbank mit der entnommenen, Antikörper-hältigen Probe und Selektieren der Genbank auf diejenigen Klone, deren exprimierte Polypeptide eine Antikörper-Bindung eingehen,
 - Isolieren und Fertigstellen der identifizierten antigenen Polypeptide zu einer Vakzin- oder Diagnostika-Präparation.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Pathogen ein bakterielles oder virales Pathogen ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein nicht-humanes Säugetier mit einer Präparation des pathogenen Organismus immunisiert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass neben Anti-

- körper-enthaltenden Proben zusätzlich Antigen-erkennende Zellen des zellulären Systems des Immunsystems aus dem immunisierten Vertebraten entnommen werden, mit welchen die identifizierten antigenen Polypeptide weiter selektiert werden, indem die identifizierten antigenen Polypeptide oder die den identifizierten antigenen Polypeptiden zuzuordnenden vollständigen Proteine des Pathogens auf ihre Bindungsfähigkeit zu den Antigen-erkennenden Zellen getestet werden und diejenigen Polypeptide oder Proteine zum Fertigstellen ausgewählt werden, die eine Bindungsfähigkeit zu den Zellen zeigen.
- 5 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass T-Zellen als Antigen-erkennende Zellen des zellulären Systems des Immunsystems aus dem immunisierten Vertebraten entnommen werden.
 - 10 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kombination aus Teilsequenzen des den antigenen Polypeptiden zugeordneten vollständigen Pathogen-Proteinen der Selektion hinsichtlich der Bindungsfähigkeit zugrunde gelegt werden.
 - 15 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Immunisieren eingesetzte Pathogen-Präparation das vollständige Pathogen enthält.
 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Immunisieren eingesetzte Pathogen-Präparation ein Homogenisat des Pathogens umfasst.
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Immunisieren eingesetzte Pathogen-Präparation ein Adjuvans umfasst.
 - 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Adjuvans organische Polykationen oder eine Mischung organischer Kationen eingesetzt werden.
 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass basische Polypeptide, insbesondere Polyarginin oder Polylysin, als Adjuvans eingesetzt werden.
 - 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Pathogene ausgewählt werden aus der Gruppe *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia* spp., Gruppe A-Streptokokken, Nicht-typisierbare *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylokokkus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Shigella* spp., *Toxoplasma gondi* oder *Treponema pallidum*.
 - 30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass ein Nagetier, insbesondere ein Hase, eine Maus oder eine Ratte, immunisiert wird.
 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass dem Test zur Bindungsfähigkeit gegenüber den Antigen-erkennenden Zellen Polypeptide zugrundegelegt werden, die mit einem Polypeptid-Sequenzier hergestellt worden sind.
 - 35 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass dem immunisierten Vertebraten Serum entnommen wird, woraus eine Antikörper-Präparation hergestellt wird, mit der die Genbank selektiert wird.
 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass dem immunisierten Vertebraten Milz und Lymphknoten entnommen werden, woraus eine Antigen-erkennende Zellen-hältige Suspension hergestellt wird, mit der die Bindungsfähigkeit der identifizierten Polypeptide oder der zugeordneten Proteine gegenüber den Antigen-erkennenden Zellen getestet wird.
 - 40 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die exprimierten Polypeptide als Teil eines Membranproteins der Genbank-Wirtszellen nach außen präsentiert werden.
 - 45 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Genbank-Wirtszellen aufgrund der Bindung eines Antikörpers zum exprimierten Polypeptid gegen ein Selektions-Agens resistent werden.
 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Genbank-Wirtszellen ein OmpA-, LamB- oder FhuA-Selektionssystem aufweisen.
 - 50 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die selektierten antigenen Polypeptide unter Zugrundelegen einer Genomanalyse des pathogenen Organismus definierten Proteinen dieses pathogenen Organismus zugeordnet werden und diejenigen antigenen Polypeptide, die demselben Protein zugeordnet worden sind, kombiniert werden.
 - 55

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindungsfähigkeit gegenüber den entnommenen Antigen-erkennenden Zellen unter Verwendung des Elisspot-Assays bestimmt wird.
- 5 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Verarbeiten der ausgewählten Polypeptide zu Vakzinen oder Diagnostika das Zumischen eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers umfasst.
23. Verfahren zur Selektion und Herstellung von Vakzin- und Diagnostika-Präparationen gegen einen bestimmten pathogenen Organismus, insbesondere gegen ein bakterielles oder virales Pathogen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- 10 - Auswählen einer Spenderperson, die eine Infektion mit dem bestimmten Pathogen überstanden und Antikörper sowie gegebenenfalls Antigen-erkennende Zellen gebildet hat,
- Entnehmen von Proben, die Antikörper gegen die Pathogen-Präparation enthalten, von der Spenderperson und gegebenenfalls Aufarbeiten dieser Proben,
- 15 - Herstellen einer in Wirtszellen exprimierbaren Genbank des Genoms des pathogenen Organismus, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen, hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind,
- Identifizieren von antigenen Polypeptiden durch Kontaktieren der Genbank mit der entnommenen, Antikörper-hältigen Probe und Selektieren der Genbank auf diejenigen
- 20 Klone, deren exprimierte Polypeptide eine Antikörper-Bindung eingehen,
- Isolieren und Fertigstellen der identifizierten antigenen Polypeptide zu einer Vakzin- oder Diagnostika-Präparation.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass nach einem der Ansprüche 4 bis 12 und 14 bis 22 verfahren wird, wobei die Spenderperson der immunisierte Vertebrat
- 25 ist.
25. Vakzin-Präparation, enthaltend ein ausgewähltes Polypeptid, hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24.
26. Diagnostika-Präparation, enthaltend ein ausgewähltes Polypeptid, hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, welches einen Marker zum Nachweisen
- 30 des Polypeptids aufweist.
27. Diagnose-Set, umfassend eine Präparation nach Anspruch 26 und Nachweisreagenzien für den Marker.
28. Set zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 24, umfassend eine Genbank des Genoms des pathogenen Organismus, Wirtszellen, in welchen die Genbank
- 35 exprimierbar ist, wobei die Pathogen-Polypeptidsequenzen exprimierenden Genbank-Wirtszellen hinsichtlich ihrer Bindung zu einem Antikörper selektierbar sind, und ein Selektions-Agens.
29. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 24 zur Herstellung eines Tumor-Antigens.
- 40

HIEZU 8 BLATT ZEICHNUNGEN

45

50

55

FIG. 1

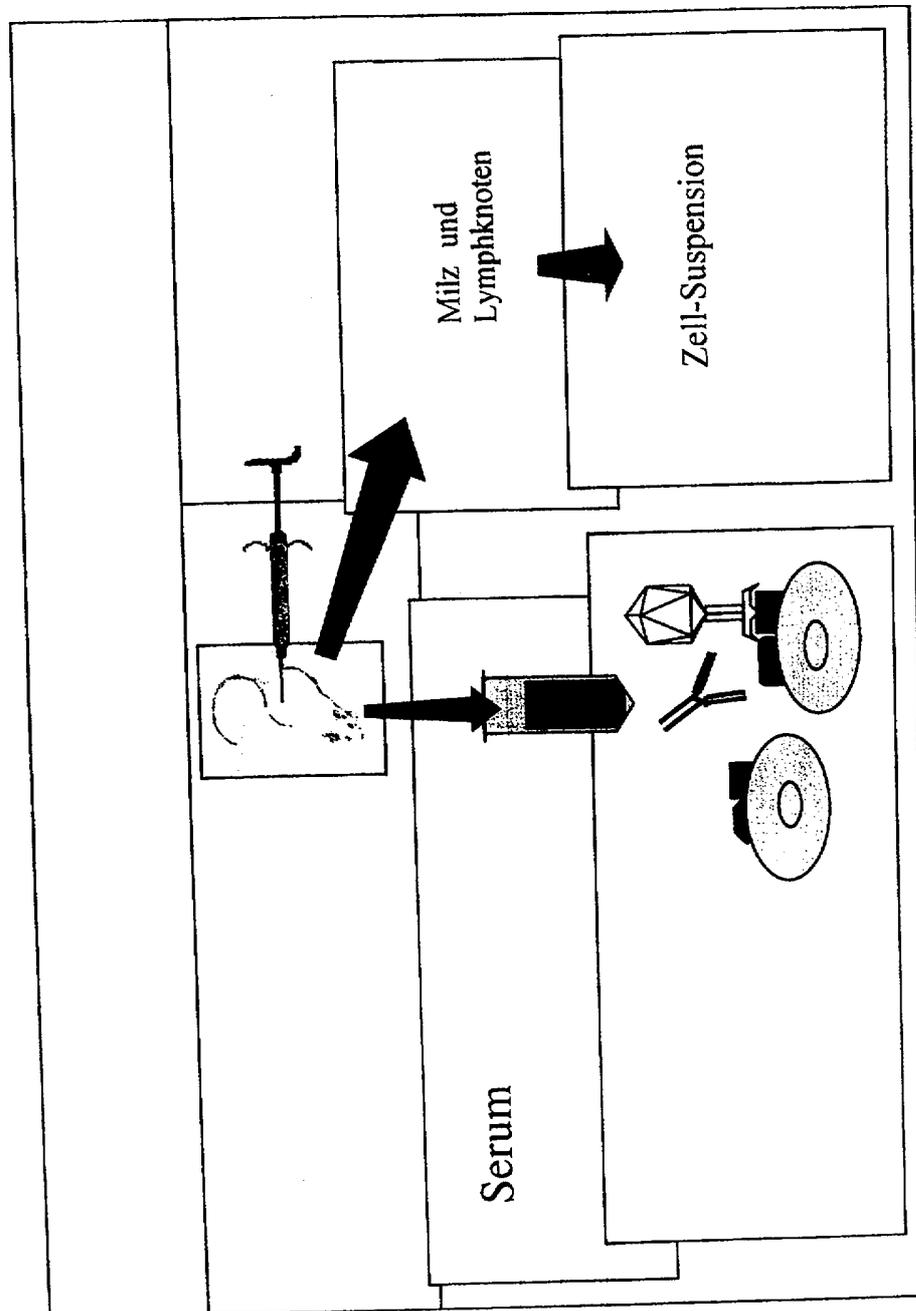


FIG. 2

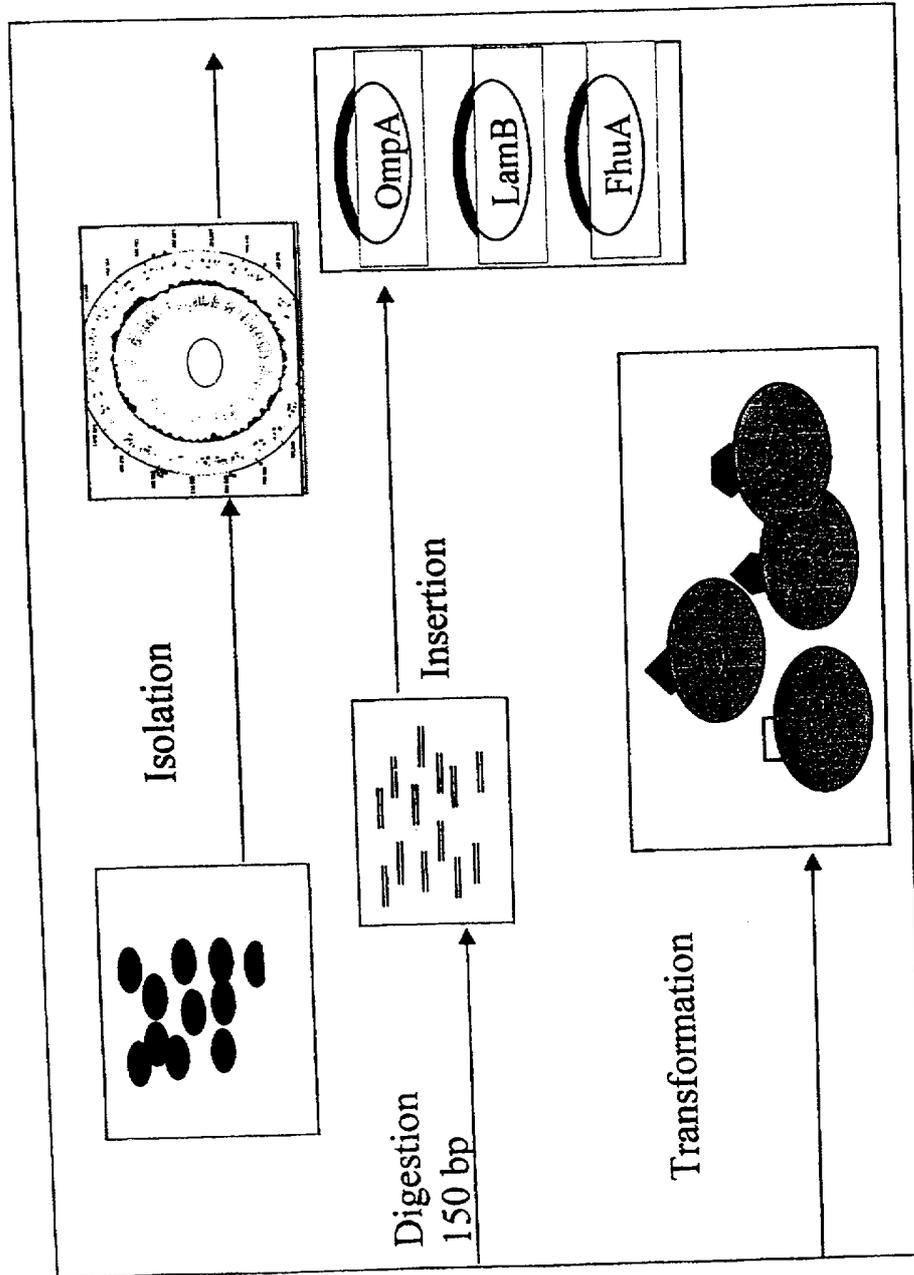


FIG. 3

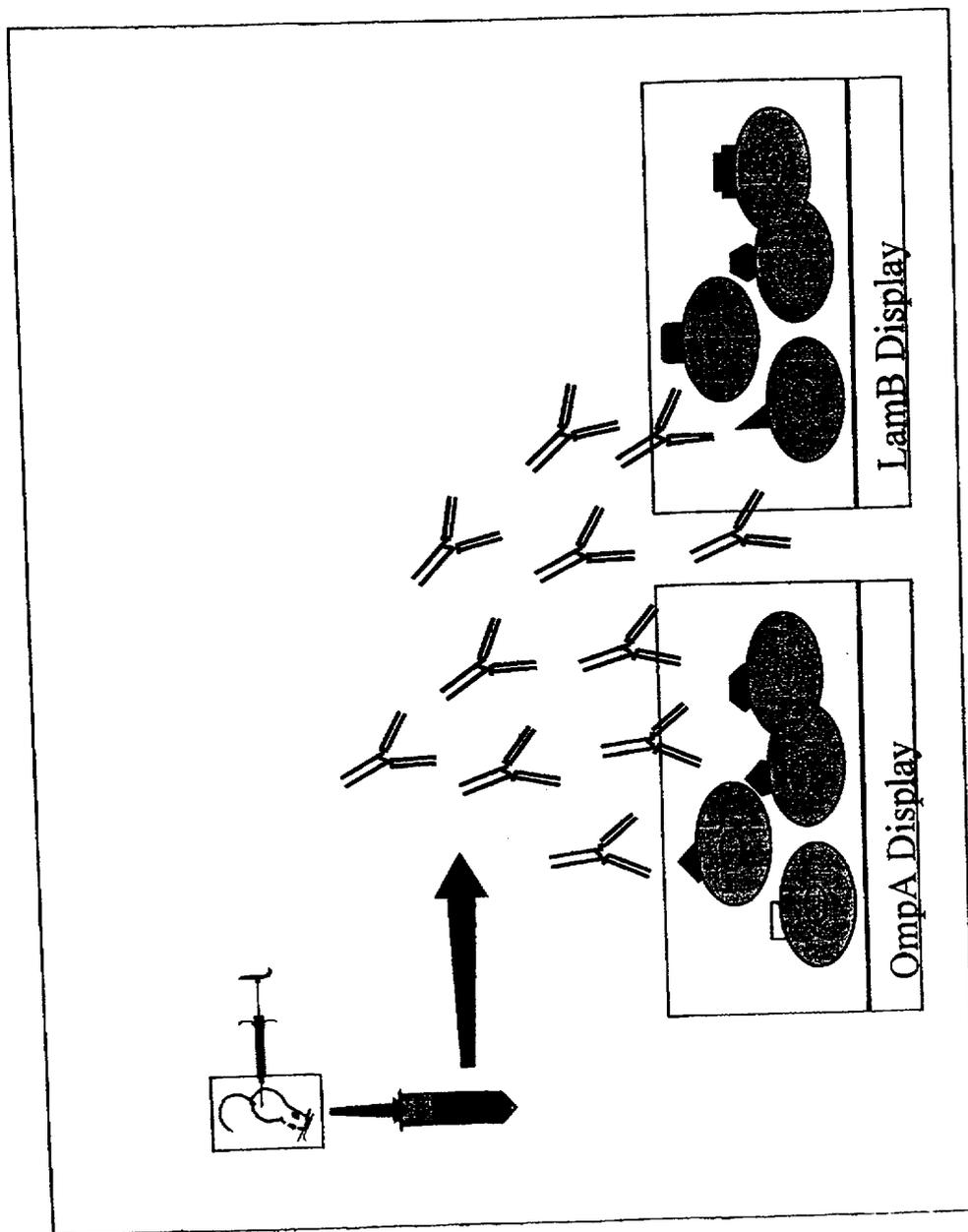


FIG. 4

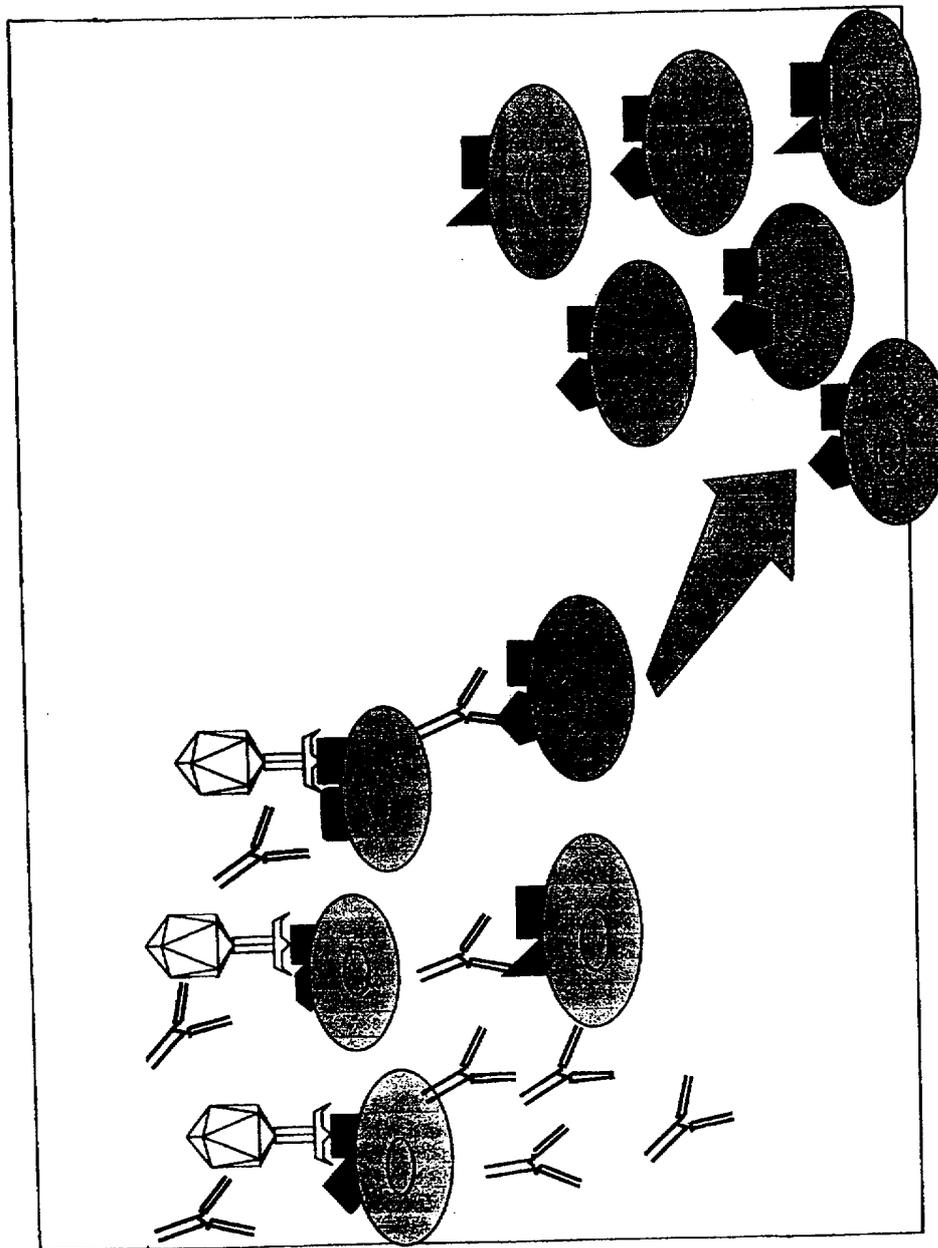


FIG. 5

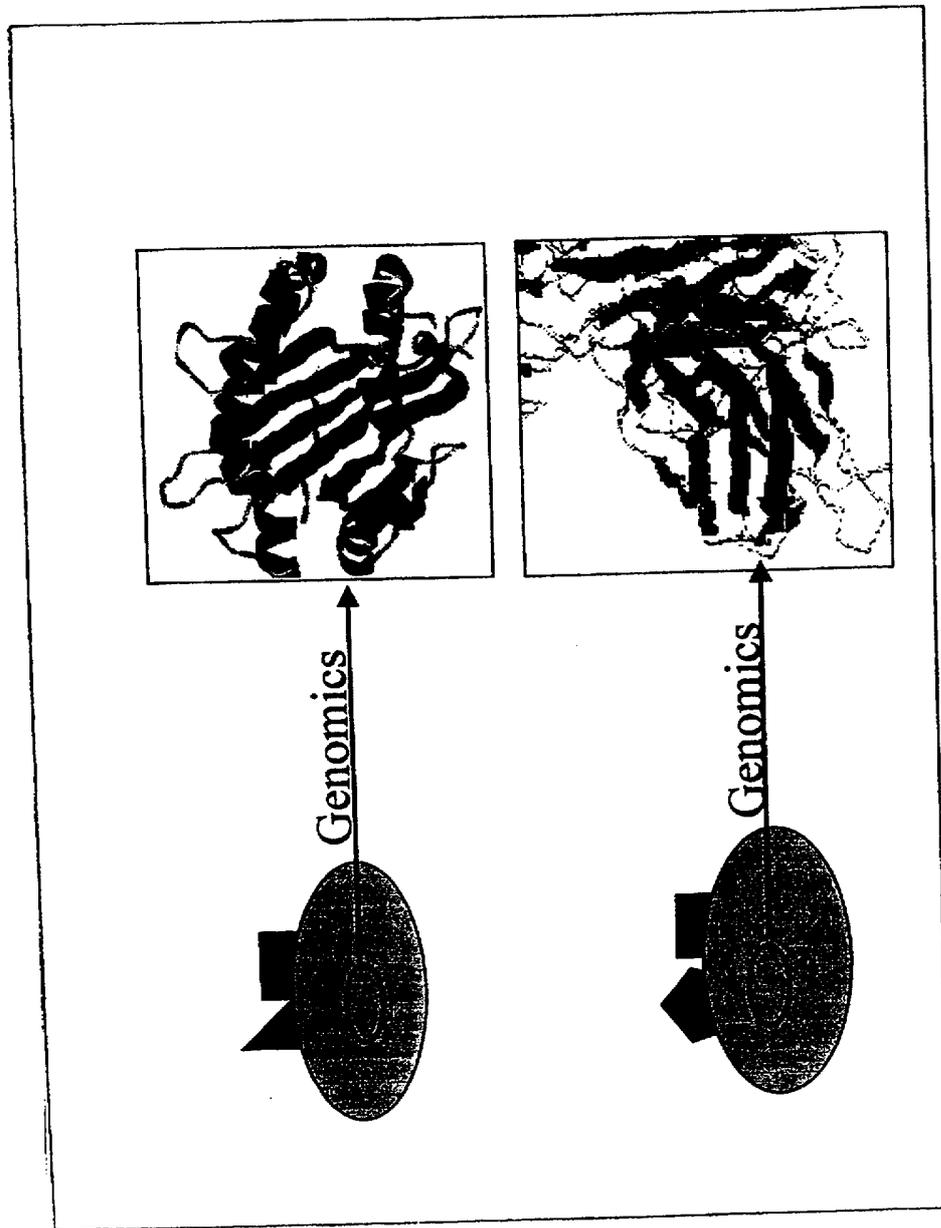


FIG. 6

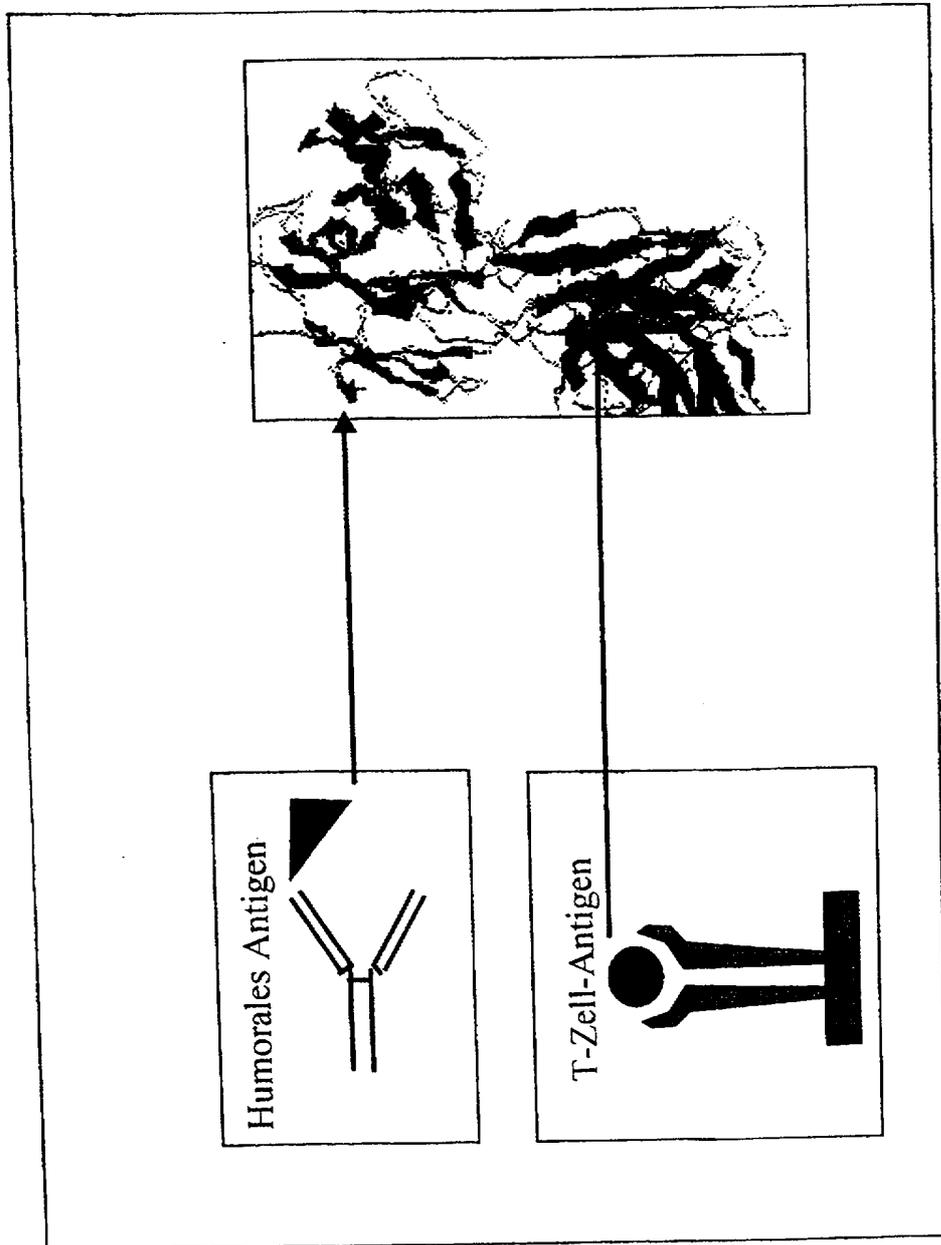


FIG. 7

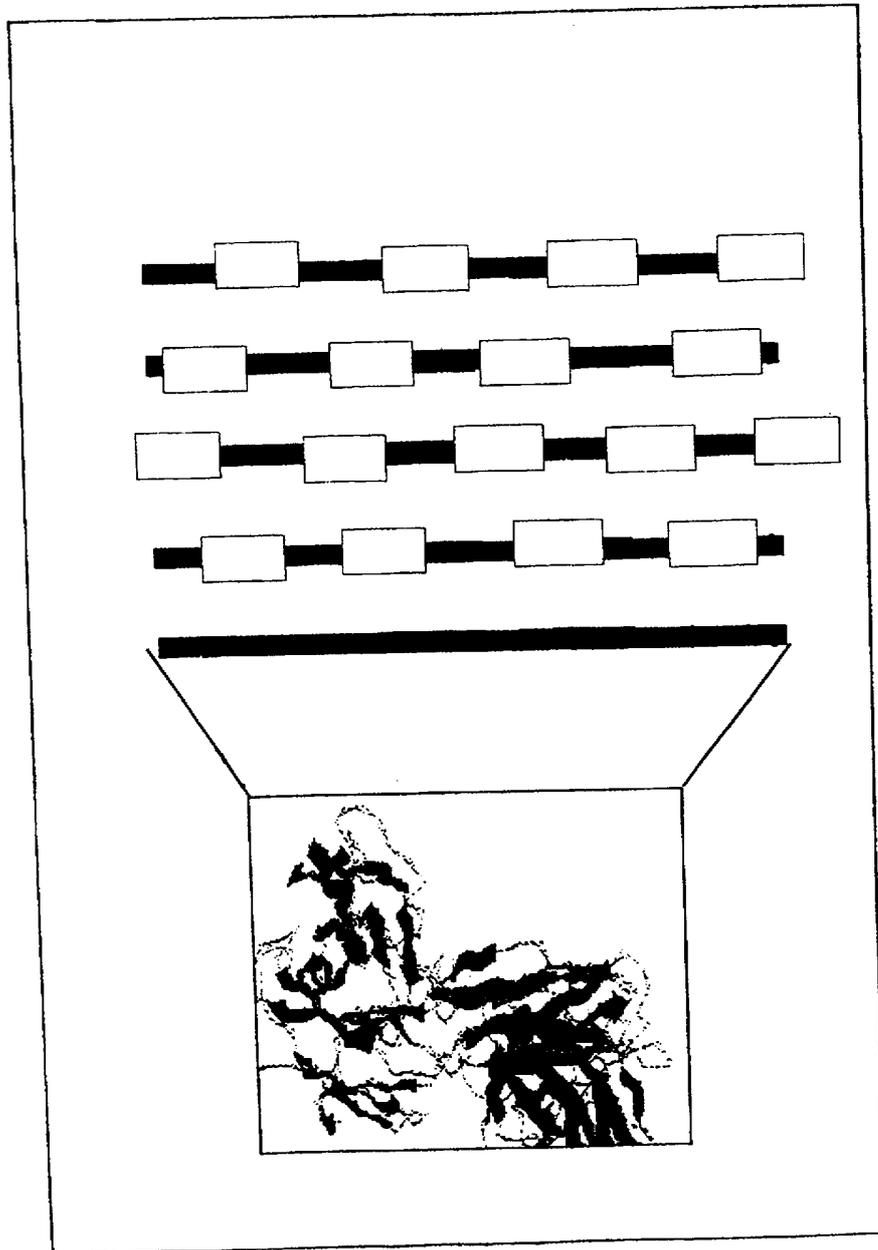


FIG. 8

