

### 1. Traditionelle Vakzinologie

Laut Weltgesundheitsorganisation zählen Impfungen zu den effektivsten und kostengünstigsten Strategien zur Bekämpfung und der Kontrolle von Infektionskrankheiten. Im Hinblick auf die unmittelbaren Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit, stehen Impfstoffe an zweiter Stelle hinter der Gewährleistung einer sauberen Wasserversorgung. Der Impfstoff dient zur spezifischen Aktivierung des Immunsystems hinsichtlich eines bestimmten Erregers bzw. einer Erregergruppe. Aus Sicht der Immunologie wirken konventionelle Impfstoffe alle nach dem gleichen Prinzip: Die durch die Immunisierung angeregten B-Lymphozyten produzieren Antikörper, welche verhindern, daß die Erreger den Wirtsorganismus schädigen. Sie blockieren die Anheftung des Erregers an Wirtszellen, so daß der Erreger nicht mehr in die Zelle eindringen kann, um dort seine schädliche Wirkung zu entfalten. Ziel einer jeden Impfung ist ein lang anhaltender Schutz vor der jeweiligen Krankheit, der je nach Erreger zwischen einigen Jahren bis lebenslang anhalten kann.

Seit mehr als einem Jahrhundert werden Impfstoffe nach den so genannten Prinzipien von Pasteur entwickelt, d.h. der Isolierung, Inaktivierung und Injektion der Infektionserreger einer ansteckenden Krankheit. Alle zurzeit verfügbaren Impfstoffe basieren auf abgetöteten oder abgeschwächten Mikroorganismen oder gereinigten Untereinheiten derselben, wie z.B. durch chemische Behandlung entgiftete Toxine oder gereinigte Antigene wie Proteine oder konjugierte Polysaccharide. Die nach den Prinzipien von Pasteur hergestellten Impfstoffe erlauben die Kontrolle und, in manchen Fällen, die Ausrottung vieler wichtiger Infektionskrankheiten. Trotz dieser Erfolge hat diese Strategie auch Grenzen: Sie ist nicht nur langwierig, sondern führt auch in Fällen von fehlenden immun-dominanten und ausreichend protektiven Antigenen und bei nicht kultivierbaren Mikroorganismen nicht zum Ziel. Die Entwicklung von Impfstoffen gegen diese Erreger kann nur mit Hilfe der modernen Immunologie und Molekularbiologie gelingen.

### 2. In silico Impfstoff-Entwicklung

In den letzten zehn Jahren haben innovative genomische Ansätze die Impfstoff-Forschung und -Entwicklung revolutioniert (Abb. 1) [1]. Seit der Veröffentlichung der ersten kompletten Genomsequenz eines Mikroorganismus im Jahr 1995 stieg die Zahl der Fortschritte auf genomischer Ebene exponentiell. Bis heute wurden mehr als 300 Bakterienarten sequenziert und analysiert, einschließlich wichtiger menschlicher Krankheitserreger. Die Suche nach protektiven Antigenen ist in ein neues Stadium eingetreten. Mit der Erstellung der Genomkarten der wichtigsten Krankheitserreger liegen deren Baupläne offen dar. Neue Technologien ermöglichen die immer schnellere DNA-Sequenzierung und tragen somit zu einem stetigen Wachstum und der Verbreitung neuer genetischer Daten und Erkenntnisse bei. Computergestützte und experimentelle Untersuchungen des Erbgutes ermöglichten einen bedeutenden Fortschritt im Verständnis der Physiologie und Pathogenität vieler Mikroorganismen und erlaubten neue

Einblicke in die Evolution von Genomen. Die Übertragung dieser Technologien auf virale, bakterielle und parasitäre Erreger ist nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht interessant, sondern birgt auch ein erhebliches Potenzial für die Entwicklung neuer Diagnostika, Therapeutika und Impfstoffe.

Der gentechnische Ansatz, Impfstoffe ausgehend von genetischer Information anstelle der üblichen Kultivierung der verantwortlichen Mikroorganismen zu entwickeln, wurde „Reverse Vakzinologie“ genannt. Dieser Ansatz eröffnet neue Möglichkeiten in der Impfstoff-Entwicklung gegen Krankheitserreger, für die eine Anwendung der Prinzipien von Pasteur nicht zum Ziel führte. Ein so genannter „Pan-genomischer“ Ansatz, d.h. die Ausweitung genetischer Studien auf mehrere repräsentative Vertreter derselben Art erwies sich darüber hinaus als sehr wirkungsvoll bei der Entwicklung neuer Impfstoffe, da somit durch Genvariationen auftretende Probleme überwunden werden können.

Des Weiteren erscheint das noch junge Feld der „Strukturellen Vakzinologie“, d.h. die Anwendung strukturbiochemischer Methoden und Erkenntnisse in der Vakzinologie, Lösungsansätze zu ermöglichen, wo anderen Strategien scheiterten: Die durch strukturbiochemische Studien gewonnene atomare Auflösung von Antigenstrukturen fördert das rationale Design Impfstoff-Geeigneter Epitope (Abb. 1).

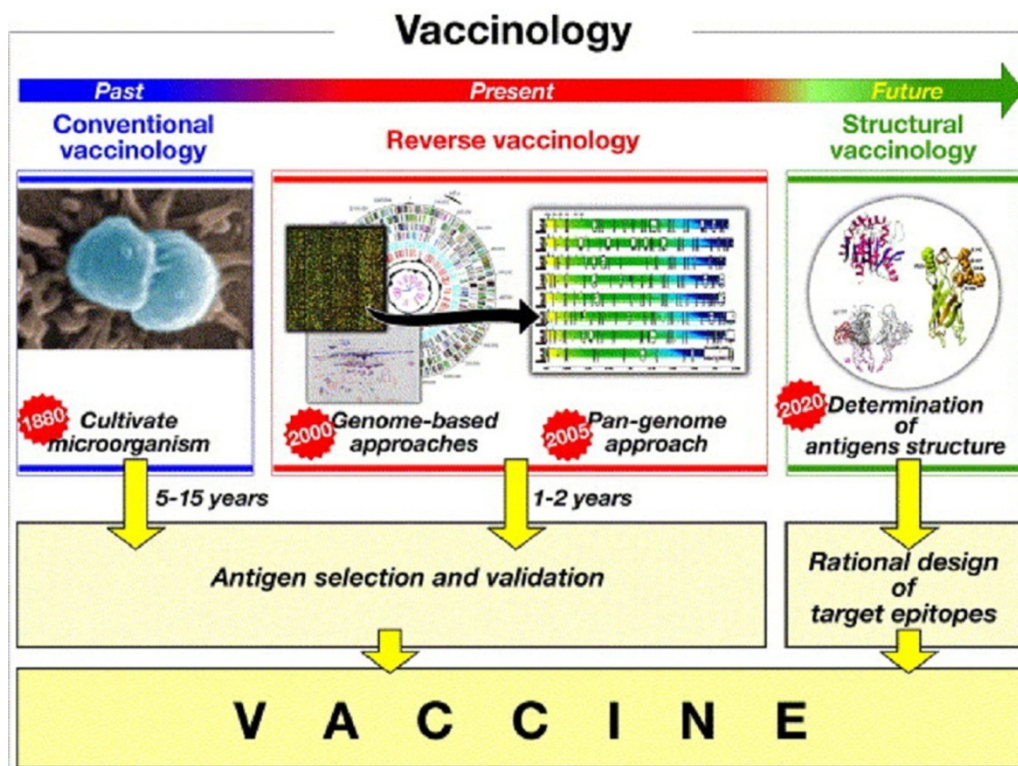


Abb. 1: Ansätze in der Impfstoffentwicklung

### 3. Zellkulturtechnologie für Grippeimpfstoffe

Seit Jahren stehen verschiedene Influenza - Impfstoffe zur Verfügung und im Lauf der Zeit wurden sie bei hoher Wirksamkeit immer verträglicher (Abb. 2).

Die Zellkulturtechnologie ist ein Herstellungsprozess, der ohne Hühnereier auskommt. Dieser neue Prozess ist eine bedeutende Innovation in der Grippeimpfstoffherstellung, denn seit über 50 Jahren werden die Grippeviren auf Hühnereiern vermehrt. Bei der Zellkulturtechnologie hingegen

wird für die Virusvermehrung anstelle der bisher verwendeten Hühnereier eine spezielle Zelllinie genutzt. Die sogenannte MDCK Zelllinie (Madin Darby Canine Kidney) wurde 1958 erstmals aus der Niere eines gesunden Hundes (Cocker Spaniel) gewonnen. Diese Zelllinie wurde erforscht und charakterisiert – sie eignet sich besonders gut für die Vermehrung von Grippeviren zur Impfstoffproduktion. Das innovative Verfahren stellt eine Weltneuheit bei der Gripeschutzimpfung dar. Es überwindet erstmals die systembedingten Nachteile der Ei-basierten Produktion, die eine flexible, dem Bedarf angepasste Impfstoffproduktion erschweren [2]. Die Zellkulturtechnologie braucht keine Hühnereier und ist deshalb flexibler und damit ggf. schneller: Lange Vorlaufzeiten wie bei der konventionellen Grippeimpfstoffproduktion auf Ei-Basis entfallen. Bisher müssen Millionen von speziellen Hühnereiern für den jährlichen Grippeimpfstoff mit einem Vorlauf von bis zu einem Jahr bestellt werden, um dann zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt werden zu können. Die Zellen für die Grippeimpfstoffproduktion auf Zellkultur-Basis sind hingegen stets vorrätig. Sie werden tiefgefroren gelagert und können jederzeit bei Bedarf in der benötigten Menge kurzfristig aufgetaut und vermehrt werden. Mit der Impfstoffproduktion kann daher zu jedem gewünschten Zeitpunkt begonnen werden. Im Fall eines unerwartet hohen Bedarfs oder auch wenn unvorhergesehen neue Virusstämme vermehrt zirkulieren, kann kurzfristiger ein entsprechender Impfstoff bereitgestellt werden.

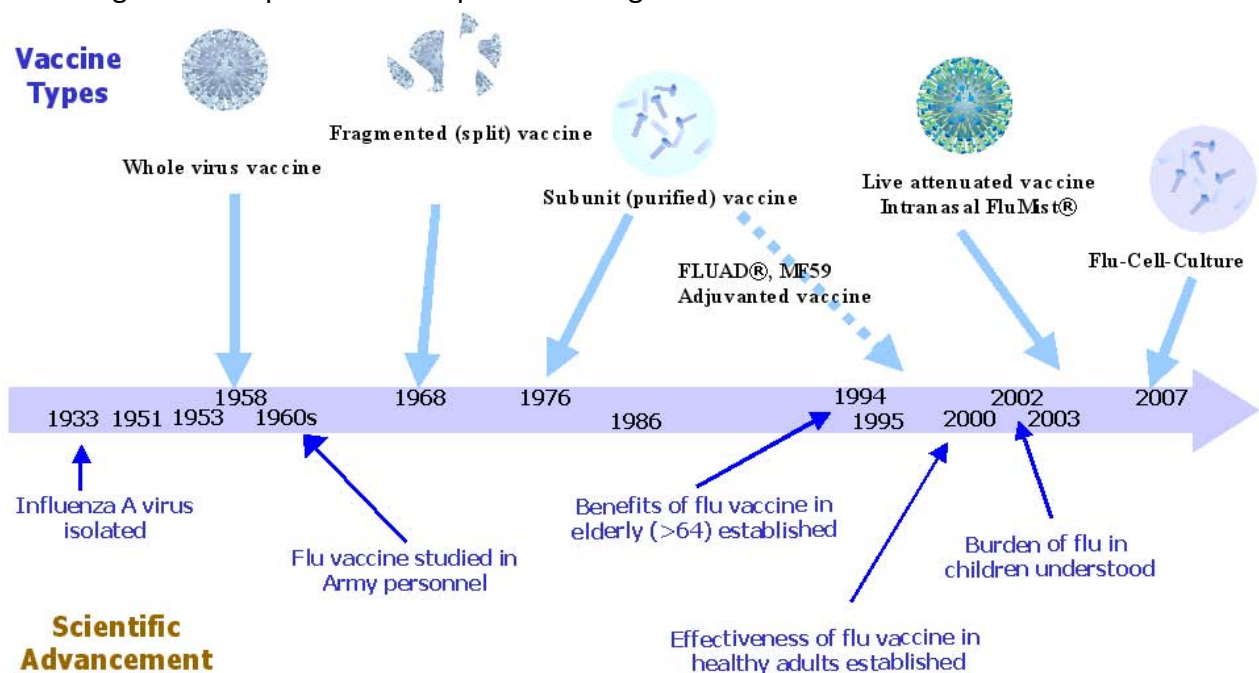


Abb. 2: Grippeimpfstoffe und deren Entwicklung

Der Zellkultur-Produktionsprozess stellt ein geschlossenes, standardisiertes System mit definierten Ausgangsmaterialien dar: Die Eigenschaften der Zelllinie, die in einem chemisch definierten Medium wächst, sind genau bekannt. Die speziell weiterentwickelten MDCK Zellen wachsen ohne Zusatz von Serum oder Proteinen und unter definierten Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur etc.). Aufgrund des geschlossenen, kontrollierten Produktionsverfahrens kommt der fertige Grippeimpfstoff ohne Zusatz von Antibiotika aus. Da die Herstellung der Zellkultur-Influenzavakzine vollkommen unabhängig vom Hühnerei ist, enthält der neue Impfstoff keinerlei Spuren von Hühnereiweiß. Deshalb können sich mit dem Zellkulturimpfstoff auch Menschen mit

Hühnereiweißallergie vor Grippe schützen. Er ist außerdem frei von Stabilisatoren, Konservierungsmitteln und Formaldehyd.

Auch im Falle der Zirkulation von Viren, die für Geflügel gefährlich sind, könnten die Hühnerbestände zur Gewinnung der benötigten Eier nur eingeschränkt oder gar nicht verfügbar sein. Kein Huhn – kein Ei – kein Impfstoff, das ist die einfache Gleichung bei der konventionellen Grippeimpfstoffproduktion auf Hühnerei- Basis. Die Zelllinie ist hingegen auch bei unerwarteten Anforderungen einsatzbereit.

Die Impfstoffproduktion-Produktion mittels Zellkultur in 5 Stufen (Abb.3)[2]:

**1. Zellvermehrung:** Die verwendete MDCK Zelllinie wurde für die Produktion von Grippeimpfstoff optimiert und bereits mit zahlreichen Virenvarianten getestet. Sie hat sich als besonders geeignet für die Produktion von Grippeimpfstoffen erwiesen, denn sie wächst in Suspension, das heißt, die Zellen benötigen keine Oberfläche zur Vermehrung. Das Suspensionsvolumen kann über weitere Medienzugabe expandiert werden, was die industrielle Produktion des Impfstoffes sehr vereinfacht. Die Zellen lagern in flüssigem Stickstoff. Zum Start der Produktion wird eine kleine Ampulle (1 ml) mit Zellen aufgetaut und in mehreren Schritten bis zu einem Volumen von mehr als 1.000 Litern in Fermentern (Edelstahlkesseln) vermehrt, das entspricht einer millionenfachen Volumensteigerung. In jedem Stadium erhalten die Zellen die optimale Umgebung für ihr Wachstum – was die Temperatur, den pH-Wert und die Nährlösung angeht. Die stufenweise

Vermehrung der Zellen innerhalb eines geschlossenen Systems wird unablässig mit Hilfe eines Computersystems überwacht, das alle Daten automatisch prüft und jeden Schritt genau dokumentiert. Dieses innovative Herstellungsverfahren bietet Impfstoffproduktion mit höchster Reinheit und bedeutet höchste Sicherheit für Mitarbeiter und Umwelt.

**2. Virusvermehrung:** Haben die Zellen nach den Expansionsschritten im Endvolumen ihre optimale Wachstumsdichte erreicht, werden über ein geschlossenes Rohrsystem die Influenzaviren zur Infektion der Zellen hinzugegeben. Die Viren benötigen mehrere Tage zur Vermehrung innerhalb der Zellen. Während dieses Vervielfältigungsvorganges stirbt ein großer Teil der Zellen ab und die Viren werden in das Medium freigesetzt.

**3. Aufreinigung:** Der erste Schritt einer langen Reihe von Aufreinigungsmaßnahmen ist eine sogenannte Separation, bei der die virushaltige Lösung von den Zellresten getrennt wird. Über eine Chromatographie-Säule wird das Virus anschließend von der



Abb. 3: Grippeimpfstoffproduktion



Medienlösung getrennt und das Volumen reduziert.

**4. Inaktivierung und Spaltung:** Die Viren werden zunächst durch einen chemischen Prozess inaktiviert. Danach erfolgt die Virusspaltung. Für den späteren Grippeimpfstoff werden nur die Oberflächenmoleküle der Influenzaviren - Hämagglutinin und Neuraminidase - benötigt. Nach weiteren Reinigungs- und Konzentrierungsschritten bleibt zum Schluss das Antigenkonzentrat eines Virusstammes übrig. Da in den saisonalen Grippeimpfstoffen drei Virusstämme enthalten sind, muss der Produktionsprozess entsprechend drei Mal durchgeführt werden.

**5. Mischen, Abfüllen und Freigabe:** Produktions- begleitend und zum Abschluss der Produktion finden fortlaufend zahlreiche Qualitätskontrollen statt. Am Ende des Prozesses wird der Impfstoff gemischt, abgefüllt und verpackt. Die endgültige Freigabe erfolgt durch die europäische Zulassungsbehörde (EMA) (Abb. 3)

Die neue Produktionstechnologie gewinnt besondere Bedeutung im Hinblick auf die zunehmende Gefahr einer weltweiten Grippe-Pandemie. Eine schnelle Produktion großer Mengen eines geeigneten Impfstoffes ist in diesem Fall unabdingbar. Aufgrund kürzerer Vorlaufzeiten und größerer Flexibilität ermöglicht die neue Technologie eine schnellere und sicherere Impfstoffproduktion, die unabhängig von der Verfügbarkeit großer Mengen kontrollierter Hühnereier ist.

#### 4. Neuartige Impfstoff-Adjuvanzien und mukosale Impfung

Neuartige Impfstoffe, welche z.B. auf rekombinanten Proteinen basieren, sind einerseits sicherer als traditionelle Impfstoffe aber zugleich auch weniger immunogen. Daraus resultiert die dringende Notwendigkeit neue und wirksamere Hilfsstoffe, sogenannte Adjuvanzien, d.h. „Immunpotentiators“ und „Delivery Systems“ zu entwickeln. Die geringere Immunogenität von Protein- und Peptidimpfstoffen kann durch geeignete Adjuvanzien verbessert werden, und es ist es möglich mit entsprechenden Antigen-Adjuvanz-Kombinationen komplexe Immunreaktionen hervorzurufen.

Auf der Basis neuer immunologischer Einsichten wie zum Beispiel der Erkenntnis, daß eine Aktivierung des angeborenen (innate) Immunsystems Antigen-spezifische Immunantworten initiiert, verstärkt und leitet, wurden neue Adjuvanzien gefunden und entwickelt. Darüber hinaus führte die Identifizierung einzelner Zelltypen, spezifischer Rezeptoren und Signalwege, welche an der Aktivierung des Innate-Immunsystems beteiligt sind, zu einer Vielzahl neuartiger Angriffspunkte und Zielstrukturen, die bei der Entwicklung neuer Adjuvanzien ausnutzt werden können.

Innovative Impfstoffe basieren heutzutage auf bis zu drei Hauptbestandteilen: Einem Antigen, gegen welches die adaptive Immunantwort, d.h. eine Antigen-spezifischen Immunantwort, entwickelt wird. Einem Immun-potentiator, der zur einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt und einem

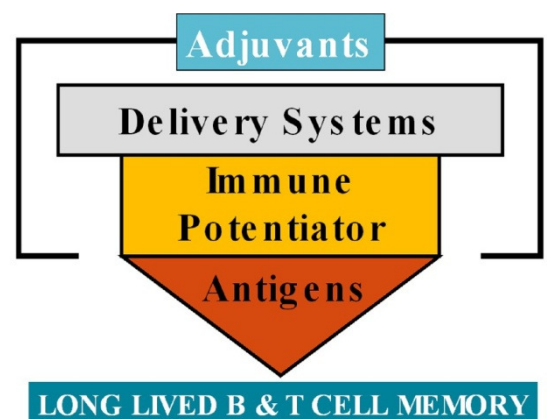


Abb. 4: Hauptbestandteile innovativer Impfstoffe

Delivery System, welches sowohl das Antigen als auch den Immun-potentiator an den gewünschten Angriffspunkt manövriert (Abb. 4)[3].

Eine Reihe potenter immun-stimulierender Moleküle, die z.B. aus bakteriellen Zellen oder Pflanzen gewonnen wurden, sind intensiv auf ihre Brauchbarkeit als Adjuvanzien getestet worden. Leider zeigten jedoch viele dieser Moleküle eine erhebliche Toxizität, sowohl in vorklinischen Tiermodellen als auch in klinischen Studien im Menschen.

Ein alternativer Ansatz besteht in der Entwicklung spezieller Antigen Delivery Systeme welche ähnliche Dimensionen wie natürlich vorkommende Pathogene aufweisen. Durch geeignete Delivery Systems „Verpackungen“ kann auch gewährleistet werden, daß das Antigen langsam freigesetzt wird und so über einen längeren Zeitraum die Immunisierung kontinuierlich stattfindet. Zu den Adjuvanzien, welche eine langsame Antigenfreisetzung ermöglichen, gehören Liposomen, Squalen und langsam biologisch abbaubare Mikroverpackungen, in die das Antigen eingeschlossen wird.

In Versuchen zeigten Delivery Systems, wie Emulsionen und Mikropartikel, eine Steigerung von sowohl humoraler als auch zellulär-vermittelter Immunantworten. Darüber hinaus weisen einige von ihnen auch eine akzeptable Toxizität auf, wie in einer Reihe von klinischen Studien gezeigt werden konnte.

Das Adjuvanz MF59, eine Wasser in Öl Emulsion, welche im Influenza-Impfstoff Flud<sup>®</sup> verwendet wird, wurde erstmals 1997 in Italien zugelassen. Heute ist Flud<sup>®</sup> in mehr als 20 Ländern registriert und über 30 Mio. Menschen wurden mit dem Adjuvanz-haltigen Impfstoff geimpft. Die Zulassung von Flud<sup>®</sup> und damit von MF59 ist die erste Zulassung eines neuartigen Adjuvanz für den Einsatz im Menschen nach der Registrierung unlöslicher Aluminium-Salze vor über 70 Jahren[4].

In Kombination mit zahlreichen Antigen-Klassen (rekombinante Protein-Antigene, isolierte virale Membran-Antigene, bakterielle Toxine, Protein-Zucker-Konjugate, Peptide usw.) und in verschiedenen Spezies konnte für MF59 eine starke adjuvante Wirkung nachgewiesen werden. MF59 ist besonders effektiv was die Induktion hoher Antikörpertiter betrifft, einschließlich funktioneller Titer wie neutralisierender, bakterizider und opsonophagozytischer Titer und ist für die meisten Antigene wirkungsvoller als Aluminium.

Von besonderer Bedeutung sind Adjuvanzien und Impfstoffformulierungen, die zur Entwicklung mukosaler Impfstoffe beitragen. Die Mehrzahl aller Infektionen beginnen auf mukosaler Ebene, was zu der Hypothese führte, daß eine geeignete mukosale Immunantwort (IgA) gegen derartige Pathogene zu einer besseren Abwehr beiträgt. Die mukosale Immunisierung (z.B. nasal oder oral) erscheint daher zweckmäßigsten für eine erfolgreiche Impfung gegen mukosale Pathogene. Ein weiterer Vorteil mukosaler Immunisierung besteht darin, daß sowohl eine systemische als auch eine mukosale Immunantwort induziert wird, während die systemische Immunisierung meist nur zu systemischer Immunität führt. Die Patienten „Compliance“ könnte gesteigert werden und das Risiko, Krankheiten durch unsachgemäßen Gebrauch von Spritzen zu übertragen, könnte verringert werden.

Leider zeigen jedoch die meisten klinisch relevanten Impfstoffkandidaten nach mukosaler Verabreichung nur schwache Immunantworten und haben darüber hinaus oft nicht die Fähigkeit biologische/mukosale Barrieren zu überwinden.

Die richtige Verpackung dieser Impfstoffkandidaten mittels geeigneter Adjuvanzien, wie der oben genannten Delivery Systems, ist daher ein wesentlicher Bestandteil in der mukosalen Impfstoff-Forschung. Ergänzend zu den Delivery Systems können auch mukosale Adjuvanzien, wie genetisch modifizierte und damit verträglicher gemachte bakterielle Toxine eingesetzt werden.

Toxine, wie z.B. das „heat-labile“ Enterotoxin (LT) von *Escherichia coli* und das Cholera-Toxin (CT) von *Vibrio cholerae* zählen zu den stärksten bekannten mukosalen Adjuvanzien. Sie sind dazu befähigt die mukosale Immunantwort gegen Antigene zu verbessern. Beide bestehen aus zwei Untereinheiten, nämlich der enzymatisch aktiven A-Untereinheit und der zellrezeptor-bindenden B-Untereinheit. Als Zellrezeptor dient das Gangliosid GM1, welches z.B. auf intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Abb. 5).

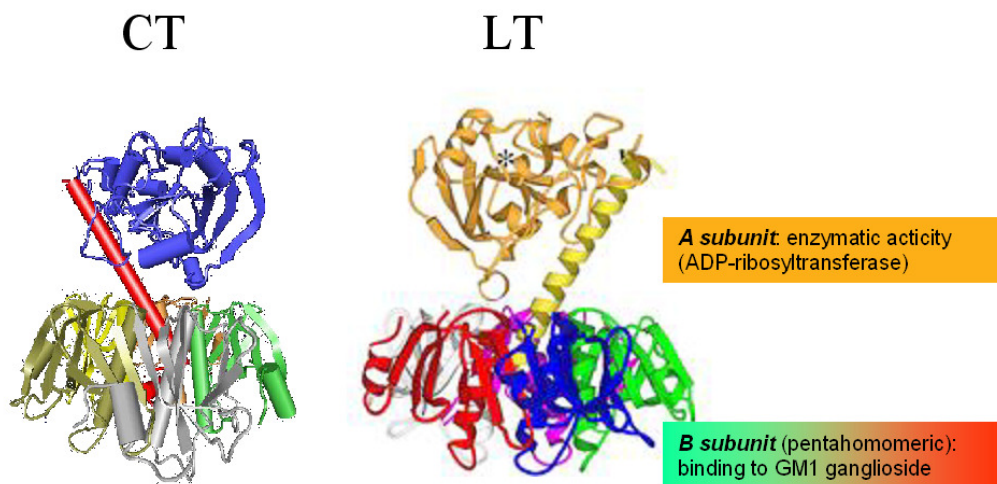


Abb. 5: Bakterielle Toxine von *Escherichia coli* (LT) und *Vibrio cholerae* (CT)

Da jedoch bei einer Anwendung als Impfstoff-Adjuvanz sowohl LT als auch CT unerwünschte Nebenwirkungen wie Durchfall oder Cholera auslösen würden, eignen sie sich in ihrer „Wildtyp“ Form nicht zur Applikation im Menschen. Genetische Modifizierungen führten zu Mutanten mit verringerter Toxizität unter Beibehaltung ihrer adjuvanten Wirkung (Abb. 6) [5].

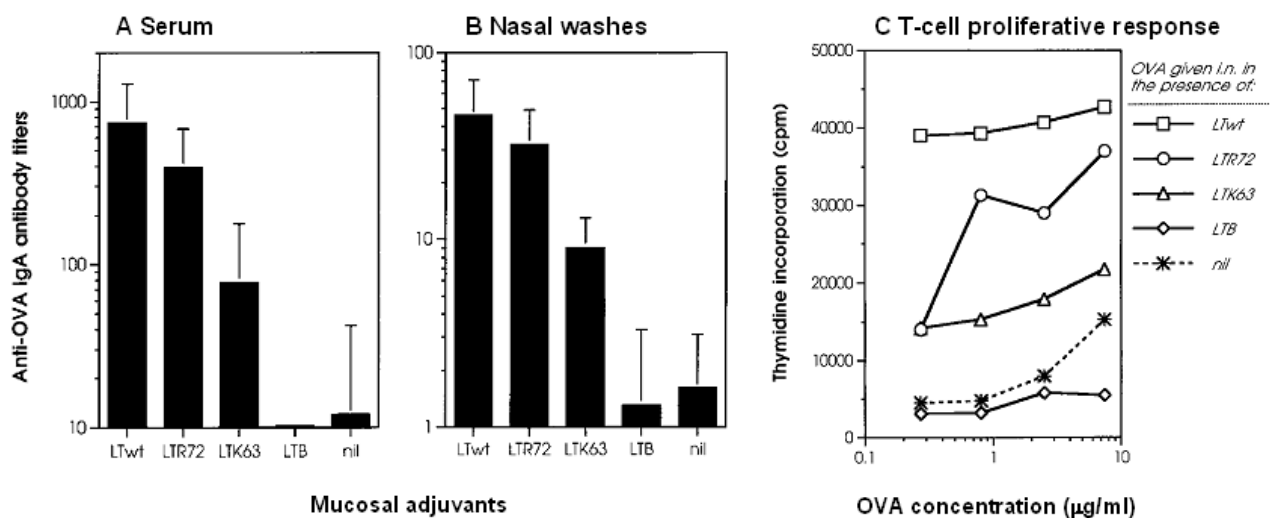


Abb. 6: IgA immune responses to OVA in sera (A) and in nasal washes (B) of mice immunized intranasally three times with OVA alone or OVA in combination with wild-type LT, LTR72, LTK63, and rLTB. Results are shown as mean titers and error bars indicate the standard deviation from the mean titer. T cell proliferative response (C) to OVA. T

cell proliferative response to OVA in spleen cells from mice immunized intranasally for two times with OVA alone or OVA in combination with wild-type LT, LTR72, LTK63, and rLTB

Präklinische Toxizitätsstudien und klinische Studien im Menschen im Rahmen einer intranasalen Influenza-Impfstoff Studie, weisen auf die Unbedenklichkeit einer LT Toxin Mutante (LTK63) hin. Zusätzliche Studien in Tiermodellen zeigten, daß die Kombination eines bio-adhesiven Delivery Systems mit dem Adjuvanz LTK63 einen synergistischen Effekt hat und zu einer weiteren Steigerung der Antigen-spezifischen Immunantwort nach nasaler Applikation führt (Abb. 7)[6]. Bio-adhesive Delivery Systems wirken vor allem über die Förderung der Wechselwirkung und der Verlängerung des Kontakts zwischen Antigen und Adjuvanz mit mukosalen Epithelzellen.

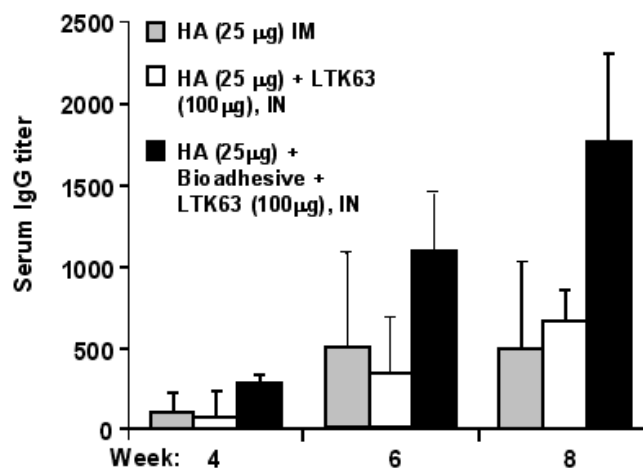


Abb. 7: Die Kombination eines bio-adhesiven Delivery Systems mit dem Adjuvanz LTK63 (schwarze Balken) zeigt einen synergistischen Effekt und führt zur Steigerung der Antigen-spezifischen Immunantwort nach nasaler Applikation (gemessen als Serum IgG Titer).

## 5. Schlussfolgerung

Fortschritte im Verständnis des Immunsystems helfen bei der Entwicklung besserer Impfstoffe. Dies in Kombination mit der Verbesserung pharmazeutischer Technologien und der Formulierung geeigneter immun-stimulierender Moleküle und Delivery Systems ermöglicht es, immer bessere Impfstoffe für den weltweiten Bedarf herzustellen. Der Einsatz neuartiger Adjuvanzen könnte daher auch die Anwendung von Impfstoffen im therapeutischen Bereich ermöglichen, und somit zusätzlich zur Ausrottung von Infektionskrankheiten, Fortschritte bei der Bekämpfung von Krebs erzielen oder zur Verbesserung von Autoimmunkrankheiten beitragen.

## 7. Literatur

1. Serruto, D. and R. Rappuoli, *Post-genomic vaccine development*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2985-92.
2. *Flu Cell Culture Technology: The Next Frontier*. 2006, Novartis AG [www.novartisvaccines.com/pipeline/flu\\_culture.shtml](http://www.novartisvaccines.com/pipeline/flu_culture.shtml)
3. O'Hagan, D.T. and N.M. Valiante, *Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 727-35.
4. O'Hagan, D.T., *MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 699–710.



5. Giuliani, M.M., et al., *Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1123-32.
6. Singh, M., M. Briones, and D.T. O'Hagan, *A novel bioadhesive intranasal delivery system for inactivated influenza vaccines*. J Control Release, 2001. **70**(3): p. 267-76.