

# Grippeimpfstoffe für die Zukunft

## Ein Überblick über gegenwärtige und neue Verfahren der Impfstoffherstellung

Derzeit verfügbare Influenzaimpfstoffe bieten nicht immer ausreichenden Schutz und müssen zudem in komplexen, langwierigen Verfahren hergestellt werden. Mit neuen Strategien, basierend auf der rekombinanten DNA-Technologie, können effektivere Impfstoffe in wesentlich kürzerer Zeit und in erheblich grösseren Mengen produziert werden. In einem Übersichtsartikel werden gegenwärtige Verfahren und neue Ansätze zur Herstellung von Influenzavakzinen zusammengestellt.

NEJM

Die Impfung ist die wichtigste Strategie zur Prävention und Kontrolle der Influenza. Bei den derzeit verfügbaren inaktivierten oder attenuierten Impfstoffen variiert die Schutzfunktion jedoch stark in Abhängigkeit von der Übereinstimmung zwischen den Vakzinenviren und den in der Grippezeit zirkulierenden Stämmen. Die Influenzastämme für die Impfstoffe der nördlichen Hemisphäre werden meist im Februar für die kommende Saison ausgewählt. Anschliessend werden in einem mehrwöchigen Prozess hybride Referenzstämme hergestellt. Von Februar bis in den Spätsommer werden die Vakzinenviren dann in langwierigen komplexen Verfahren in embryonierten Hühnereiern vermehrt, deaktiviert und gereinigt.

Um die Produktionszeiten zu verkürzen und die Kapazitäten bei einer Pandemie kurzfristig steigern zu können, werden diese konventionellen Verfahren weiterentwickelt. In Studien

untersuchen Wissenschaftler andere Substrate zur Virenvermehrung oder erhöhen die Wirksamkeit der Impfstoffe mit Adjuvanzen. Ausserdem werden neuartige attenuierte Lebendimpfstoffe entwickelt. Rekombinante DNA-Techniken ermöglichen jetzt aber auch neue Produktionsstrategien, mit denen kurzfristig grosse Impfstoffmengen hergestellt werden können, sobald die genetische Sequenz von Oberflächenproteinen wie Hämagglutinin (HA) von aktuell zirkulierenden Influenzaerregern bekannt ist (*Abbildung 1*). Bei diesen Verfahren entfällt die Notwendigkeit, mit pathogenen Viren zu hantieren oder sie so anzupassen, dass sie in Hühnereiern oder anderen Substraten wachsen. Die neuen Techniken werden derzeit in Phase-1- oder Phase-2-Studien und manche auch in Studien der Phase 3 evaluiert (*Tabelle 1*).

### Zellkulturtechniken

Die konventionelle Herstellung von Impfstoffen in Eiern ist störanfällig. Bei einem zoonotischen Ausbruch der Vogelgrippe oder anderen Krankheiten, die Hühner befallen, reichen die Eiervorräte nicht aus, und Kapazitäten zur Beschleunigung der Produktion fehlen. Um auf die saisonale Grippe besser vorbereitet zu sein, wurden deshalb Säugetierzellkulturen als alternatives Substrat zur Produktion von Influenzaimpfstoffen entwickelt. Der Wechsel von Eiern zu Zellkulturen ermöglicht ein direktes Arbeiten mit Wildtypen, verhindert die Entwicklung Ei-adaptiver Mutationen im Hämagglutinin und gewährleistet höhere Spitzenkapazitäten bei einer Pandemie. Manche Einschränkungen bleiben aber bestehen. Zur Herstellung inaktivierter Impfstoffe müssen grosse Virenmengen erzeugt werden, um ausreichend Hämagglutinin zu erhalten. Zudem werden diese Viren dann ähnlich weiterverarbeitet wie die in Eiern erzeugten, sodass nicht sicher ist, ob durch Zellkulturen die Produktionszeit wirklich verkürzt werden kann.

### Adjuvanzen

Adjuvanzen verstärken die Immunantwort auf ein Antigen durch eine Beschleunigung der Antikörperbildung und über die gezielte Rekrutierung von Entzündungszellen und immunkompetenten Zellen in Bereiche der Antigenabscheidung. Sie aktivieren die angeborene oder die erworbene Immunantwort oder beide Formen. In Europa sind bereits einige HA-basierte saisonale Grippeimpfstoffe mit Adjuvanzen zugelassen. Im Jahr 2009 wurden H1N1-Impfstoffe mit Öl-in-Wasser-Emulsionen in Europa und anderen Ländern verwendet. In den USA wurden diese Impfstoffe aufgrund allgemeiner Sicherheitsbedenken gegenüber Impfstoffen

## Merksätze

- ❖ Mithilfe der rekombinanten DNA-Technologie können hoch wirksame Influenzaimpfstoffe in kurzer Zeit und in grossen Mengen produziert werden.
- ❖ Zu den Vakzinen der neuen Generation gehören rekombinante Proteine, virusähnliche Partikel, virale Vektoren, DNA-basierte Vakzine und Multi-Epitop-Impfstoffe.

Tabelle:

## Gegenwärtige und neue Ansätze zur Produktion von Grippeimpfstoffen

Impfstoff	Entwicklungsphase			
	Präklinische Entwicklung	Phase 1 und 2	Phase 3	Zulassung beantragt oder erteilt
<b>Inaktivierte Impfstoffe</b>				
Ei-basiert	Ja	Ja	Ja	Ja
Zell-basiert	Ja	Ja	Ja	In Europa / nicht in den USA
mit Adjuvantien	Ja	Ja	Ja	In Europa / nicht in den USA
<b>Attenuierte Lebendimpfstoffe</b>				
Ei-basiert	Ja	Ja	Ja	Ja
Zell-basiert	Ja	Ja	Nein	Nein
<b>Neue Generation</b>				
rekombinante Proteine	Ja	Ja	Ja	Nein
virusähnliche Partikel	Ja	Ja	Nein	Nein
virale Vektoren	Ja	Ja	Nein	Nein
DNA-basierte Impfstoffe	Ja	Ja	Nein	Nein
Universalimpfstoffe	Ja	Ja	Nein	Nein

bisher nicht übernommen. Klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass Adjuvantien wie Öl-in-Wasser-Emulsionen erforderlich sind, um eine ausreichend hohe Freisetzung von Antikörpern gegen Grippeviren mit neuen Hämagglutininen (z.B. H5N1-Viren) zu stimulieren. In frühen Studien zeigten sich auch gereinigte bakterielle Proteine der äusseren Membran, Toll-like-Rezeptoren und einige Toll-like-Rezeptoragonisten (bakterielle Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren) als vielversprechende Adjuvantien der nächsten Generation.

### Neuartige attenuierte Lebendimpfstoffe

Zurzeit werden auch neuartige attenuierte Influenza-Lebendimpfstoffe auf der Basis des Nichtstrukturproteins NS1 entwickelt. Dabei handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, das an der Virenreplikation und der Hemmung der angeborenen Immunantwort des Wirts beteiligt ist. In präklinischen Studien hat sich gezeigt, dass eine Infektion mit Viren, die ein verändertes NS-Protein enthalten oder bei denen es entfernt wurde, die Virenreplikation blockiert und gleichzeitig sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert. In frühen klinischen Studien hat sich ein intranasaler NS1-Impfstoff als gut verträglich erwiesen und neutralisierende HA-Antikörper erzeugt.

### Rekombinante Proteine

In den USA durchläuft gerade ein rekombinanter trivalenter Impfstoff auf Basis des Hämagglutinins die letzten Stufen der klinischen Entwicklung. Sobald Influenza-Impfstämme ausgewählt sind, werden die Gene, die deren Hämagglutinin kodieren, in Baculoviren-Vektoren geklont. Anschliessend exprimieren Insektenzellen, die mit den Vektoren infiziert wurden, entsprechende HA-Proteine, die dann in einen triva-

lenten Impfstoff formuliert werden. Die Zulassung dieses Impfstoffs wurde bei der Food and Drug Administration (FDA) zur Anwendung gegen die saisonale Grippe bei gesunden Personen ab 18 Jahren beantragt.

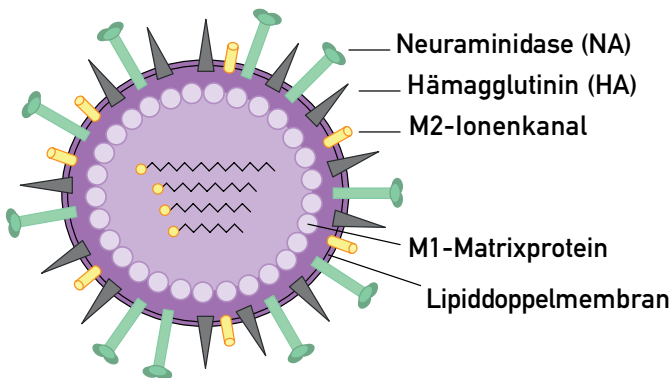
### Virusähnliche Partikel

Die Anwendung nicht infektiöser virusähnlicher Partikel ist ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Produktion von Grippeimpfstoffen. Dazu werden Zellkulturen mit rekombinanten viralen Vektoren infiziert, die HA, NA und das Influenza-Matrix-Protein (M1) exprimieren, das an der Virensamblierung und der Knospung beteiligt ist. Die exprimierten Influenzaproteine ordnen sich später spontan an der Plasmamembran der infizierten Zellen an und schnüren sich ab. Dabei bilden sie Partikel, die in ihrer Struktur Wildtypviren ähneln. In diese knospenden Partikel können auch andere Influenzaproteine oder immunstimulierende Moleküle integriert werden. Zahlreiche virusähnliche Partikel haben sich in Tierstudien als vielversprechend erwiesen, und mindestens einer wird zurzeit in Phase-2-Studien untersucht.

### Virale Vektoren

Viren, die sich nicht replizieren können oder die sich replizieren, aber keine Erkrankung verursachen, werden ebenfalls als neue Impfoptionen evaluiert. Bei diesem Verfahren werden lediglich die HA-Gene aus saisonalen Influenzaviren oder H5N1-Viren in sogenannte Trägerviren wie Vakzinaviren, Alphaviren, Newcastle-Viren, Baculoviren oder vesikuläre Stomatitisviren geklont. Bei Tieren, die mit viralen Vektoren geimpft wurden, beobachtete man ein zelluläres Ansprechen sowie eine Antikörperreaktion gegen das Impfvirus und gedriftete Virenstämme. Frühe klinische Studien zur Sicherheit und Immunogenität intranasaler oder oraler

## Influenzavirus



Im Influenzavirus kodieren 8 Gensegmente 11 Proteine. Dazu gehören Hämagglutinin und Neuraminidase, die als wichtigste antigene Determinanten gelten. Das Teilstück des Matrixproteins M2 ausserhalb der Virenhülle ist ebenfalls ein wichtiges Ziel für Antikörper. Daraus resultieren verschiedene Möglichkeiten zur adaptiven Immunabwehr:

- ❖ über das Hämagglutinin (HA) heftet sich das Influenzavirus an Rezeptoren auf der Wirtszelle. HA-Antikörper blockieren das Andocken bzw. die Fusion zwischen Virus und Wirtszellmembran und verhindern so eine Infektion.
- ❖ Antikörper gegen die Neuraminidase (NA) verhindern zwar nicht die Infektion, hemmen aber die Freisetzung neu gebildeter Viren aus den infizierten Wirtszellen. NA-Antikörper können somit die Schwere der Erkrankung mildern.
- ❖ Antikörper gegen die hoch konservierte extrazelluläre Domäne des M2-Protein-Epitops beeinträchtigen die virale Assemblierung oder hemmen den Protonentransport durch den M2-Ionenkanal. Zudem reagieren sie kreuzreaktiv mit verschiedenen Virensubtypen.
- ❖ das Ansprechen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf konservierte Influenzaproteine korreliert mit einer beschleunigten Entfernung virusinfizierter Zellen. In welchem Ausmass dies zu einer Abschwächung der Erkrankung beiträgt, ist heute nicht geklärt.

Abbildung: Adaptive Immunantworten (modifiziert nach Lambert et al.)

HA-Vakzine auf der Basis von Adenoviren wurden bereits mit ermutigenden Ergebnissen abgeschlossen.

### DNA-basierte Impfstoffe

Grippeimpfstoffe mit DNA-Sequenzen werden bereits seit mehr als 20 Jahren erforscht. In Tieren erzeugte eine Hämagglutinin- oder Neuraminidase-kodierende DNA bei intramuskulärer Injektion als Einzelimpfstoff oder in Kombination mit internen Gensegmenten eine Immunantwort gegenüber gedrifteten Influenzaviren. Obwohl diese DNA-Impfstoffe als Einzelvakzine bei Tieren zu vielversprechenden Resultaten geführt haben, sind die Ergebnisse aus klinischen Studien bis anhin nicht ermutigend.

### Universalimpfstoffe

Optimal wäre ein sicherer Impfstoff, der einen langfristigen Schutz gegenüber allen Virenstämmen gewährleistet und rasch in grossen Mengen unter gut kontrollierbaren Bedingungen hergestellt werden könnte. Die wichtigsten Zielstrukturen bei der Suche nach diesem universellen oder einem Multi-Epitop-Impfstoff sind die hoch konservierte externe Domäne des M2-Proteins sowie konservierte Epitope des Nukleoproteins (NP), des M1-Proteins und des HA-Proteins. Präklinische Studien haben gezeigt, dass diese Impfstoffkandidaten einzeln oder in Kombination mit Adjuvantien oder Trägerproteinen eine breit gefächerte kreuzreaktive Antikörperantwort hervorrufen. Einige dieser Vakzine werden derzeit klinisch getestet.

Der Optimismus, dass die Entwicklung eines Universalimpfstoffes gelingen könnte, basiert zum Teil auf neueren Ergebnissen mit zweistufigen Impfstrategien in Tiermodellen: Dabei wurde zunächst eine vorbereitende Impfung mit einem DNA-basierten HA-Impfstoff vorgenommen. Anschliessend wurde eine zweite Dosis verabreicht oder eine Auffrischung mit einem inaktivierten, einem attenuierten oder einem Vakzin auf der Basis eines adenoviralen Vektors vorgenommen. Mit dieser Vorgehensweise konnte die Erzeugung breit gefächert kreuzneutralisierender Antikörper erzielt werden. Ein wirklich universeller Impfstoff, der mit einer oder mehreren Impfungen einen lebenslangen Schutz gegen alle Influenzaviren gewährleistet, ist möglicherweise nicht erreichbar, aber einige Zieletappen sollten überdacht werden. So könnten periodische Impfungen mit einem Produkt angestrebt werden, das einige gängige immunogene Epitope exprimiert und über mehrere Jahre einen Schutz gegenüber gedrifteten und neuen pandemischen Virenstämmen bietet. ❖

### Petra Stöltzing

Quelle: Lambert Linda C, Fauci Anthony S: Influenza vaccines for the future, N Engl J Med 2010, 363, 2036–2044.

Interessenkonflikte: keine deklariert.