

Grippeimpfstoffe im Zeichen von Epidemie und Pandemie

Fieberhaft wird nach neuen Möglichkeiten gesucht, Influenza-Impfstoffe in hoher Ausbeute und kürzester Zeit zu produzieren. Denn nach wie vor schätzen Experten das Risiko für eine Influenza-Pandemie außergewöhnlich hoch ein. Das Ausmaß einer Pandemie wird nicht zuletzt davon abhängen, wie schnell ein wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht. Mit den derzeitigen Produktionsmethoden und -kapazitäten wird der Bedarf nicht zu decken sein. Hoffnungen ruhen auf neuen Verfahren.

Probleme der Impfstoffgewinnung und wie sie zu lösen sind

Von Ilse Zündorf und Theo Dingermann, Frankfurt

Zellkulturbasierte Impfstoffe oder die Nutzung molekularbiologischer Methoden könnten helfen, das Mengenproblem zu lösen.

za-Pandemie außergewöhnlich hoch ein. Das Ausmaß einer Pandemie wird nicht zuletzt davon abhängen, wie schnell ein wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht. Mit den derzeitigen Produktionsmethoden und -kapazitäten wird der Bedarf nicht zu decken sein. Hoffnungen ruhen auf neuen Verfahren.

„Für den Grippeimpfstoff XX können wir für die Saison 2006/2007 leider keine Aufträge mehr entgegen nehmen.“ – Das war die recht häufige Aussage, wenn Apotheker bei Großhändlern oder Firmen nach Influenza-Impfstoff nachfragten. Grund für diesen ablehnenden Bescheid war ein Produktionsengpass. Denn einer der von der WHO empfohlenen Virusstämme erwies sich als derart „virulent“ für die Hühnereier, in denen die Viren für die Herstellung der Antigene derzeit zugelassener Impfstoffe vermehrt werden, dass die Ausbeute wesentlich schlechter ausfiel als man dies erwartet hatte.

Das war schon eine kleine Katastrophe. Denn einerseits zeichnete sich für diese Saison auf der Basis der intensiven Diskussionen über die Bedrohungen durch eine möglicherweise bevorstehenden Pandemie eine deutlich höhere Impfbereitschaft in der Bevölkerung ab (was ausgesprochen positiv zu vermerken ist), andererseits mag man argwöhnen, dass die Grippesaison 2006/2007 deutlich heftiger ausfallen könnte, wenn man glaubt, in den Analysen der Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI) am Robert-Koch-Institut (<http://influenza.rki.de/>) eine gewisse Regelmäßigkeit ableiten zu können: Im zweijährigen Wechsel traten demnach stärkere und weniger starke Grippewellen auf (Abb. 1). Dies alles mag Zufall sein, und gewiss sind fünf Jahre bei weitem nicht ausreichend, um statistisch belastbare Aussage machen zu können. Andererseits ist mit großer Wahrscheinlichkeit die von der AGI ermittelte „Stärke“ der einzelnen Grippewellen wohl dadurch verwässert, dass nicht jeder Grippepatient einen Arzt

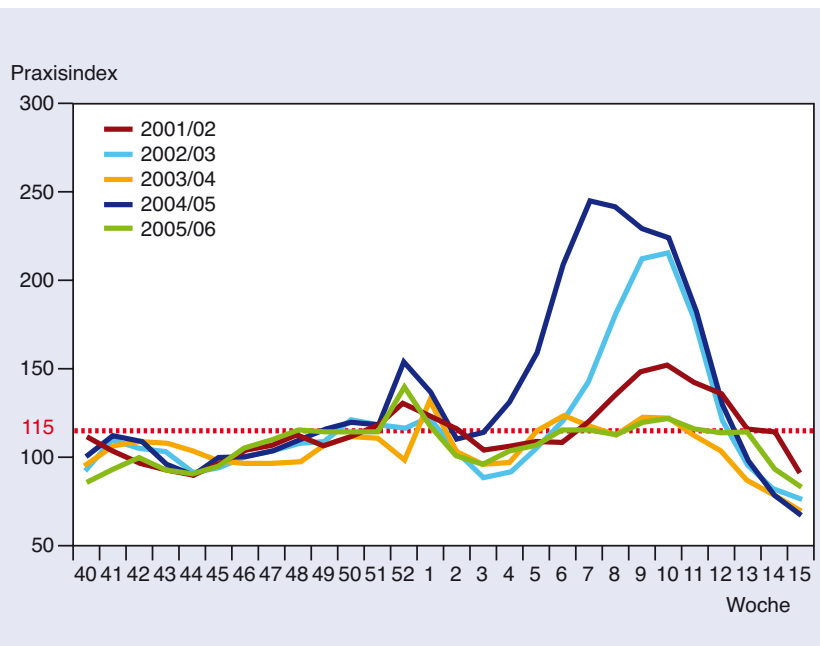


ABB. 1: VERGLEICH DER PRAXISINDICES DER GRIPPE-SAISONEN SEIT 2001

Der Praxisindex stellt die über alle Referenz-Praxen gemittelte relative Abweichung der beobachteten akuten respiratorischen Erkrankungen (ARE) gegenüber einem für jede Praxis ermittelten „Normalniveau“ dar. Unterschiede, die durch Praxisspezialisierung (Pädiater, Internisten, Allgemeinärzte), Praxisgröße, etc. verursacht sind, werden dadurch reduziert und räumliche Vergleiche unterstützt. Eine normale ARE-Aktivität (Hintergrund) wird beim Praxisindex bis zu Werten von 115 angenommen. Um Weihnachten und den Jahreswechsel herum können die regionenspezifischen Kurven etwas überzeichnet sein, da der Praxisindex in diesem Zeitraum auch ohne Veränderung der Morbidität etwas ansteigt.

Einteilung der Erkrankungsaktivität: nicht erhöht: Praxisindex \leq 115; geringfügig erhöht: Praxisindex = 116-135; moderat erhöht: Praxisindex = 136-155; deutlich erhöht: Praxisindex = 156-180; stark erhöht: Praxisindex $>$ 180. Quelle: Arbeitsgemeinschaft Influenza am Robert-Koch-Institut (<http://influenza.rki.de/>)

aufsucht und somit vom RKI statistisch nicht erfasst wird. Dennoch ist das seit dem 1. Januar 2001 installierte Surveillance-System von so großer Wichtigkeit, dass eine Meldepflicht für jede diagnostizierte Influenza-Infektion auf der Basis des Infektionsschutzgesetz (IfSG) veranlasst wurde. Denn hierbei geht es nicht nur um Dokumentation. Vielmehr soll dieses Surveillance-System frühzeitig eine auftretende Epidemie anzeigen und die Influenza-Virusstämme identifizieren helfen, die während der Saison kursieren. Die AGI beobachtet und dokumentiert die Infektionshäufigkeiten in Deutschland von der 40. bis zur 15. Kalenderwoche des folgenden Jahres und leitet die Daten dann auch an das European Influenza Surveillance Scheme (EISS, www.eiss.org) weiter. Diese Informationen bilden dann u.a. auch die Basis für die WHO-Empfehlung für die Zusammensetzung des Impfstoffes der Folgesaison. In dieser Saison sind Influenza-Impfstoffe wie folgt zusammengesetzt:

- eine A/New Caledonia/20/99 (H1N1) Variante
- eine A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) Variante
- eine B/Malaysia/2506/2004 Variante

Immer wieder Produktionsprobleme

Die H3N2-Variante war es, die in diesem Jahr die geschilderten Probleme bei der Impfstoff-Produktion verursachte. Derartige Engpässe sind nicht so selten. So kam es vor wenigen Jahren in den USA infolge einer Kontamination in einem Produktionsansatz ebenfalls zu einer erheblichen Versorgungslücke. Eigentlich können wir uns derartige Produktionsprobleme gar nicht leisten. Dies um so weniger, als nach wie vor eine reale Chance einer Pandemie besteht, für die dann alleine in Deutschland annähernd 80 Millionen Impfdosen benötigt würden statt der derzeit üblichen 20 bis 25 Millionen Dosen für die saisonale Influenza.

Legt man globale Maßstäbe an,

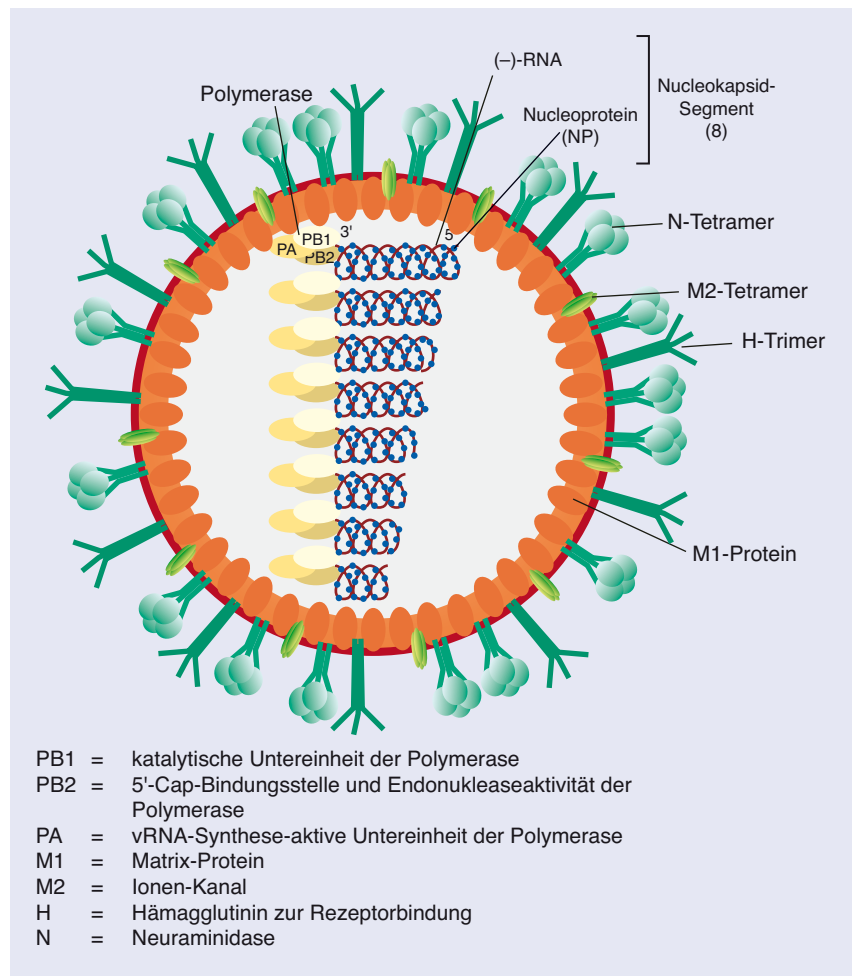


ABB. 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INFLUENZA-A-VIRUS. Influenza-Viren sind von einer Membran umhüllt, in die spezifische Proteine eingelagert sind, wie z.B. das Hämagglutinin-Trimer oder das Neuraminidase-Tetramer. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das segmentierte, einzelsträngige RNA-Genom in (-)-Orientierung, d.h. die viralen RNA-Moleküle müssen in der Wirtszelle zunächst in komplementäre RNAs umgeschrieben werden, die dann als mRNAs für die Bildung der virus-codierten Proteine dienen. Diese erste Abschrift wird allerdings auch als Matrize für die Herstellung neuer RNA-Segmente verwendet, die beim Zusammenbau neuer Virus-Partikel verpackt werden. Das Umschreiben der RNAs bewerkstelligen die recht fehlerhaft arbeitenden Proteine PA, PB1 und PB2.

so wird das Bild noch bedrohlicher: Derzeit stellen weltweit 37 Firmen in 18 Ländern ca. 350 Milliarden Dosen trivalenter Influenza-Impfstoffe her. Die meisten Produktionsstätten liegen in Nordamerika, Europa und Australien, wo auch die derzeit größte Nachfrage nach Impfdosen besteht.

Bedarf im Pandemiefall kaum zu decken

Im Pandemiefall wären aber deutlich mehr Impfdosen in weit mehr Ländern erforderlich, deren Bedarf kurzfristig kaum zu decken wäre.

Ein Weg hin zur Lösung dieses Problems wäre eine höhere Durchimpfungsrates für die saisonale Grippe. Alleine aus diesem Grund strebt die WHO für die saisonale Influenza bis zum Jahr 2010 eine Durchimpfungsrates von 60 % an.

Das Virus

Die Influenzaviren gehören zu den Orthomyxoviren und lassen sich prinzipiell in drei Typen einteilen: Influenza A, B und C. Allerdings sind für die normale Grippe nur die Influenza-A- und -B-Viren verantwortlich. Beide Virustypen sind dadurch charak-

terisiert, dass sie ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom tragen. Sie sind von einer Hüllmembran umgeben, in die die viruskodierten, glycosylierten Oberflächenproteine Hämagglutinin (abgekürzt HA oder H) und Neuraminidase (abgekürzt NA oder N) eingelagert sind (Abb. 2).

Das trimere Hämagglutinin ist für die Bindung des Viruspartikels an N-Acetylneuraminsäure-Moleküle auf der Oberfläche von Wirtszellen verantwortlich. Dazu muss das HA-Vorläuferprotein durch eine trypsinähnliche Furin-Protease in die beiden Teile HA1 und HA2 geschnitten werden, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Erst durch diese

Spaltung wird die so genannte fusogene Region freigelegt, die die Bindung an die N-Acetylneuraminsäure vermittelt (Abb.3).

Oseltamivir und Zanamivir verhindern Reifung

Die tetramere virale Neuraminidase spaltet dagegen endständige N-Acetylneuraminsäurereste ab und kommt bei der Freisetzung und Reifung neu gebildeter Viren zum Einsatz. Die beiden Wirkstoffe Oseltamivir und Zanamivir inhibieren die Neuraminidase und verhindern dadurch die Reifung neuer Viruspartikel. Für Influenza-A-Viren sind bisher 16 verschiedene Hämagglutinin- (H1 bis H16) und 9

Neuraminidase-Subtypen (N1 bis N9) identifiziert worden. Beide Oberflächenproteine sind für die Induktion neutralisierender Antikörper im menschlichen Immunsystem verantwortlich und dienen zudem der Virusspezifisierung (z.B. H1N1, H3N2 oder H5N1).

Viren mit breitem Wirtsspektrum

Verglichen mit anderen Viren haben Influenza-Viren ein relativ breites Wirtsspektrum, indem sie prinzipiell nicht nur verschiedene Säugetiere sondern auch Vögel infizieren können. Dabei diskriminiert der jeweilige Hämagglutinin-Subtyp zwischen den spezifischen Verzweigungsmustern der Oligosaccharide auf der Membran einer potentiellen Wirtszelle (Abb. 4). So bindet z.B. der Hämagglutinin-Subtyp H5 überwiegend an Vogelzellen und weniger gut bis gar nicht an menschliche Zellen. Untersuchungen an Grippe-Patienten deuten darauf hin, dass beim Menschen bisher nur Influenza-A-Viren mit den Hämagglutinin-Subtypen H1, H2 und H3 in Kombination mit den NA-Subtypen N1 und N2 Pandemien verursacht haben (Abb. 5). Bedingt durch die Art den besonderen Charakter des Genoms der Influenza-Viren kommt es allerdings sehr häufig zu Veränderungen dieser Viren. Für die Vermehrung der acht Segmente muss die RNA durch eine so genannte RNA-abhängige RNA-Polymerase wieder in RNA umgeschrieben werden. Diese RNA-Kopien dienen einerseits als mRNA für die Bildung der viralen Proteine. Sie dienen aber auch als Matrize zur Synthese neuer genomischer RNA-Fragmente, die in neue Viruspartikel verpackt werden.

PB1,PB2, PA: hohe Fehlerrate

Bei den Influenza-Viren übernehmen die Proteine PB1, PB2 und PA die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Diese arbeiten erstaunlich unzuverlässig und bauen mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-5} falsche

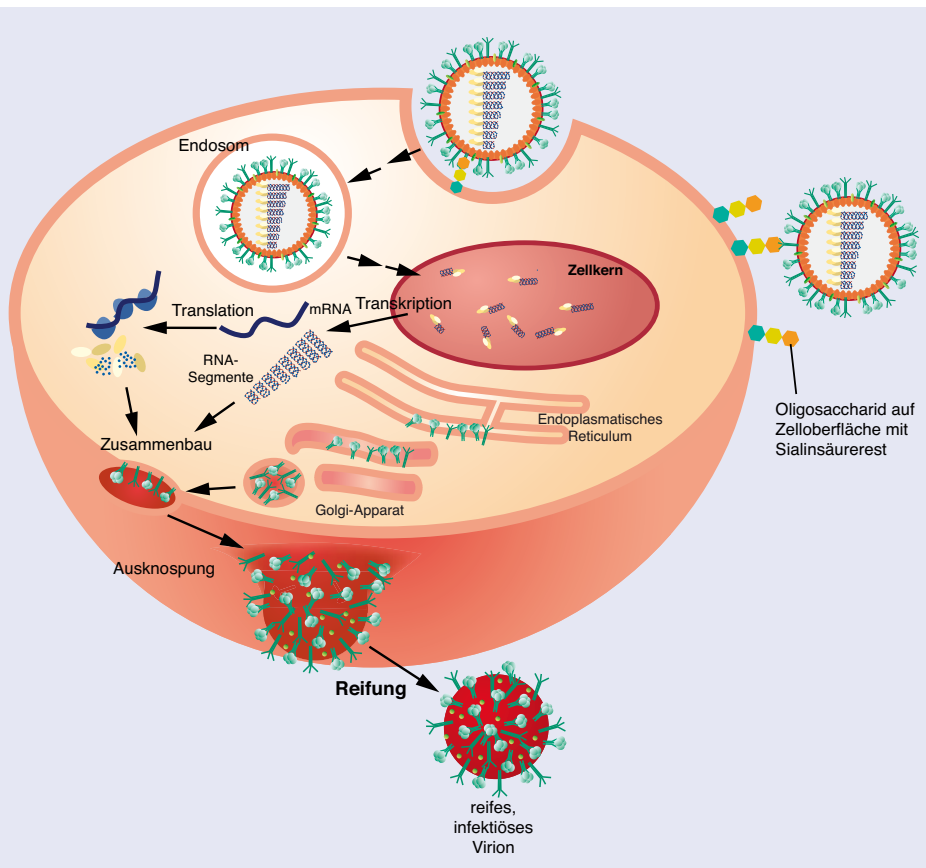


ABB.3: INFEKTIONSZYKLUS EINES INFLUENZA-VIRUS Über das Hämagglutinin auf der Oberfläche bindet das Virus mit hoher Affinität an Sialinsäurereste der Glykoproteine und Glykolipide auf den Zielzellen. Das Virus wird dann in Endosomen aufgenommen und induziert dort über seinen M_2 -Ionenkanal einen Ioneneinstrom in das Endosom, wodurch das weitere Ansäuern des Endosomenmilieus gestoppt wird. Dadurch öffnet sich das Partikel, die fusogene Region des Hämagglutinins gelangt an die Endosomenmembran und die Ribonukleoproteine des Virus erreichen zunächst das Cytoplasma und werden dann in den Kern der infizierten Zelle transportiert, wo die virale RNA-Synthese initiiert wird. Im Cytoplasma werden virale RNAs in Proteine translatiert und teilweise im endoplasmatischen Retikulum glykosyliert. Einige der neu synthetisierten Proteine binden an die virale RNAs, die als Genomsegmente fungieren, und bilden gemeinsam ribonukleäre Partikel (RNPs). An der Zellmembran werden neue Viren assembliert, die dann durch Exozytose ausgeschleust werden.

Basen in die sich neu bildenden RNA-Stränge ein. Zum Vergleich: In unseren Zellen liegt die spontane Fehlerrate bei der Replikation der DNA bei 10^{-9} bis 10^{-10} . Durch die im Vergleich hierzu extrem fehlerhafte Weitergabe der genetischen Information an die „Nachkommen“-Viren durch die virale Polymerase kommt es zu einer hohen Frequenz von Punktmutationen und damit zu ständigen Veränderungen der antigenen Proteinbereiche. Wir bezeichnen dieses Phänomen als antigenic drift.

Gedriftete Population noch erfolgreich zu bekämpfen

Man kann allerdings davon ausgehen, dass ein durch eine Impfung oder einen grippalen Infekt entsprechend aktiviertes Immunsystem auch eine „gedriftete“ Viruspopulation noch erfolgreich bekämpfen kann. Allerdings hält dieses Abwehrpotential nicht beliebig lange an, so dass die WHO auf den antigenic drift dahingehend reagiert, dass sie alljährlich die Antigenzusammensetzung der Impfstoffe an die aktuellen Virus-Charakteristika anpasst.

Dramatischer: Antigenic shift

Wesentlich dramatischer sind die Variationen von Influenza-Viren jedoch beim antigenic shift. Diese Veränderungen kommen dadurch zustande, dass zufällig zwei unterschiedliche Virus-Subtypen dieselbe Wirtszelle infizieren. Bei der Verpackung neuer Virus-Partikel werden dann willkürlich RNA-Segmente des einen Subtyps mit denen des anderen Subtyps vermischt. Das Resultat sind Reassortanten – völlig neue Virustypen mit u.a. drastisch unterschiedlichen Eigenschaften.

Was alte Pandemien verraten ...

Mittlerweile ist es gelungen, die Influenza-Viren der letzten großen Pandemien zu rekonstruieren. Dabei hat man gesehen, dass immer wieder RNA-Fragmente zwischen aviären und humanen

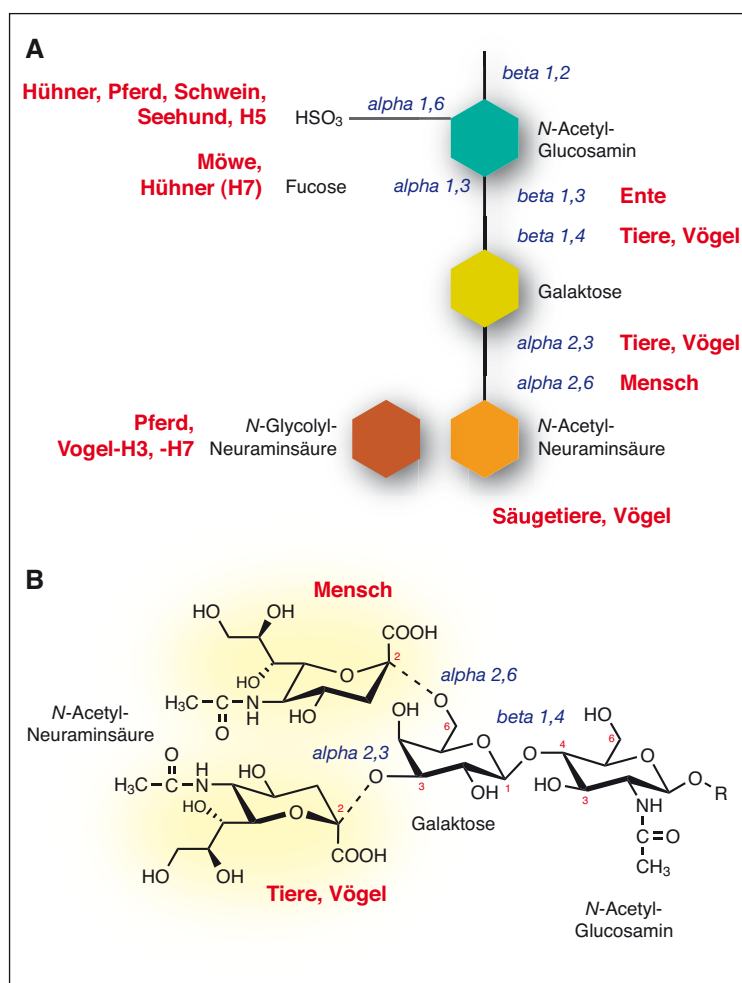


ABB. 4: WIRTS-SPEZIFITÄT DER INFLUENZA-A-VIREN Das Hämagglutinin in der Virus-Hülle erkennt die Wirtszelle über Sialinsäure-Reste auf der Zelloberfläche. Dabei können die unterschiedlichen Hämagglutinin-Subtypen die spezifischen Verzweigungsarten der Oligosaccharide auf den Zellen von potenziellen Wirten unterscheiden. So binden z.B. Influenza-A-Viren, die Vögel infizieren, bevorzugt 2,3-verbundene Galaktose-N-Acetyl-Neuraminsäure-Dimere und können nicht oder nur sehr schlecht an human-spezifische 2,6-verbundene Zucker andocken. A: Schematische Darstellung der verschiedenen Verzweigungsmuster und Erkennung durch die entsprechenden Virus-Subtypen. B: Genauere Gegenüberstellung der Unterschiede in der Zuckerkette bei Vögeln und Menschen.

Influenza-Viren ausgetauscht wurden. Die neu entstandenen Kombinationen H1N1, H2N2 und H3N2 waren zunächst Auslöser der Pandemien, um anschließend für unterschiedlich lange Zeiträume als inter pandemische Viren weiter zu zirkulieren. Genau dieser Mechanismus wird auch im Zusammenhang mit der Vogelgrippe gefürchtet: Treffen H5N1-Viren bei einer starken saisonalen Influenza-Epidemie auf z.B. H3N2, dann erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines antigenic shifts, und es entstehen Reassortanten, die sich so dramatisch von den ursprüng-

lichen Viren unterscheiden, dass selbst ein trainiertes Immunsystem einer Infektion wenig oder nichts entgegenhalten kann. Influenza-B-Viren sind im Vergleich dazu „harmlos“: Sie weisen keine vergleichbare HA- und NA-Subtypenvarianz auf, beschränken sich auf ein erheblich kleineres Wirtsspektrum und haben kein pandemisches Potenzial.

Klassische Impfstoffe

1933 wurden die Influenza-Viren entdeckt, und bereits kurz danach begannen vor allem

amerikanische Militärforschungseinrichtungen mit der Entwicklung eines Impfstoffes. Die Virusvermehrung erfolgte bereits damals in embryonierten Hühnereiern. Hierzu wird das Saat-Virus – eventuell gemischt mit Gentamicin-Sulfat und Hydrocortison – in das 9 bis 11 Tage alte Ei injiziert und vermehrt sich mit dem Wachstum des Hühnerembryo. Nach zwei bis vier Tagen Inkubation bei einer für den Virusstamm spezifischen Temperatur werden die Hühnerembryos durch Kälte abgetötet, und die virushaltige Allantoisflüssigkeit, das Eiklar, geerntet. Zur weiteren Aufbereitung wird die Allantoisflüssigkeit in einer ersten Zentrifugation geklärt und die Viren aus dem Überstand an CaHPO_4 adsorbiert. Durch Zugabe von EDTA-Na_2 -Lösung können die Viren wieder solubilisiert und filtriert werden.

Nach einer isopyknischen Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten und Sterilfiltration erhält man das monovalente Ganz-Virus-Konzentrat, das durch Behandlung mit Formaldehyd über mindestens drei Tage inaktiviert wird. Bereits in den frühen 1950er Jahren standen die ersten kommerziell erhältlichen Influenza-Impfstoffe zur Verfügung, die jedoch aus recht grob gereinigten Impfviren bestanden und entsprechend reaktogen waren. Seitdem wurden Herstellungsprozesse und Aufreinigungsverfahren weiter optimiert, so dass mittlerweile drei Impfstoff-Arten zur Verfügung stehen:

- attenuierte Ganzvirus-Vakzine, die jedoch sehr reaktogen sind und deswegen meist ersetzt werden durch
- Spaltvakzine, für die die getrennten Viren mit Formalde-

hyd oder β -Propiolacton inaktiviert und mit einem nicht-ionischen Detergens gespalten werden, oder durch

- Subunit-Vakzine, die in erster Linie aufgereinigtes Hämagglutinin und aufgereinigte Neuraminidase enthalten.

Pandemie: lebend-attenuierter Impfstoff favorisiert

Für einen Pandemie-Impfstoff wird trotz mancher Sicherheitsbedenken über die Verwendung lebend-attenuierter Viren z.B. auf Basis des Kälte-adaptierten Stammes A/Ann Arbor/6/60 nachgedacht, sind sie doch deutlich immunogener und führen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu einem sicheren Infektionsschutz.

Vorteil: nasale Applikation

Zudem lässt sich dieser Impfstoff als Nasalspray sehr leicht und schnell in einem Massenverfahren applizieren. Etablierte und beispielsweise in den USA (FluMist™) zugelassene lebend-attenuierte Influenza-Impfstoffe bestehen aus Reassortanten aus einem Kälte-adaptierten Virus-Subtyp und den jeweiligen epidemischen Virusstämmen. Diese Reassortanten werden nasal appliziert, wo sie sich im kalten Milieu gut vermehren können. Im tieferen, wärmeren Respirationstrakt ist dagegen die Vermehrung eingeschränkt, so dass es nicht zur Erkrankung kommt. Die durch die Nasenschleimhaut aufgenommene Virusmenge reicht aus, um das Immunsystem effektiv zu stimulieren.

Auch die Influenza-A-Saat-Viren für die Herstellung saisonal empfohlener Spaltimpfstoffe sind Reassortanten (Abb. 6). Um diese Saat-Viren zu generieren wird das saisonal prävalente Virus zusammen mit dem Laborstamm A/PR/8/34 (abgekürzt PR8) in embryonierte Hühnereier injiziert. Der PR8-Stamm sorgt zum einen für eine hohe Ausbeute. Zum anderen wurde er attenuiert, indem dieses Virus jeweils mehr als 100 Mal in Mäusen, Frettchen und embryonierten Hühnereiern passagiert

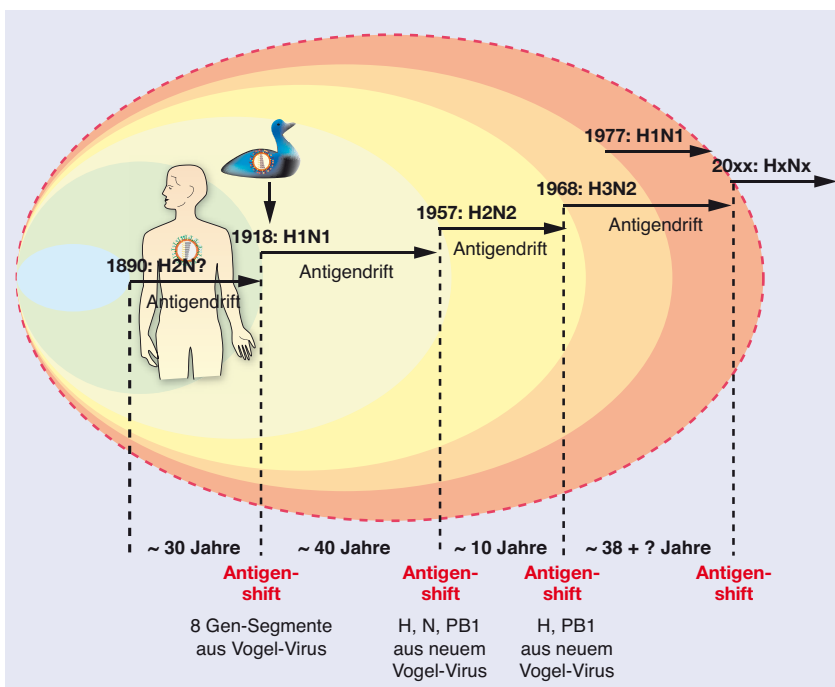


ABB. 5: ENTWICKLUNG DER PANDEMIE-VIREN Nach bisherigen Untersuchungen an Grippe-Patienten haben nur Influenza-A-Viren mit den Hämagglutinin-Subtypen H1, H2 und H3 in Kombination mit den Neuraminidase-Subtypen N1 und N2 Pandemien verursacht. Die „Spanische Grippe“ von 1918 wurde durch die eine Influenza-Variante ausgelöst, die alle 8 Segmente eines aviären H1N1-Virus enthielt und so auf den Menschen übertragen wurde. Danach persistierte dieser H1N1-Typ als inter pandemisches Virus in der Bevölkerung, bevor eine neuer Shift zu einem H2N2-Virus führte, das außerdem noch das PB1-Segment eines aviären Virus aufgenommen hatte. Dieses neue H2N2-Pandemie-Virus war der Auslöser der Asiatischen Grippe. Bei der Hong-Kong-Grippe im Jahre 1968 reassortierte das inzwischen wieder inter pandemische H2N2-Virus mit einem aviären H3-Virus zur neuen Kombination H3N2, ebenfalls unter Aufnahme eines aviären PB1-Segmentes. Ein neues Pandemievirus könnte sich nun wiederum durch ein Reassortement zwischen H3N2 und einem spezifischen Vogel-Virus bilden.

wurde und danach nicht mehr in der Lage war, sich in Menschen zu replizieren.

Probleme mit Influenza-Saat-Viren

Gesucht wird dann nach Viren, die Genomfragmente für HA und NA des saisonal prävalenten Virus und die übrigen 6 RNA-Segmente des PR8-Stammes enthalten, so genannte 6 + 2 Reassortanten, die üblicherweise mit guter Ausbeute in Hühnereiern vermehrt werden können. Dass dies nicht immer der Fall ist, hat man mit der H2N3-Varianten in diesem Jahr erfahren müssen. Die neuen 6 + 2 Reassortanten müssen in jedem Fall mehrmals in embryonierten Hühnereiern passagiert werden, um das Wachstum weiter zu optimieren.

Jede Impfdosis enthält ca. 45 µg HA, wobei von jedem Virus-Subtyp 15 µg HA eingesetzt werden. Pro Impfdosis wird ein Hühnerei benötigt, was ein immenses logistisches Problem ist, da die Eier aus streng kontrollierten Hühnerherden (so genannte SPF-Herden) steril gehalten werden und zu einem bestimmten Zeitpunkt abrufbar sein müssen.

Mit Adjuvanzen Antigenmenge reduzieren?

Die derzeit gängigen Impfstoffe enthalten keine Adjuvanzen. Überlegungen gehen dahin, dass bei Zugabe eines geeigneten Adjuvans die Antigenmenge eventuell auf 20 % oder sogar 10 % der Ausgangsmenge reduziert werden könnte. Eingesetzt werden könnten Aluminiumsalze oder die Öl-in-Wasser-Emulsion MF59C.1, die sich bereits bei anderen Impfstoffen bewährt haben. Weitere derzeit im Test befindliche Adjuvanzen sind Liposomen-ähnliche Präparationen, die auch Cholesterin und virale Partikel enthalten, synthetisches Lipid A zur subkutanen oder intranasalen Applikation oder Muramyl-Peptid-Derivate. Dass man bezüglich Adjuvanzen sehr vorsichtig sein muss, zeigte der Versuch, hitzelabiles Escherichia-coli-Toxin als Im-

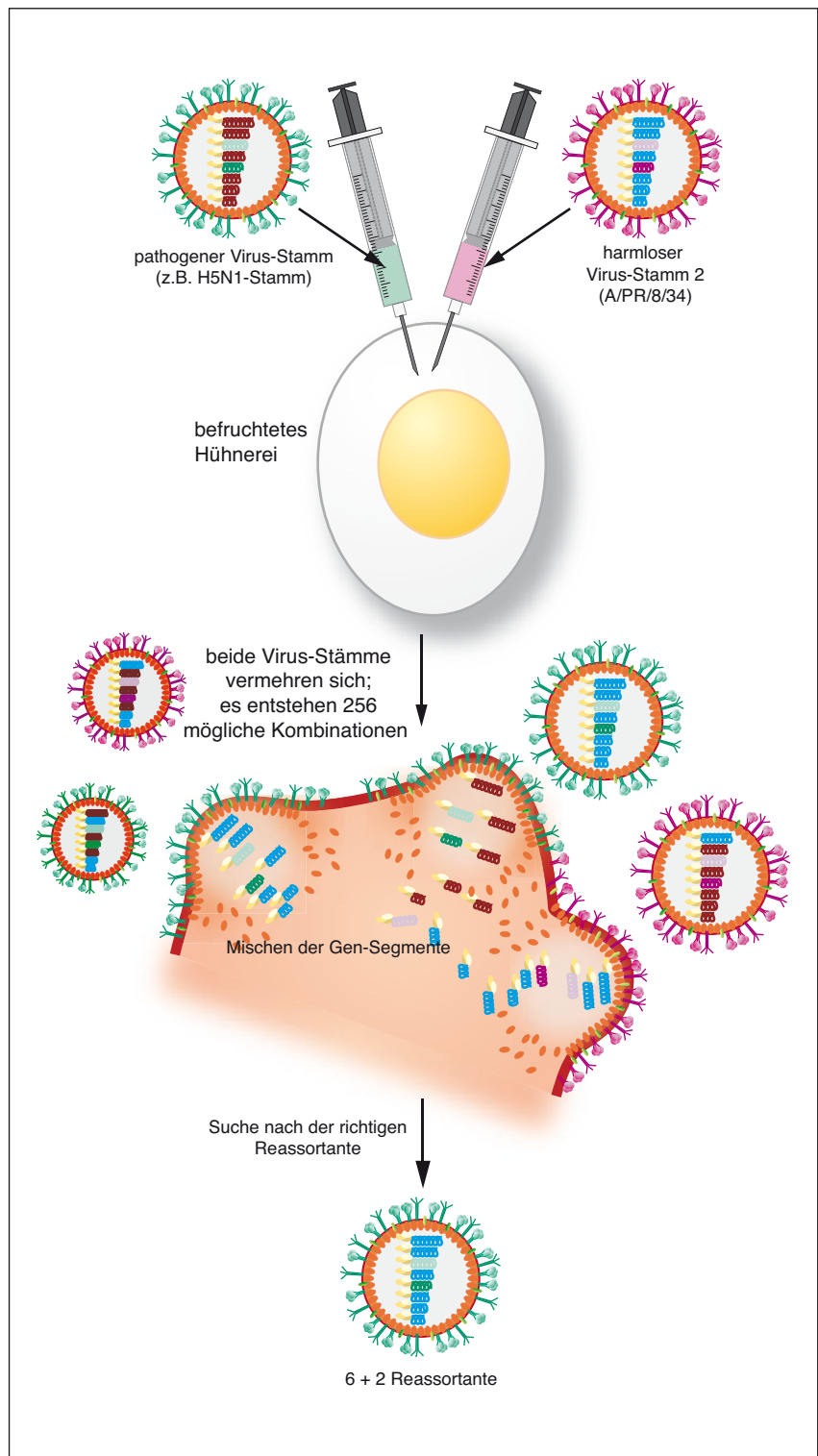


ABB. 6: GENERIERUNG DES INFLUENZA-A-SAAT-VIRUS DURCH REASSORTMENT Sobald die Empfehlung für die Impfstoffzusammensetzung der kommenden Saison veröffentlicht ist, wird das jeweilige, prävalente Virus zusammen mit dem attenuierten Laborstamm A/PR/8/34 (abgekürzt PR8) in embryonierten Hühnereiern injiziert. Durch diese Doppelinfektion entstehen rein rechnerisch 256 mögliche Reassortanten. Aus diesem Pool müssen über geeignete Screening-Verfahren die so genannten 6 + 2 Reassortanten isoliert werden. Das sind die Virus-Partikel, die RNA-Segmente für Hämagglutinin und Neuraminidase vom saisonal prävalenten Virus-Subtyp erhalten haben, die übrigen 6 Segmente stammen dagegen vom Laborstamm PR8. Diese neue Reassortante wird anschließend noch mehrmals in embryonierten Hühnereiern passagiert, um die Virus-Vermehrung weiter zu optimieren.

munpotenziator mit virosomalem Virus-Impfstoff als Nasenspray zu formulieren. Im Vergleich zum herkömmlichen, intramuskulär verabreichten Impfstoff erhöhte sich das Risiko einer Lähmung des Gesichtsnervs signifikant, weshalb der Impfstoff in Deutschland nicht zugelassen wurde.

Zellkultur-basierte Impfstoffe

Als Alternative für die Virusvermehrung in angebrüteten Hühneriern wird mit Hochdruck daran gearbeitet, Zellkultursysteme für die Virusgewinnung zu etablieren. Sie wären effizienter und auch besser zu kontrollieren. Für die Züchtung von Influenza-Viren werden derzeit drei unterschiedliche Zelllinien verwendet und getestet: Vero-Zellen, MDCK-Zellen und Per.C6-Zellen.

Neben ihrer vermeintlich besseren Effizienz und Kontrollierbarkeit sind die genannten Zellkulturen hinsichtlich ihrer Membrancharakteristika menschlichen Zellen ähnlicher als Hühnerembryos. Bei einer Vermehrung in Hühneriern kann es zu einer Selektion von Viren kommen, die bevorzugt aviäre, aber weniger gut menschliche Zellen infizieren, so dass das daraus isolierte Hämagglutinin nur einen unzureichenden Immunschutz induziert: Viren aus Hühneriern zeigen eine hohe Affinität und Spezifität für $\alpha 2,3$ -Sialinsäure-Galaktose-Bindungen, während humane Viren besser $\alpha 2,6$ -Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfungen erkennen.

Zellkulturen für die Produktion von Impfstoffen müssen umfangreich getestet werden:

- Die Master-Zellbank darf nicht tumorigen sein, darf keine infektiösen fremden Agenzien enthalten und muss genetisch stabil sein.
- Die jeweilige Arbeitszellbank muss standardmäßig daraufhin untersucht werden, dass weder Mycoplasmen, noch sonstige Bakterien oder Pilze oder andere Fremdstoffe enthalten sind.

Das ganze Set der durchzuführenden Prüfungen und erforderlichen Nachweise ist in der Eu-

ropäischen Pharmakopö nachzulesen.

Vero-Zellen

Vero-Zellen sind adhärent wachsende Nierenzellen aus *Cercopithecus aethiops* (Afrikanische Grüne Meerkatze).

Üblicherweise werden die Zellen in Rührtank-Fermentern mit Microcarriern gezüchtet, wobei Kulturvolumina bis zu 6000 L erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Vero-Zellen nicht nur für Influenza-Viren als Wirtszellen verwendet werden können, sondern z.B. auch für das Hepatitis-A-Virus, das Japanische Encephalitis-Virus, das West-Nil-Virus, das Vaccinia-Virus und das SARS-Coronavirus. Vero-Zellen weisen auf ihrer Oberfläche sowohl $\alpha 2,3$ -Sialinsäure-Galaktose- als auch $\alpha 2,6$ -Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfungen auf, so dass in diesen Zellen keine Selektion der Influenza-Viren hin zu einer besseren Erkennung der $\alpha 2,3$ -Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfung erfolgt. Die Firma Baxter stellt in Tschechien in einer Fabrik der Sicherheitsstufe L3 einen monovalenten H5N1-präparierten Impfstoff in serumfrei gezüchteten Vero-Zellen her. Für die Reifung der Viren muss Trypsin zum Kulturmedium gegeben werden. Allerdings sind die Vero-Zellen in der Lage, das recht häufig verwendete bovine, rekombinante Trypsin relativ schnell zu inaktivieren, weshalb Trypsin wiederholt in hohen Konzentrationen an mehreren aufeinander folgenden Tagen zugesetzt werden muss.

Zur Inaktivierung werden die Viren sowohl mit Formalin als auch mit UV-Strahlen behandelt, um nicht nur die Proteine zu denaturieren, sondern auch die virale RNA zu zerstören. Die resultierenden Impfdosen enthalten zwischen 3,75 und 30 μg Hämagglutinin und werden gegebenenfalls mit 0,2 % Aluminiumhydroxid als Adjuvans versetzt.

Im Sommer 2006 liefen in Österreich und Singapur Phase-I- und Phase-II-Studien mit insgesamt 270 Studienteilnehmern, die im Abstand von 21 Tagen 2 Dosen

entweder 3,5 μg adjuvierten, 7,5 μg adjuvierten oder nicht-adjuvierten, 15 μg adjuvierten oder nicht-adjuvierten oder 30 μg adjuvierten Hämagglutinin-Impfstoff basierend auf dem H5N1-Stamm A/Vietnam/1203/2004 erhielten. Erste Studienergebnisse zeigten, dass der Impfstoff gut vertragen wird und nicht zu mehr unerwünschten Wirkungen führt, als der saisonale Influenza-Impfstoff. Darüber hinaus war sogar die 3,5- μg -Dosis ausreichend immunogen, um eine neutralisierende Immunantwort zu induzieren, die auch gegen sehr unterschiedliche H5N1-Stämme – darunter Hongkong/156/97 und Indonesien/05/05 – kreuzreagierte.

MDCK-Zellen

Madin-Darby canine kidney (MDCK-) Zellen sind Epithelzellen, die 1958 aus der Niere eines gesunden Hundes isoliert wurden und die als adhären wachsende Zellen kultiviert werden können. Durch Propagierung der Zellen in Rollerflaschen bei einer Umdrehungszahl von 16 rpm statt der für adhären Zellen üblichen 3 rpm konnte die MDCK-33016-Zelllinie gewonnen werden, die zwischenzeitlich so adaptiert ist, dass sie als Suspensionskultur in serumfreiem Medium wächst.

MDCK-Zellen werden im Batch- oder Perfusions-Verfahren in mehr als 2000 L Volumen gezüchtet und mit dem Influenza-Saatvirus infiziert. Gleichzeitig mit der Infektion wird der Kultur Trypsin zugesetzt, um die Hämagglutinin-Vorstufe zu spalten und so einen erneuten Infektionszyklus zu ermöglichen. Interessanterweise hat sich eine Temperatur von 33°C als optimal erwiesen, da bei 37°C zwar eine höhere Virus-Ausbeute erzielt werden kann, die so erhaltenen Viren aber weniger immunogen wirken als die Viren aus der 33°C-Kultur. Nach 3 bis 7 Tagen können die Viruspartikel aus dem Überstand gewonnen und weiter aufbereitet werden. MDCK-Zellen weisen, ähnlich wie Vero-Zellen, auf ihrer Ober-



fläche sowohl α 2,3-Sialinsäure-Galaktose- als auch α 2,6-Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfungen auf, so dass in diesen Zellen keine Selektion der Influenza-Viren hin zu einer besseren Erkennung der α 2,3-Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfung erfolgt.

Insgesamt dauert die Produktion eines trivalenten saisonalen Impfstoffes, der auf Basis von MDCK-Zellen hergestellt wurde, rund 16 Wochen. Die Firma Novartis Behring hat diese Zelllinie bereits mit zahlreichen Virusvarianten getestet und für die Produktion eines Influenza-Impfstoffes für klinische Studien verwendet.

In Deutschland wurde eine ca. achtwöchige kontrollierte, für den Untersucher verblindete sequenzielle Phase-I/II-Studie mit diesem Zellkultur-basierten Impfstoff durchgeführt. Dabei wurde die Verträglichkeit im Vergleich zu einer konventionellen, Ei-basierten Influenza-Subunit-Vakzine getestet. In die Studie eingeschlossen waren Erwachsenen im Alter von 18-60 Jahren und Probanden mit einem Alter \geq 61 Jahre. Beide Impfstoffe wurden ähnlich gut vertragen, und beide Impfstoffe erwiesen sich in beiden Altersgruppen vergleichbar immunogen.

Eine in Polen durchgeführte Phase-III-Studie mit einer größeren Gruppe von Erwachsenen (1300) und älteren Studienteilnehmern (1354) bewies ebenfalls die gute Immunogenität der Zellkultur-Vakzine. Ferner zeigte eine Phase-III-Studie an 1200 Erwachsenen (18 bis 60 Jahre alt), bei drei unterschiedlichen Chargen des Zellkultur-basierten Impfstoffes und ein konventionell hergestellter Impfstoff vergleichend getestet wurden, dass die Zellkultur-Vakzine eine gleichmäßige Immunogenität besitzt.

Alle Studienergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellkultur-Grippevakzine ebenso gut vertragen wird und ähnlich immunogen ist wie die Ei-basierte Influenza-Vakzine. Genauere Informationen über das konkrete Herstellungsverfahren des in den klinischen Studien eingesetzten Impfstoffes waren nicht erhältlich.

In den Niederlanden ist seit 2003 der MDCK-basierte Influenza-

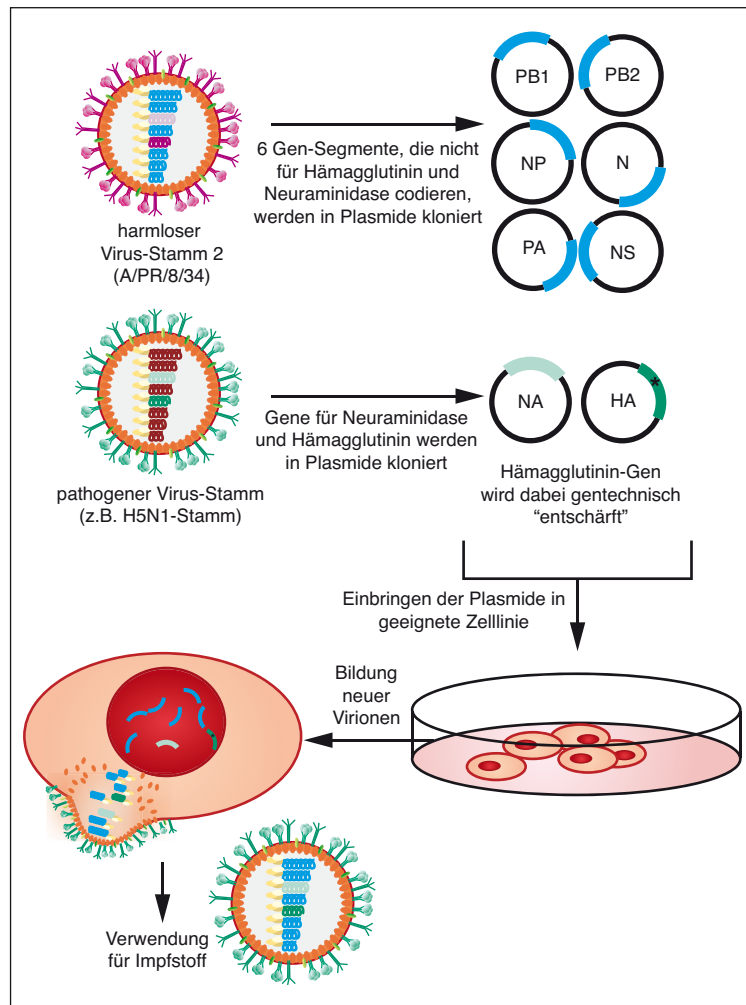


ABB. 7: GENERIERUNG EINES INFLUENZA-A-SAAT-VIRUS DURCH REVERSE GENETIK Das patentierte Verfahren beruht darauf, dass die 6 Segmente des PR8-Virus-Stammes, die nicht für Neuraminidase oder Hämagglutinin codieren, in DNA umgeschrieben und in Plasmide kloniert werden. Sobald das saisonal prävalente Virus identifiziert ist, werden daraus die Neuraminidase- und Hämagglutinin-Segmente isoliert und die davon generierten DNAs ebenfalls in Plasmide eingesetzt. Die so entstandene Sammlung von 8 Plasmiden wird in geeignete Zellen transfiziert, die anschließend infektiöse Virus-Partikel des 6 + 2 Typs bilden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der schnellen Generierung eines Saat-Virus, da die PR8-Gensegmente bereits kloniert vorliegen und nur jeweils die aktuellen Neuraminidase- und Hämagglutinin-Plasmide hergestellt werden müssen. Darüber hinaus entfällt die mühsame Suche nach der richtigen Reassortante.

enza-Impfstoff Inluvac® TC zugelassen, allerdings noch nicht auf dem Markt, da die Firma Solvay Pharmaceuticals ihre L3-Produktionsanlage in Weesp noch nicht fertig gestellt hat. Die MDCK-Zellen, die hierfür verwendet werden, können ebenfalls serumfrei – allerdings adhären – wachsen.

Per.C6-Zellen

Die niederländische Firma Cru-cell in Leiden hat sich ein Ver-

fahren patentieren lassen (EP 1 514 937 A1), bei dem immortalisierte primäre humane embryonale Retinazellen in serumfreiem Medium kultiviert und mit Influenza-Viren infiziert werden. Für die Immortalisierung der Wirtszellen wurden diese mit einem Plasmid transfiziert, das die Gene für die immediate-early-Proteine E1A und E1B des Adenovirus Subtyp 5 (Ad5) unter der Kontrolle des menschlichen Phosphoglycerat-Kinase-Promotors enthielt. Ad5

gehört zum Subgenus C der humanen Adenoviren, die ein sehr niedriges onkogenes Potenzial im Nagetiersystem zeigen. Ob dies allerdings ausreichend sicher ist, um aus derartigen Zellen Viren für eine beim Menschen einzusetzende Vakzine herzustellen, muss kritisch hinterfragt werden.

Per.C6-Zellen wurden diesbezüglich bei der EMEA schon einmal im Zusammenhang mit der Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren für die Gentherapie kritisch diskutiert. Hier hatte man den Kompromiss gefunden, dass zwar die Adenoviren-Vermehrung unbedingt eine transformierte Zelllinie erfordert, allerdings das Risiko durch eine entsprechend sorgfältige Abreicherung der Wirtszell-DNA minimiert werden könnte (EMEA/CHMP/127803/2004). Per.C6-Zellen wachsen in Suspension in definiertem, serumfreiem Medium mit einer Generationszeit von ca. 35 Stunden. Für eine effiziente Vermehrung der Influenza-Viren muss auch diesen Zellen bei der Infektion Trypsin (5 µg/mL) zugesetzt werden, damit die Hämagglutinin-Vorstufe zu der aktiven Variante prozessiert werden kann. Als Oberflächenrezeptor für Influenza-Viren werden in Per.C6-Zellen sowohl α 2,3-Sialinsäure-Galaktose- als auch α 2,6-Sialinsäure-Galaktose-Verknüpfungen exprimiert. In der Patentschrift wird darauf hingewiesen, dass selbst Influenza-Virenstämme, die schwierig auf embryonierten Hühnereiern zu kultivieren sind, in Per.C6-Zellen akzeptable Ausbeuten liefern.

Des Weiteren wurden noch andere Viren, wie HSV-1 und -2, Masernviren und Rotaviren erfolgreich in Per.C6-Zellen gezüchtet. Allerdings findet man keinerlei klinische Studien, die mit entsprechenden Vakzinen durchgeführt werden oder wurden.

Molekularbiologische Ansätze

Die mühsame Suche nach Reassortanten, die eine hohe Ausbeute und die gewünschten Antigene liefern, könnte umgangen

werden, wenn das Prinzip der Reversen Genetik für die Generierung des Saat-Virus zum Einsatz käme. Bei dieser Methode werden die Informationen der jeweiligen RNA-Segmente in Plasmid-DNAs eingesetzt, so dass ein Set von acht Plasmiden die gesamte Information eines Influenza-A-Virus trägt (Abb. 7). Die sechs Plasmide, die nicht für Oberflächenproteine codieren, leitet man beispielsweise von den entsprechenden Segmenten des bereits weiter oben erwähnten A/PR/8/34 Laborstammes ab. Die „HA- und NA-Plasmide“ generiert man aus saisonalen Virus-Isolaten. Auf diese Weise lässt sich in einem Schritt die gewünschte „Reassortante“ durch Transfektion der acht Plasmide in eine geeignete Wirtszelle erzeugen. Allerdings sind derartige hergestellte Viren gentechnisch veränderte Organismen (GVOs), die nach besonderen Sicherheitsvorschriften (biologische Sicherheitsstufe 2) kultiviert werden müssen, um eine Freisetzung in die Umwelt auszuschließen. Noch höher wären die Sicherheitsanforderungen (Sicherheitsstufe 3) für Produktionsanlagen, in denen hochpathogene humane Erreger gezüchtet würden – Anforderungen, die die bestehenden Produktionsanlagen wahrscheinlich noch nicht erfüllen können. Ein weiteres Hindernis für eine umfassende Impfstoff-Produktion mit Hilfe der Reversen Genetik ist der Patentschutz dieser Methode.

Um Impfviren für hochpathogene H5- oder H7-Stämme zu erzeugen, die zu schnell die infizierten Hühnerembryos abtöten, muss die Schnittstelle des Hämagglutinin-Vorläuferproteins modifiziert werden. Die originären Hämagglutinin-Proteine der H5- oder H7-Stämme enthalten im Hydrolysebereich mehrere basische Aminosäuren, die gleichzeitig für die erhöhte Pathogenität verantwortlich sind. Dies wiederum führt zu geringeren Ausbeuten bei der Herstellung, da die Wirtszellen durch den pathogenen Effekt abgetötet werden. Wird die Sequenz jedoch so verändert, dass nur noch eine einzige basische

Aminosäure in dieser Region übrig bleibt, wird die Pathogenität stark reduziert und die Ausbeute dadurch gesteigert.

Durch gentechnische Modifikationen lassen sich auch noch weitere Eigenschaften modifizieren. Beispielsweise antagonisiert das virale Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) die Interferon-Aktivität bei Infizierten. Das bedeutet, dass diese nicht mehr mit einer Interferonausschüttung auf die virale Infektion reagieren können, so dass sich die Viren nahezu ungehindert vermehren können. Viren, die kein NS1 enthalten, können dagegen nicht replizieren. Verkürzt man nun das Gen für NS1 derart, dass die Viren zwar noch replizieren können, dass aber auch eine Interferon-Antwort induziert wird, erhält man einen attenuierten Impfstamm, der so hoch immunogen ist, dass bereits eine deutlich geringere Dosis ausreicht, um einen sicheren immunologischen Schutz zu induzieren. Andere, viel versprechende Ansätze zielen darauf ab, replikationsdefiziente

Viren als Impfstoffe zu verwenden. Fehlt den Viren das Protein NEP (früher als NS2 bezeichnet) oder M2, können sie sich nur einmal replizieren, ohne jedoch infektiöse Partikel zu bilden. Noch reduzierter sind Viro-somen. Diese bestehen praktisch nur aus über Detergens-Behandlung der isolierten Viren rekonstituierten Virushüllen, ohne Nukleinsäure zu enthalten. Ein anderer Ansatz für die Impfstoff-Herstellung sind künstlich generierte „Virus-ähnliche Partikel“, die durch heterologe Expression viraler Proteine in geeigneten Wirtszellsystemen gebildet werden. Ob dagegen eine DNA-Immunisierung, bei der Plasmide, die mindestens eines der viralen Gene tragen, intramuskulär injiziert und dann in Muskelzellen zur Expression gebracht werden, beim Menschen wirklich erfolgreich ist, bleibt noch abzuwarten.

Prinzipiell besteht jedoch bei allen verschiedenen Ansätzen das Problem des Antigen-drifts, so



dass ständig eine Anpassung an die zirkulierenden Viren nötig ist. Ein Universal-Impfstoff, der generell gegen Influenza-Viren schützen könnte, wäre natürlich ideal, allerdings auch extrem schwierig zu konzipieren. Potenziell immunogene virale Proteine sind HA, NA und M2, die auf der Oberfläche der Viren präsentiert werden. Allerdings induziert nur das hoch variable Hämagglutinin wirklich protektive Antikörper. Will man die weniger variablen NA- oder M2-Proteine als Antigene in Impfstoffen einsetzen, muss man das Immunsystem mit Adjuvantien zusätzlich stimulieren.

Prinzipielle Unterschiede zwischen saisonalen (inter pandemischen) und pandemischen Impfstoffen

Immunologisch naive Individuen, wie Kinder, die weder eine Grippe durchgemacht noch eine Impfung erhalten haben, benötigen für eine umfassend protektive Immunität gegen die saisonale Influenza zwei Teilimpfungen im Abstand von vier bis sechs Wochen. Bei Erwachsenen reicht jedoch eine Impfung, weil man von einer Grundimmunität gegen Influenza-Viren ausgehen kann, die nur noch in Richtung des zirkulierenden Subtyps geboostert werden muss. Für diese Auffrischung sind die sehr sicheren, aber nicht sonderlich immunogenen Spalt- und Subunitvakzine durchaus ausreichend.

Saisonale Impfstoffe müssen nicht jedes Jahr komplett neu zugelassen werden. Sie erhalten ihre Zulassung vielmehr per Änderungsanzeige. Nachdem die WHO Ende Februar die neue Impfstoffzusammensetzung veröffentlicht hat wird die Empfehlung durch die CPMP/BWP Influenza ad hoc Working Group bei der Europäischen Zulassungsbehörde (EMA) geprüft und nach der Genehmigung durch das Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Ende März veröffentlicht. Durch das harmonisierte EU-Verfahren (Schnellverfahren nach Art. 7 der Verordnung (EC)

1084/2003) für die veränderte Stammzusammensetzung von Influenzaimpfstoffen ist die Dauer des Verfahrens von 90 Tagen auf ca. 60 Tage verkürzt. Die Hersteller müssen eine Änderungsanzeige mit allen relevanten Daten und entsprechende Impfstoff-Proben zur Chargenprüfung einreichen. Auf Seiten der Zulassungsbehörden wird das harmonisierte EU-Änderungsverfahren koordiniert und die Chargen nach der Prüfung freigegeben. Die Herstellung des Impfstoffes dauert in aller Regel insgesamt 4 bis 6 Monate. Für einen pandemischen Impfstoff ist dieses Zulassungsverfahren jedoch nicht anwendbar. Stattdessen hat das CHMP im April 2004 zwei und im Juni 2005 einen weiteren Leitfaden verabschiedet:

- Die EMA/CPMP/4986/03 Guideline on Submission of Marketing Authorisation Applications for Pandemic Influenza Vaccines through the Centralised Procedure befasst sich mit der prinzipiellen Zulassung pandemischer Impfstoffe. Hersteller können zu jedem beliebigen Zeitpunkt Musterimpfstoffe, so genannte pandemic mock-up vaccines, bei der EMA zur Zulassung einreichen. In der Guideline wird zusätzlich das Änderungsverfahren definiert, nach dem das tatsächliche pandemische Impfvirus in die genehmigte Zulassung des mock-up-Impfstoffes eingearbeitet werden muss. Damit verpflichtet sich der Hersteller zur Erhebung klinischer Daten während der Anwendung. Die Genehmigung des pandemischen Impfstoffes kann dann im Schnellverfahren gemäß Art. 8 der Verordnung (EC) 1085/2003 erfolgen.
- Die EMA/CPMP/4717/03 Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing Authorisation Application gibt eine Übersicht über die Daten zur Qualität, sowie präklinischen und klinischen Untersuchungen, die in dem Zulassungsantrag für den Mock-up-Impfstoff enthalten sein müssen.



Zum Weiterlesen

Die drohende Influenza-Pandemie

Auf den Ernstfall vorbereitet sein

DAZ Nr.8/2006 S.57

www.deutsche-apotheker-zeitung.de

DAZ

Deutsche ApothekerZeitung

- Die EMA/CHMP/VEG/193031/04 Core SPC for Pandemic Influenza Vaccines legt den Aufbau und Inhalt von Fach- und Gebrauchsinformationen für pandemische Influenza-Impfstoffe fest.

Eine derartige Mock-up-Zulassung gewährleistet eine schnelle Zulassung eines echten pandemischen Influenza-Impfstoffes und wird deshalb bereits von einigen Herstellern angestrebt. Allerdings ist dieses Verfahren mit einem gewissen Risiko behaftet: Es fallen dabei nicht unerhebliche Produktionskosten sowie Kosten für klinische Studien an, ohne dass sichergestellt ist, dass der Pandemiefall wirklich eintritt und dadurch ein finanzieller Ausgleich für die investierten Gelder erfolgt.

Das US Department of Health and Human Services (HHS) hat bereits einen präpandemischen H5N1-Impfstoff von der Firma Novartis geordert. Damit sollen 20 Millionen Regierungsmitglieder vor und bei Auftreten einer Influenza-Pandemie immunisiert werden. Das Auftragsvolumen beläuft sich auf 40,95 Millionen US-\$. Der Impfstoff wird 2007 in Liverpool in embryonalisierten Hühnereiern hergestellt, nach der Produktion der saisonalen Influenza-Vakzine für 2007/2008. Der inaktivierte H5N1-Virusstamm wird gegebenenfalls noch mit dem Adjuvans MF59 versetzt, um die Immunantwort zu verstärken. ◀

Dr. Ilse Zündorf, Prof. Dr. Theo Dinger-
mann, Institut für Pharmazeutische Bio-
logie, Biozentrum, Marie-Curie-Str. 9,
60439 Frankfurt/Main

Literatur

Das Literaturverzeichnis ist unter
www.deutsche-apotheker-zeitung.de
Rubrik Downloads - Literatur abrufbar.