

## Archaeosome als potentielle Adjuvantien

# Innovative Verstärkung für Impfstoffe



Dr. Rita Schwaiger  
Institut für Klinische Chemie  
Klinikum Schwabing  
Kölner Platz 1  
80804 München  
rita.schwaiger@klinikum-muenchen.de

**Im Zuge der Entwicklung neuer Impfstoffe werden Adjuvantien als Wirkverstärker zur Stimulierung der Immunantwort benötigt. Sie aktivieren die Immunantwort und finden auch bei der Erforschung von Autoimmunerkrankungen interessante Anwendungen.**

**Archaeosome sind spezielle Liposomen, die sich von sehr alten Lebensformen, den „Archaea“ ableiten. Sie werden derzeit als innovative Alternative für die Adjuvantienherstellung diskutiert. (Trillium-Bibliothek 2010, e-publication, [www.trillium.de](http://www.trillium.de))**

Bei Adjuvantien handelt es sich um Wirkverstärker in humanen Totimpfstoffen, die in der immunisierten Person eine Steigerung der Immunantwort auslösen. Sie werden gemeinsam mit dem Impfantigen appliziert und veranlassen das Immunsystem so zu reagieren, als sei eine aktive Infektion vorhanden, um anschließend im Falle einer tatsächlichen Infektion den notwendigen Schutz zu bieten. Durch das Mischen von löslichem Impfantigen mit Adjuvantien werden diese in unlösliches partikuläres Material umgewandelt. Dies erhöht einerseits die Stabilität der Impfantigene und beschleunigt andererseits deren Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen und dendritische Zellen.

Beispiele sind die Anlagerung der Impfantigene an Aluminiumhydroxid im Tetanusimpfstoff und die als MF59 bekannte Emulsion in mineralischem Öl bei pandemischen Influenza-Impfstoffen. Ebenfalls werden Liposomen – durch Hydratation von Lipidmembranen generierte Vesikel – als Adjuvans beim Hepatitis-A-Impfstoff verwendet.

Den Impfantigenen können außerdem nichtinfektiöse Bestandteile von Bakterien beigefügt werden, durch die eine antigenpräsentierende Zelle zur ko-stimulierenden Aktivität und Expression von Cytokinen angeregt wird. Abgetötete *Bordetella pertussis* Bakterien fungieren als Adjuvans im Dreifachimpfstoff gegen Diphtherie, Keuchhusten und Tetanus. Viele Adjuvantien stimulieren über die Aktivierung von „Toll-like“-Rezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen das angeborene Immunsystem. Zu diesen Adjuvantien zählen bakterielle Polysaccharide wie Lipopolysaccharide, bakterielle Hitzeschockproteine, bakterielle DNA und Muramylpeptide. Interessant ist auch der Aspekt, dass Adjuvantien in der Erforschung von Autoimmunerkrankungen eine Verwendung finden. Da diese sich

oft nur sehr langsam entwickeln, müssen für die Induktion experimenteller Autoimmunerkrankungen bakterienhaltige Adjuvantien mit den Gewebezellen gemischt werden.

Im Zuge der fortlaufenden Entwicklung neuer Impfstoffe werden permanent neue Adjuvantien benötigt, um eine optimale Immunantwort zu generieren. Seit kurzem wird das Archaeosom als Adjuvans und als möglicher Kandidat in der humanen Impfstoffentwicklung diskutiert.

### Innovation durch Archaea

Archaea stellen neben Pro- und Eukaryoten die Dritte Domäne des Lebens dar. In der Natur sind archaeale Lipide einzigartig und bestehen nicht wie bei Pro- und Eukaryoten aus Ester-gekoppelten Fettsäureseitenketten, sondern aus Ether-gekoppelten Isoprenoideseitenketten, dem so genannten Archaeol. Durch Hydratation der archaealen Membranlipide entstehen Liposomen, welche aufgrund ihrer einzigartigen Struktur in der Literatur als Archaeosom bezeichnet werden.

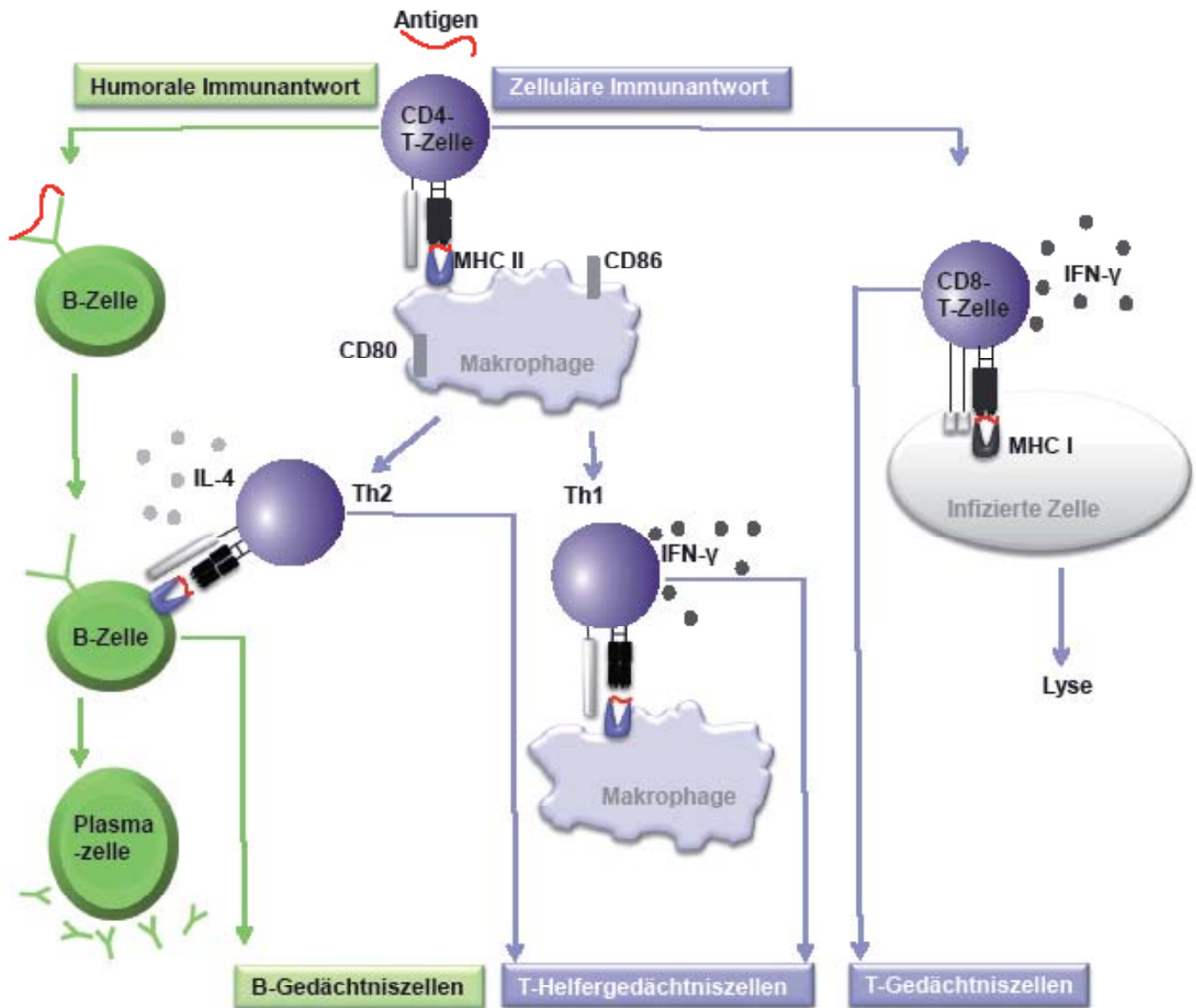
In der Impfstoffherstellung sind Archaeosome als Adjuvans insofern attraktiv, als Archaea keine pathogenen Organismen darstellen. Sie produzieren weder Endotoxine, wie Lipopolysaccharide der Gram-negativen Bakterien, noch lösen sie die Bildung von signifikanten Mengen an Anti-Archaeosomen Antikörper im Maus-Modell aus. Die Ether-Bindung verleiht dem Archaeosom eine außergewöhnliche Stabilität und somit eine einfache Handhabung, sowohl in der Präparation als auch in der Lagerung. Zur Vaccinierung werden die archaealen Lipide in Anwesenheit eines Impfantigens hydratisiert, wodurch dieses anschließend in lamellenartige Archaeosome eingeschlossen wird. Die Membranstabilität der Archaeosome führt

bei Applikation zu einer verzögerten Antigenfreisetzung, was die Wirksamkeit eines Impfstoffes durch eine verstärkte Immunantwort und die Bildung von Antikörpern erhöht.

Inwieweit aktivieren nun Archaeosomen gemeinsam mit einem Antigen die humorale Immunität? Die Bildung von Antikörpern in Mäusen, welche mit verschiedenen Archaeosomen Typen, die Bovines Serum Albumin (BSA) als Antigen enthielten, immunisiert wurden, entwickelten einen signifikant höheren Antikörper-Titer als nach der Immunisierung mit herkömmlichen Liposomen, welche BSA enthielten oder auch mit BSA, welches gemeinsam mit Aluminiumhydroxid verabreicht wurde. Eine Übersicht der Stimulierung der adaptiven Immunität durch Impfantigene, Adjuvantien bzw. Krankheitserreger ist der Abbildung zu entnehmen.

Wie wird nun die zelluläre Immunantwort, bestehend aus T-Killerzellen und T-Helferzellen, durch Archaeosomen aktiviert?

Im ersten Schritt müssen Archaeosomen durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommen, anschließend prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Aufnahme erfolgt mittels Phagozytose oder über rezeptorvermittelte Endocytose. Das Antigen wird generell über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = *major histocompatibility complex*) präsentiert, wobei Antigene intrazellulärer Proteine über MHC-I Moleküle CD8 positiven T-Zellen (T-Killerzellen) und Antigene extrazellulärer Proteine über MHC-II Moleküle den CD4 positiven T-Zellen (T-Helferzellen) präsentiert werden. Nach Immunisierung von Mäusen mit *Methanobrevibacter smithii*-Archaeosomen, die Ovalbumin enthielten, konnte eine Aktivierung der CD8-T-Zellen beobachtet werden. Die Aktivierung zu T-Killerzellen wurde mit Hilfe der Quantifizierung der IFN- $\gamma$  Produktion entsprechender Zellen gemessen, welche nach einer erfolgreichen Aktivierung eine erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung



### Stimulierung der adaptiven Immunität durch Antigene

Die adaptive Immunabwehr, bestehend aus dem humoralen und zellulären Teil, sorgt für das effektive Erkennen von Krankheitserregern, oder Impfantigene, die gemeinsam mit einem Adjuvans appliziert werden. Nach der Aufnahme der Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (hier: Makrophagen, B-Zellen) findet eine Prozessierung und Präsentation über MHC Moleküle statt. Bei der humoralen Immunantwort bindet die B-Zelle durch den B-Zellrezeptor Antigene und präsentiert diese über MHC-II Moleküle den T-Helferzellen (Th2), welche durch das Ausschütten von IL-4 das B-Zellwachstum fördern und diese zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle aktivieren. Zur zellulären Immunabwehr gehören neben den Th2 Zellen noch die T-Helferzellen Th1, die durch die Bildung von IFN- $\gamma$  für eine Makrophagenaktivierung sorgen. T-Helferzellen ist die Expression des Co-Rezeptors CD4 gemeinsam. Ein weiterer Typus von T-Zellen sind die CD8-positiven T-Zellen, die Peptide virusinfizierter Zellen über MHC-I Moleküle erkennen und anschließend für die Lyse der infizierten Zelle sorgen. Nach der Infektion bzw. Impfung bleiben sowohl aktivierte B-, T-Helfergedächtniszellen und T-Gedächtniszellen.

MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex / Th = T-Helferzelle / Il = Interleukin /

IFN = Interferon / CD = cluster of differentiation

zeigten. Liposome, die Ovalbumin enthielten, waren hingegen nicht in der Lage, Peptide des entsprechenden Antigens über MHC-I-Moleküle zu präsentieren.

### Doppelte Wirkung

Überraschend war auch die Erkenntnis, dass *M. smithii*-Archaeosome in den Milzzellen aus immunisierten Mäusen T-Helferzellen sowohl zur zellvermittelnden Th1-Antwort (IFN- $\gamma$ ) als auch zur humoralen Th2-Antwort (IL-4) aktivierten. Aktivierte T-Helferzellen synthetisieren weitere Cytokine, die entweder eine Makrophagenaktivierung (zellvermittelnde Immunität) oder aber B-Zellen dazu anregen, neutralisierende Antikörper zu bilden (humorale Immunität). Das Archaeosom aktiviert als gemischtes Adjuvans beide Typen von T-Helferzellen und ist somit nicht mit dem Problem des bewährten Adjuvans Aluminiumhydroxid konfrontiert, welches keine Th1-Antwort auslöst.

Zur Aktivierung von T-Zellen ist neben einer Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle die Ko-Stimulation der spezifischen T-Zellen, welche das Antigen erkennt, erforderlich. *M. smithii*-Archaeosome bewirkten auf Makrophagen und dendritischen Zellen eine auffallend starke Induktion der ko-stimulierenden Moleküle CD80 und CD86. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Ko-Stimulation, ausgelöst durch die stark entzündungsfördernden Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien.

Neben einer primären Immunantwort gegen das entsprechende Antigen bietet das Archaeosom außerdem eine lang anhaltende Immunität mit der Generierung von Gedächtniszellen, die mit her-

kömmlichen Liposomen nicht erzielt werden konnten. Für Antigene die in Archaeosome appliziert wurden, konnte nach erneuter Antigen-Verabreichung noch nach 300 Tagen ein Antikörpertiter in Mäusen gemessen werden. Mit *M. smithii*-Archaeosomen immunisierte Mäuse, die Antigene des intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes* enthielten, induzierten eine starke Antwort durch T-Killerzellen. Außerdem wurde über mehrere Monate bei einer anschließenden Infektion mit *L. monocytogenes* ein aktiver Schutz durch die Generierung von T-Gedächtniszellen demonstriert.

### Schutz gegen Krebs

Die CD8-T-Zell-Antwort spielt auch bei der Eliminierung von Krebszellen eine Rolle. Hier eignen sich Archaeosome insofern als potentielle Krebsimpfstoffe, da sie in Tumor-Mausmodellen eine CD8-T-Zell-Antwort auslösen, die sowohl einen effektiven Schutz gegen Krebs bietet als auch die Rückbildung von Tumoren fördert.

Zusammenfassend leisten Archaeosome in Maus-Modellen als gemischte Adjuvantien sowohl eine Aktivierung der primären Immunantwort als auch die Bildung von Gedächtniszellen. Zukünftig gilt es im Zuge der Entwicklung neuer Impfstoffe Archaeosome als humane Adjuvantien zu etablieren.

Teile dieses Artikels wurden aus „Archaeosome adjuvants: Immunological capabilities and mechanism(s) of action“ (Lakshmi Krishnan, G. Dennis Sprott) entnommen.

## Kontroverse Diskussion

# Adjuvantien in Grippe-Impfstoffen

Adjuvantien wurden zuletzt in der Wintersaison 2009/2010 im Zusammenhang mit der Schweinegrippe kontrovers diskutiert. Bei pandemischen Influenza-Impfstoffen konnte die Antigenmenge durch Adjuvantien AS03 (Pandemrix; GlaxoSmithKline) und MF59 (Focetria und Celtura; Novartis) mindestens auf die Hälfte reduziert werden. MF59 und AS03 enthalten neben Squalen, einem natürlichen Zwischenprodukt der humanen Cholesterin- und Vitamin D Synthese, oberflächenaktives Polysorbat 80 sowie in MF59 Sorbitantrioleat und in AS03 Vitamin E.

Kritiker des pandemischen Influenza-Impfstoffes bringen diesen in Zusammenhang mit dem „Golfkriegs-Syndrom“ (gulf war syndrome, GWS), welches bei Kriegsveteranen des zweiten Golfkriegs (1991) auftrat. Den Soldaten wurde damals ein Impfstoff gegen Milzbrand (Anthrax) verabreicht, wobei berichtet wurde, dass manche Chargen des Impfstoffs Squalen als Wirkverstärker enthielten. Außerdem wurden angeblich in an GWS erkrankten Golfkriegsveteranen Squalen-Antikörper nachgewiesen.

Laut Informationen des Paul Ehrlich Instituts ([www.pei.de](http://www.pei.de); Artikel vom 12.11.2009) besteht jedoch kein Zusammenhang von

Squalen mit dem GWS-Syndrom, da auch nicht geimpfte Kontrollpersonen Squalen-Antikörper besitzen und sich keine Spuren von Squalen in Anthrax-Impfstoffen finden ließen. Der aktuelle Anthrax-Impfstoff Biothrax (Emergent Biosolutions) enthält Aluminiumhydroxid als Wirkverstärker.

Für Squalenhaltige Adjuvantien in pandemischen Influenza-Impfstoffen wurden für AS03 sowie für MF59, welches im saisonalen Grippe-Impfstoff Fluad bereits verabreicht wurde, keine auffälligen Nebenwirkungen festgestellt. Der Schweinegrippe-Impfstoff wird in Assoziation mit dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) diskutiert, einer Erkrankung des Nervensystems, wobei die Mehrheit der Patienten eine vorausgegangene Infektionskrankheit hatte.

Das Paul Ehrlich Institut unternimmt aktuell Studien, um einen Zusammenhang zwischen GBS und der Schweinegrippe-Impfung auszuschließen. Zwischen dem saisonalen Grippe-Impfstoff und GBS gibt es keine Assoziation, was eine Impfung bei der nächsten Grippewelle unbedenklich macht ([www.pei.de](http://www.pei.de); Artikel vom 29.10.2009).