

DNA- und zellbasierte Impfstoffe

Trends in der Impfstoffentwicklung

JÜRGEN SCHERER | THOMAS HINZ | KLAUS CICHUTEK

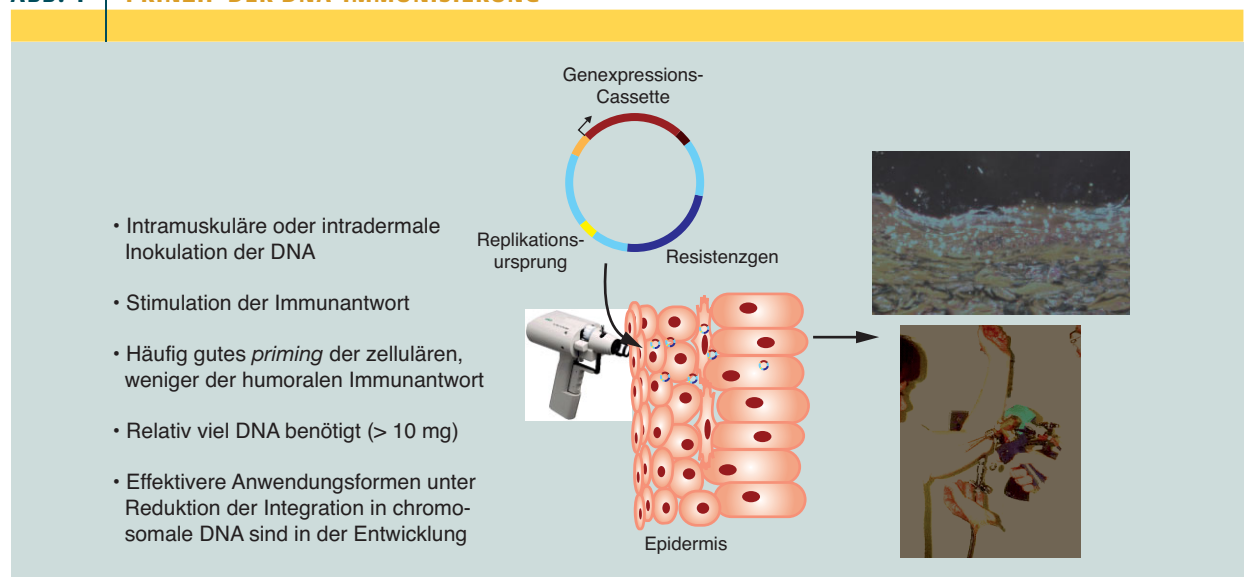
Für eine Reihe von Infektionskrankheiten sowohl bakterieller, parasitärer als auch viraler Genese wurde vor allem im 20. Jahrhundert eine Vielzahl von Impfstoffen entwickelt, die Impfungen erfolgreich schützen konnten. Dies führte zu einer drastisch verminderten Krankheitslast in der Bevölkerung [1], zu einer deutlich verringerten Säuglingssterblichkeit und zu einer Erhöhung der Lebenserwartung. Aktuell werden die globalen Bemühungen intensiviert, das Poliomyelitis- und das Masern-Virus auszurotten.

Im Jahre 1980 konnte die Weltgesundheitsorganisation WHO verkünden, dass die Pocken vom Erdball verschwunden waren. Neben dem Schutz vor Infektionskrankheiten gelang es, mit Einführung des Hepatitis-B-Virus- (HBV)-Impfstoffes auch eine Spätfolge dieser Virusin-

fektion einzudämmen, nämlich das Auftreten des HBV-bedingten hepatozellulären Karzinoms. In jüngster Zeit wurden auf der gleichen Linie erfolgreich Impfstoffe gegen humane Papillomaviren entwickelt und zugelassen, die langfristig zu einer signifikanten Reduktion der zervikalen Krebserkrankungen führen sollten.

Im bisher gebräuchlichen Sinne versteht man Impfstoffe als präventive Impfstoffe gegen Infektionserreger. Der ihrer Wirksamkeit zugrunde liegende Hauptmechanismus ist die Induktion von Antikörpern, welche eine akute oder chronische Infektion des Geimpften und somit das Auftreten einer Infektionskrankheit verhindern. Dabei unterscheidet man Lebendimpfstoffe und Totimpfstoffe, wobei erstere eine abgeschwächte Variante eines Erregers enthalten und eine zeitlich begrenzte und im Allgemeinen symptomfreie Infektion hervorrufen, die zu einem häufig jahrelangen, manchmal vielleicht lebenslangen Infektionsschutz führen. Totimpfstoffe enthalten Protein oder Peptid,

ABB. 1 | PRINZIP DER DNA-IMMUNISIERUNG



Die DNA wird nach Einbringung in Muskel oder Haut, beispielsweise mit einer so genannten Impfpistole, von Muskelzellen in Antigen übersetzt (helle Flecken in der Epidermis; Abbildung rechts). Professionelle Antigen-präsentierende Immunzellen stimulieren eine Immunantwort gegen das Antigen des Erregers. Die häufig gebrauchte Plasmid-DNA enthält einen Ursprung zur DNA-Vermehrung in Bakterien („ori“) bei der Produktion, eine Resistenzgen zur Bakterienselektion, von dessen Gebrauch immer mehr abgeraten wird, und das für das gewünschte Antigen kodierende Gen (Genexpressions-Cassette).

Polysaccharid oder Toxin eines Erregers, womit ebenfalls ein langer Impfschutz erzielt wird. Totimpfstoffe werden im Allgemeinen intramuskulär, manchmal auch intradermal oder subkutan injiziert, während Lebendimpfstoffe auch oral verabreicht werden können. Totimpfstoffe enthalten neben dem Antigen häufig ein so genanntes Adjuvans, das die Induktion von Antikörpern gegen das Antigen ermöglicht oder um Größenordnungen verbessert. Neuartige Impfstoffe beruhen auf Gentransferverfahren, wobei statt des Antigens das für das Antigen kodierende Gen oder Teile dieses oder mehrerer dieser Gene nach der Injektion von menschlichen Zellen aufgenommen werden. Das Antigen wird von den aufnehmenden Zellen *in vivo* gebildet und regt im Körper die Immunreaktion an. Zu den Gentransferimpfstoffen gehören die DNA-Impfstoffe und die Vektor-Impfstoffe [2].

Die Möglichkeiten, mit Impfungen zum Schutz vor Krankheiten beizutragen, sind bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Gerade die moderne Biotechnologie sowie das wachsende Verständnis der zugrunde liegenden immunologischen Prozesse eröffnen viele neue Perspektiven der Impfstoffentwicklung [3]. Die aktuellen Entwicklungsarbeiten beziehen sich hierbei wesentlich auf vier Gebiete:

- Die weitere Optimierung bereits verfügbarer Impfstoffe hinsichtlich ihrer Anwendung, aber auch hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Sicherheit.
- Die Entwicklung neuer Impfstoffe gegen bedeutsame Infektionskrankheiten, für die bisher keine bzw. nur unzureichende Impfstoffe zur Verfügung stehen, wie beispielsweise Malaria oder Tuberkulose.
- Die Entwicklung von Impfstoffen gegen „neue“ Erreger wie HIV, West-Nilvirus oder auch das SARS-Coronavirus.
- Die Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen gegen Krebs, Hepatitiden, Autoimmunerkrankungen, Alzheimer oder die Nikotinsucht.

Im Folgenden sollen einige wesentliche Entwicklungen und Trends auf diesen Gebieten (und der dabei eingesetzten Methoden) vorgestellt werden. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Vorstellung des Konzeptes von DNA- und Vektor-Impfstoffen sowie von zellbasierten Tumor-Impfstoffen.

Optimierung verfügbarer Impfstoffe Herstellungsverfahren

Die Möglichkeiten und Notwendigkeiten, aktuell verfügbare Impfstoffe zu optimieren, lassen sich hervorragend am Beispiel der Influenza-Impfstoffe verdeutlichen. Influenza-Impfstoffe werden seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich auf Bruteiern hergestellt, was einfach, kostengünstig und zuverlässig ist. Dennoch ist diese Produktionsweise mit Nachteilen verbunden, die sich durch eine Herstellung in Zellkulturen auf einfache Weise umgehen lassen. Zum einen beinhalten die klassischen Influenza-Impfstoffe herstellungsbedingt Reste von Hühnereiweiß, sodass die Impfung von auf diese Substanzen allergisch reagierenden Personen kontraindiziert ist. Weiterhin bedarf das Produktionssystem

„Hühnerei“ einer aufwändigen Logistik, um zum richtigen Zeitpunkt große Mengen geeigneter Eier zur Verfügung zu haben, was speziell im Falle einer Influenzapandemie ein schwierig zu lösendes Problem darstellen könnte. Die Verfügbarkeit von Zellkulturen zur Produktion ist demgegenüber einfach sicherzustellen und bietet zudem den Vorteil, dass kein Hühnereiweiß in den Impfstoff gelangt. So wurde vor kurzem ein in Zellkultur hergestellter saisonaler Impfstoff durch die Europäische Arzneimittelbehörde EMA (*European Medicines Agency*) erstmals europaweit zugelassen, weitere werden sicherlich folgen [4].

Formulierung/Adjuvantien

Die Influenza-Impfung ist u.a. vor allem für ältere Personen (> 60 Jahre) empfohlen, da dieser Personenkreis ein besonders hohes Risiko hinsichtlich Influenza-bedingter Komplikationen hat. Gerade in dieser Gruppe verringert sich die Wirksamkeit der Influenza-Impfung, da bekanntermaßen das Immunsystem älterer Personen nur schwächer auf eine Immunisierung reagiert und damit die Impfung im Vergleich zu jüngeren Personen zu einem geringeren Schutz führt.

Um hier Abhilfe zu schaffen, wird intensiv an der Entwicklung verbesserter Adjuvanssysteme, meist Öl-in-Wasser-Emulsionen, gearbeitet, die die Immunantwort deutlich verstärken und damit zu einem besseren Schutz führen können. Auch im Falle einer Influenza-Pandemie können verbesserte Adjuvanssysteme einen bedeutenden Beitrag zum Schutz der Bevölkerung leisten. Zum einen kann eine durch ein Adjuvans erhöhte Immunogenität ermöglichen, den Antigengehalt des Impfstoffs deutlich zu reduzieren. Dies führt in der Folge zu einer deutlich höheren Produktionskapazität und erlaubt eine schnellere Versorgung der Bevölkerung mit Impfstoffen, was besonders für ein Pandemie-Szenario einen äußerst bedeutsamen Vorteil darstellt. Auf der anderen Seite zeichnet sich eine Pandemie dadurch aus, dass ein „neues“ Influenzavirus auf eine immunologisch naive Bevölkerung trifft, und damit die gewohnte einmalige Immunisierung nicht zum Aufbau eines adäquaten Schutzes als ausreichend zu betrachten ist. Adjuvanssysteme können hier dazu beitragen, dass eine zweimalige Immunisierung für einen wirksamen Schutz ausreicht, und dass eine stärkere Kreuzreaktivität gegen leicht veränderte Varianten eines Influenza-Pandemiestammes hervorgerufen wird [5, 6].

Kombinationsimpfstoffe

Die zunehmende Anzahl verfügbarer Impfstoffe, auch und gerade für die Immunisierung von Säuglingen und Kleinkindern gemäß den Empfehlungen der STIKO, resultierte in vielfältigen Arbeiten zur Entwicklung von Kombinationsimpfstoffen. Damit ist der Schutz vor einer Vielzahl von Infektionskrankheiten mit deutlich weniger Injektionen möglich, was zu einer erhöhten Durchimpfungsrate führen dürfte und damit die Effektivität eines Impfstoffs, also der Wirksamkeit bezogen auf die gesamte Bevölkerung, verbessern kann.

Entwicklung von Impfstoffen gegen „alte“ und „neue“ Erreger

Trotz langjähriger und intensiver Bemühungen steht bisher kein Impfstoff zum Schutz vor einer Malariaerkrankung zur Verfügung. Gleiches gilt zumindest für die pulmonäre Form der Tuberkulose und für neuere Erkrankungen wie z.B. AIDS oder West-Nilvirus. Die modernen molekularbiologischen Methoden eröffnen viele weitere Chancen auf erfolgreiche Impfstoffentwicklungen. Im Folgenden werden einige der verfolgten Strategien dargestellt. Allerdings haben diese Ansätze bisher nur in der Veterinärmedizin zu zugelassenen Impfstoffen geführt [7], erfolgreiche Zulassungen im Human-Impfstoffbereich stehen noch aus.

Identifizierung protektiver Antigene

Ein wichtiger erster Schritt bei der Entwicklung eines Impfstoffes ist die Identifizierung protektiver Antigene des Erregers. In der Vergangenheit wurden hierzu meist auf langwierige Weise Erreger in Kultur vermehrt, anschließend inaktiviert und aufgearbeitet bzw. einzelne Bestandteile aufgereinigt und die Immunogenität und Schutzwirkung der verschiedenen Komponenten im Tier untersucht. Dieses Verfahren gestaltet sich heute, da die vollständigen Genomsequenzen der meisten Erreger bekannt sind bzw. auf relativ einfache und schnelle Weise bestimmt werden können, sehr viel effizienter. Bei der als „reverse vaccinology“ bezeichneten Methode wird die Genomsequenz mithilfe von Computern analysiert, um die Proteine eines Erregers und deren Struktur und Lokalisation vorherzusagen [8]. Die Sequenzen der als potentielle Antigene identifizierten Proteine werden in *E. coli* kloniert, exprimiert und die Immunogenität der in der Sequenz kodierten Proteine oder Peptide in Mäusen untersucht. Beispielsweise erlaubte es die-

ses Verfahren, für Meningokokken, Serotyp B, ausgehend von 2.158 aufgrund der Erreger-Gensequenz vorhergesagten offenen Leserahmen (ORFs) 15 Antigene zu identifizieren, die als Kandidat-Impfstoffe weiter untersucht werden können. Einen vergleichbaren Weg geht man auch bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* und auch *Staphylococcus aureus* [9].

Anwendung

Die nach wie vor bei vielen Impfstoffen übliche intramuskuläre Injektion stellt einen eher ungewöhnlichen Weg für eine Immunisierung dar, da dies nicht der natürlichen Infektionsroute der meisten Erreger entspricht. Um einen optimalen Schutz an der natürlichen Eintrittsstelle zu erzielen, wäre beispielsweise eine mukosale Applikation von Impfstoffen zu entwickeln, wie beispielsweise die nasale Applikation der lebend-attenuierten Influenzavirus- (LAIV)-Impfstoffe [4]. Ein weiteres Konzept ist die transdermale Applikation von Impfstoffen, mit der vor allem eine Stimulation der dendritischen Zellen erreicht werden soll. Ein häufig genanntes, aber noch in weiter Ferne liegendes Konzept stellt die orale Immunisierung mit Nahrungsmitteln (*edible vaccines*) dar, die gentechnisch verändert wurden, um geeignete Antigene als Inhaltsstoffe zu exprimieren [10].

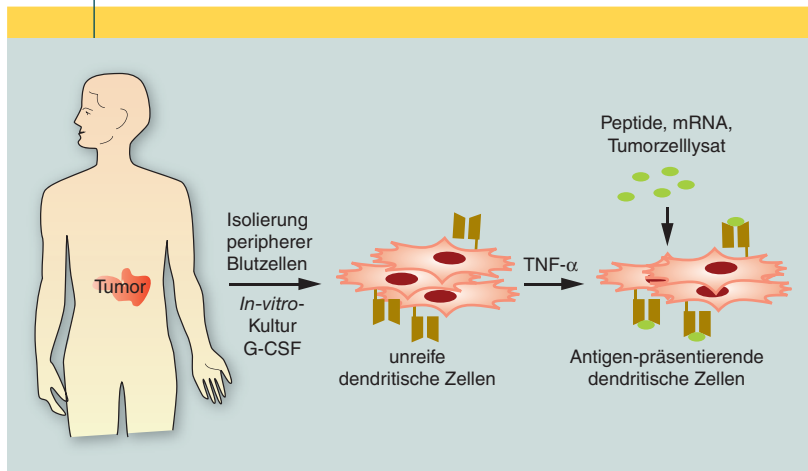
DNA- und Vektor-Impfstoffe

Ein nicht mehr ganz neues, aber immer noch viel versprechendes Konzept stellen DNA-Impfstoffe dar [11]. Hierbei werden dem Impfling nicht mehr Proteine, sei es in Form des abgeschwächten bzw. inaktivierten Erregers oder spezifischer Proteine, verabreicht, sondern „nur“ noch die genetische Information zur Bildung eines Proteins oder Peptids in Form doppelsträngiger DNA, so genannter Plasmide (Abb. 1).

Anfang der 1990er Jahre wurde nach Injektion von Plasmid-DNA in den Muskel einer Maus die Expression des zugehörigen Proteins nachgewiesen [12] und in der Folge konnte auch die Ausbildung einer protektiven Immunantwort nach Injektion eines für ein Virusprotein kodierenden Plasmids gezeigt werden [13]. Dabei gelangt die Plasmid-DNA überwiegend in Muskelzellen. Sowohl die Plasmid-DNA als auch von ihr gebildetes Antigen gelangen in geringerem Ausmaß auch in Antigen-präsentierende Zellen (APC). Nur ein kleiner Anteil dieser Plasmide wird von den Zellen translatiert. Die exprimierten Proteine können von der Zelle freigesetzt werden oder aber, wie dies die natürliche Aufgabe Antigen-präsentierender Zellen ist, als Fremdprotein prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Die APC aktivieren auf diese Weise MHC-I-abhängig zytotoxische T-Zellen und MHC-II-abhängig T-Helferzellen, die wiederum über Zytokin-Ausschüttung die Antikörperproduktion von B-Zellen stimulieren. Daher wird bei dieser Immunisierung neben einer humoralen Antikörperantwort auch eine deutliche T-Zellaktivierung beobachtet. Vergli-

ABB. 2 | PRINZIP EINES ZELL-BASIERTEN TUMORIMPFSTOFFES



Prinzip der Herstellung, Beladung mit Tumorantigen und Re-Applikation eines auf autologen dendritischen Zellen (DC) beruhenden Tumorigenimpfstoffs, gewonnen aus Monozyten. Peptide können direkt auf die HLA-Moleküle geladen werden. Proteine werden endogen zu Peptiden prozessiert, auf HLA-Moleküle geladen und auf der DC-Zelloberfläche präsentiert. Die T-Zellen des Patienten erkennen mit deren T-Zellrezeptor den HLA-Peptid-Komplex auf den DC.

chen mit einer klassischen Immunisierung mit Antigenen führt die Immunisierung mit DNA-Impfstoffen daher zu einer deutlich stärkeren Aktivierung der zellvermittelten Immunität.

Damit könnten DNA-Impfstoffe eine ideale Kombination der beiden klassischen Konzepte der inaktivierten und der attenuierten Impfstoffe darstellen. Zum einen können die Nachteile des attenuierten Konzeptes vermieden werden, dass abgeschwächte Erreger, wenn auch sehr selten, in virulente Formen revertieren können, wie dies z.B. bei oralen Poliovirus- (OPV)-Impfstoffen bekannt ist, was zur Umstellung auf inaktivierten Poliovirusimpfstoff (IPV) führte. Attenuierte Erreger können in immunsupprimierten Personen durchaus zu ernstesten Erkrankungen führen. Zum anderen wird der Nachteil der inaktivierten Impfstoffe und der „Protein“-Impfstoffe umgangen, dass diese Impfstoffe in der Regel nur eine geringere zelluläre Immunantwort auslösen und die humorale Antikörperantwort meist durch wiederholte Booster-Impfungen aufrecht erhalten werden muss. Für eine ganze Reihe von Erregern scheint eine primär Antikörper-vermittelte Immunantwort keinen ausreichenden Schutz generieren zu können, sodass dieses Konzept zur Entwicklung von z.B. HIV-Impfstoffen vorteilhaft erscheint.

Ein weiterer Vorteil des Konzeptes der DNA-Impfstoffe besteht in der Prozessierung der Antigene in der Wirtszelle selbst, wie bei einer natürlichen Infektion, statt in anderen Expressionssystemen wie Hühner- oder Hefezellen. Die Konformation der Antigene und deren Glykosylierung entsprechen dadurch in hohem Maße der natürlichen Situation und führen zur Bildung passgenauerer Antikörper [14].

DNA-Impfstoffe bieten aber nicht nur Vorteile bei der Anwendung, sondern auch bei der Herstellung und Logistik. DNA ist ein besonders stabiler und mit modernen molekularbiologischen Methoden einfach zu manipulierender Stoff. Eine Herstellung in größerem Maßstab sollte einfach und effizient möglich sein und besonders die Anpassung an für verschiedene Proteine kodierende Plasmide sollte sich ohne größeren Aufwand realisieren lassen. Die Stabilität des DNA-Moleküls lässt eine sehr gute Haltbarkeit, Transport- und Lagerfähigkeit entsprechender Impfstoffe erwarten. Gerade angesichts des immensen Bedarfs an Impfstoffen in den weniger industrialisierten Regionen der Erde stellt dies einen nicht zu unterschätzenden Vorteil dar.

Trotz all dieser überzeugenden konzeptionellen Argumente ist es bis heute dennoch nicht gelungen, einen DNA-Impfstoff zur Anwendung am Menschen bis zur Zulassung/Marktreife zu entwickeln. Im Gegensatz hierzu wurden bereits zwei DNA-Impfstoffe im Veterinärbereich zugelassen; zum einen ein West-Nilvirus-Impfstoff für Pferde und zum anderen ein Impfstoff gegen das Infektiöse Hämatopoetische Nekrosevirus für Lachse [7]. Dies belegt zwar die grundsätzliche Machbarkeit des Konzeptes, unterstreicht aber andererseits die Tatsache, dass sich das menschliche Immunsystem und die Struktur des DNA aufnehmenden Muskels, ähnlich wie dies bei anderen Primaten beobachtet wurde, doch signifikant von dem der ge-

wöhnlich als Modell untersuchten Maus unterscheidet und dass weitere Forschungsarbeiten nötig sind, um dieses Konzept weiter zu verbessern und auch eine Wirksamkeit im Menschen zu erzielen. Aktuell werden eine ganze Reihe von Strategien verfolgt, um die Immunantwort im Menschen so zu verbessern, dass ein wirksamer Schutz erzielt werden kann. Einige seien im Folgenden erläutert.

Optimierung der Applikation

Ein initialer, aber dennoch wesentlicher Schritt bei der DNA-Vakzinierung ist das Einbringen der Plasmide in die Körperzellen des Impflings. Eine „klassische“ intramuskuläre Injektion führt zu keiner sehr effizienten Antigenpräsentation, da zum einen die Mehrzahl der Plasmide im extrazellulären Raum verbleibt und zum anderen Muskelzellen keine APC darstellen und nur wenig vom Plasmid kodiertes Protein exprimieren. In der Vergangenheit bevorzugt wurde daher eine Applikation mit der „gene gun“, die an Goldpartikel gebundene Plasmide per Luftdruck in die oberflächlichen Hautschichten und -zellen einbrachte. Eine nochmals gesteigerte Expression von Antigenen wird mit einer als „*In-vivo*-Elektroporation“ bezeichneten Methode erreicht, die in den letzten Jahren entwickelt wurde und zunehmend beliebter wird. Hierbei werden vor bzw. während der Applikation der Plasmide die Zellen durch einen Stromfluss „löchrig“ gemacht, sodass die Plasmide durch die entstandenen Poren einfacher in die Zellen gelangen können. Für die Elektroporation wurden die verschiedensten Geräte und Protokolle entwickelt, um das Injektionsgebiet mit geeigneten Strompulsen zu behandeln [15, 16].

Optimierung des Plasmids

Entscheidenden Einfluss auf die Proteinexpression haben auch die Struktur und die Funktionselemente des Plasmids. Ein als DNA-Impfstoff eingesetztes Plasmid besteht gewöhnlich aus einem Promotor, einer Polyadenylierungssequenz, dem Replikationssteuerungssignal des Plasmids in Bakterien (*ori*) sowie der inserierten Gensequenz selbst. All diese Elemente haben natürlich einen Einfluss auf die Expression des Antigens und bedürfen mithin der Optimierung [17]. So führt z.B. der CMV-Promotor aus dem Cytomegalievirus im Vergleich zu anderen Promotoren zu einer starken Expression des Gens in menschlichen Zellen. Flankierende Sequenzen im Bereich der Initiationsstelle beeinflussen die Erkennung durch Ribosomen und damit auch die Translation. Die Modifikation oder das Einfügen entsprechender besonders geeigneter Sequenzen können die Proteinexpression verstärken.

Eine Aminosäure kann durch verschiedene Kodons kodiert werden, wobei Spezies-abhängig manche Kodons effizienter translatiert werden als andere. Entsprechende Anpassungen an den Kodon-Gebrauch in den Zellen des „Impflings“ ermöglichen eine Optimierung der Translationseffizienz.

Eine weitere mögliche Modifikation besteht darin, statt eines ausgewählten Gens ein gesamtes virales Replikon ein-

zubauen. Hierbei werden neben dem Antigen auch alle viralen Enzyme kodiert, die für eine Vermehrung der RNA in der Wirtszelle erforderlich sind. Man geht davon aus, dass dies zu einer Aktivierung verschiedener unspezifischer antiviraler Signalwege in der Wirtszelle führt. Damit könnte neben der humoralen und zellulären Immunität ein weiterer Abwehrmechanismus der Zelle aktiviert werden.

Optimierung der Formulierung

Zur Verstärkung der Immunantwort können neben dem ausgewählten Antigen weitere Substanzen bzw. entsprechende Gene appliziert werden. Naheliegender ist die Kombination mit Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren oder weiteren Antigenen, die die Immunantwort modulieren können. Generell hat man die Erfahrung gemacht, dass das Hinzufügen auf dem gleichen Plasmid effizienter ist als das Hinzufügen eines zweiten Plasmids. Ergebnisse, zumeist aus präklinischen Untersuchungen, liegen für verschiedene Interleukine wie IL-2, IL-12, IL-15 und IL-18, aber auch GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) vor. GM-CSF kann die Vermehrung und Differenzierung dendritischer Zellen stimulieren und damit Einfluss auf die Immunantwort nehmen [11].

Ergänzung des DNA-Impfkonzeptes durch Vektor-Impfstoffe

Erfolg versprechend ist derzeit vor allem ein abgewandeltes Konzept, bei dem nach der Erstimmunisierung (*Priming*) mit einem DNA-Impfstoff eine Boosterung mit einem Vektor-Impfstoff oder dem entsprechenden Antigen

selbst erfolgt. Vektor-Impfstoffe folgen demselben Prinzip wie DNA-Impfstoffe. Zur Verbesserung der DNA-Übertragung auf Körperzellen *in vivo* wird das für ein Antigen oder Teile eines Antigens kodierende Gen mittels eines Vektorpartikels übertragen, das statt der Plasmid-DNA inokuliert wird. Beispiele für Vektorpartikel, die in Vektor-Impfstoffen verwendet und in der klinischen Prüfung erprobt werden, sind adenovirale Vektoren, MVA- (*Modified Vaccinia Ankara*)-Vektoren und AAV- (*Adeno-associated Virus*)-Vektoren [18, 19].

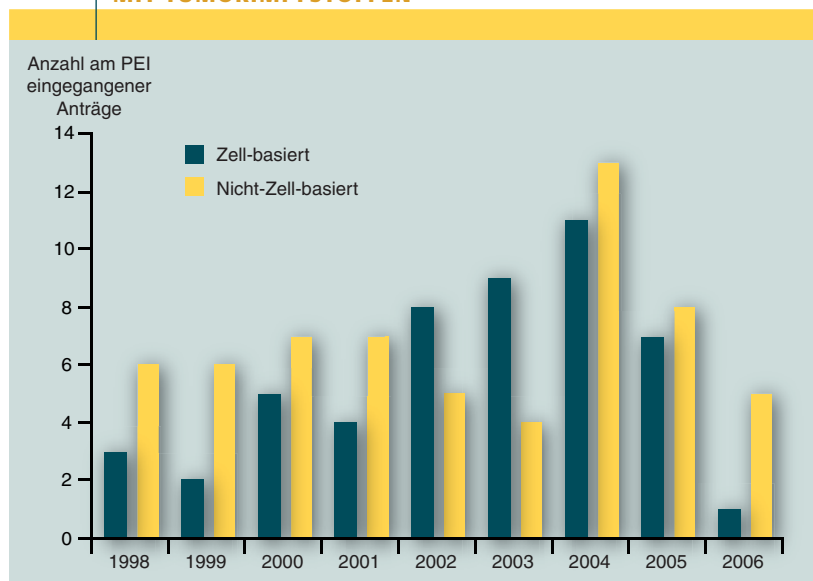
Sicherheit von DNA- und Vektor-Impfstoffen

Bisherige klinische Prüfungen haben für die DNA- und Vektor-Impfstoffe im Rahmen der Beobachtungszeit von mehreren Jahren eine sehr gute Sicherheit gezeigt [20]. Diese Impfstoffe sind sehr gut verträglich und zeigen häufig wenig lokale Reaktion und geringe Nebenwirkungen wie Fieber, die von herkömmlichen Impfstoffen bekannt sind. Allerdings konzentriert sich die Sicherheitsdiskussion weiterhin auf das theoretische Risiko der chromosomalen Integration des für das Antigen kodierenden Gens. Nach Genaufnahme durch Muskel-, Haut- oder andere Körperzellen wird das für das Antigen kodierende Gen bei DNA-Impfstoffen und bei Vektorpartikeln, die Gene in Form von in DNA umschreibbarer RNA übertragen, in den Zellkern aufgenommen. Hier kann eine Integration in das Erbgut der Körperzelle erfolgen. Bekannte Folge einer solchen Integration kann mit sehr geringer Häufigkeit eine Tumorbildung sein. Bei DNA-Impfstoffen ist die chromosomale Integration in präklinischen Tierversuchen kaum feststellbar, die Tumorinduktion wurde nie beobachtet. Präklinische Versuche zur Feststellung der Häufigkeit der chromosomalen DNA-Integration und ein negativer Test auf Tumorbildung sind jedoch im Allgemeinen Voraussetzung für die klinische Prüfung eines neuen DNA- oder Vektor-Impfstoffes (EMA/273974/2005).

Zellbasierte Tumorimpfstoffe

In zunehmendem Maße werden zur Behandlung maligner Tumore neben Chemotherapeutika biologische Arzneimittel wie monoklonale Antikörper, Zytokine und somatische Zellen eingesetzt. Während von den Behörden zugelassene monoklonale Antikörper und Zytokine bereits in der onkologischen Routineanwendung sind, befinden sich Zell-Immuntherapeutika noch in der klinischen Erprobungsphase. Prinzipiell lassen sich zwei auf lebenden Zellen beruhende immuntherapeutische Ansätze zur Tumorthherapie unterscheiden. Bei den modifizierten bzw. manipulierten Zellen enthaltenden Tumor-Impfstoffen kommen Zellen als Träger von Tumorantigenen als Impfstoffe zum Einsatz. Ziel hierbei ist die Induktion einer spezifisch gegen den Tumor gerichteten, insbesondere auf CD4- und CD8-T-Zellen beruhenden, Immunantwort. Bei der adoptiven Tumor-Immuntherapie können tumorspezifische T-Lymphozyten aus Tumorgewebe isoliert und *in vitro* zu großer Zahl vermehrt werden. Die so gewonnenen T-Zellen stehen zur Reinfusion

ABB. 3 ANTRÄGE ZUR GENEHMIGUNG KLINISCHER STUDIEN MIT TUMORIMPFSTOFFEN



Anzahl der im Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Anträge zur Genehmigung klinischer Studien mit Tumorimpfstoffen. Gentherapeutische Ansätze sind nicht berücksichtigt. Gezeigt ist die Anzahl von auf Zellen basierenden Tumorimpfstoffen gegenüber anderen Ansätzen (Non-cell-based). Zu letzteren gehören z.B. solche auf Basis von Peptiden oder Proteinen.

in denselben Patienten zur Verfügung, was einer passiven Immunisierung gleichkommt. Zurzeit gibt es weder in der EU noch in den USA ein im Markt befindliches und auf Zellen beruhendes zelluläres Immuntherapeutikum zur Tumortherapie.

Beispiele zellbasierter Tumorimpfstoffe

Ein Ansatz zur Immunisierung gegen Tumoren beruht auf Tumorzellen selbst. Tumore exprimieren tumorspezifische Antigene oder Antigene, die im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert sind [21]. Die Verwendung ganzer Tumorzellen anstelle nur eines definierten Antigens hat den Vorteil, dass alle in diesem Tumor vorhandenen Tumorantigene prinzipiell für die Immunisierung zur Verfügung stehen. Nach operativer Entfernung von Tumorgewebe und der Herstellung einer auf Einzelzellen beruhenden Zellsuspension schließt sich in der Regel deren gentherapeutische Modifizierung oder sonstige Modifizierung bzw. Bearbeitung (Englisch: *manipulation*), z.B. mittels Zytokinen, an.

Die Tumorzellen werden entweder dem Spender zurückgegeben (autolog) oder daraus hergestellte Zelllinien stehen für die Behandlung anderer Patienten zur Verfügung (allogen). Natürlich ist zu gewährleisten, dass die Tumorzellen vor deren Applikation nicht vermehrungsfähig sind, z.B. durch Behandlung mit γ -Strahlung. Die Ergebnisse der bisher mit Tumorzellen durchgeführten klinischen Studien sind ernüchternd, wurden doch erst vor kurzem zwei große Phase-III-Studien mit dem Präparat Canvaxin nach Interimsanalyse mangels hinreichender Hinweise auf Wirksamkeit abgebrochen [22]. Die Ergebnisse anderer klinischer Phase-III-Studien, insbesondere mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, die das Zytokin GM-CSF sezernieren, zeigten zum Teil viel versprechende Ergebnisse [23].

Ein weiterer zellbasierter Ansatz zur Tumortherapie beruht auf dendritischen Zellen (DC), die als einziger Zelltyp des Immunsystems befähigt sind, Antigen zusammen mit so genannten kostimulatorischen Molekülen den T-Lymphozyten optimal zu präsentieren [24]. Zur klinischen Anwendung werden DC aus Monozyten oder aus CD34⁺-Vorläuferzellen des peripheren Blutes gewonnen, die in Zellkultur zu unreifen DC differenzieren. Daran schließt sich die Beladung mit Tumorantigenen und die finale Maturierung der DC an (Abb. 2). Die Beladung der auf der DC-Zelloberfläche exprimierten HLA-Moleküle geschieht z.B. mit von Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden, mit Proteinen oder mittels Transfektion von Tumorantigen-kodierender mRNA in die DC.

Ein Beispiel eines klinisch weit entwickelten DC-Tumorimpfstoffes ist eine Vakzine zur Behandlung des metastasierten und hormonresistenten Prostatakarzinoms [25]. Als Antigen zur DC-Beladung dient hier PAP (*prostatic acid phosphatase*). Dieser Tumor-Impfstoff wurde der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) zur Zulassung vorgelegt. Spekuliert wird derzeit, dass bei Nachweis einer signifikant erhöhten

Überlebensdauer von mit Impfstoff behandelten Patienten im Vergleich zu mit Placebo behandelten Patienten dies der erste zellbasierte Tumorimpfstoff mit einer Marktzulassung in den USA werden könnte.

Adoptiver Transfer tumorspezifischer T-Zellen

T-Zellen infiltrieren Tumoren, sind aber aufgrund inhibitorischer Signale z.B. von regulatorischen CD4-T-Zellen nicht hinreichend funktional [26]. Die in den Tumoren vorhandenen T-Zellen können isoliert und *ex vivo* stark expandiert werden. Die Infusion der autologen (also vom Patienten selbst stammenden) tumorspezifischen T-Lymphozyten bewirkte in klinischen Studien bei bis zu 51 % der Patienten mit metastasiertem malignem Melanom eine objektive Tumorregression [27, 28].

Kombinierte Behandlungsstrategien

Eine Strategie zur Erhöhung der Wirksamkeit therapeutischer Tumorimpfstoffe ist die Kombination mit anderen immun-modulatorischen Präparaten, was übrigens auch für andere als die zellbasierten Tumorimpfstoffe gilt. So wird z.B. nach adoptivem Transfer von tumorspezifischen T-Zellen das Zytokin IL-2 gegeben, was zur Persistenz und Funktionalität der transferierten T-Lymphozyten beitragen soll [27]. Weiterhin wird die Abschaltung inhibitorischer Komponenten des Immunsystems vor oder während der Immunisierung angestrebt. Ein Beispiel ist die Deletion inhibitorischer CD4-T-Zellen vor der Immunisierung mittels Cyclophosphamid. Andererseits können mittels spezifischer monoklonaler Antikörper Moleküle wie CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen blockiert werden, deren physiologische Funktion die Herunter-Regulation der Immunantwort ist [26].

Zulassung zellbasierter Tumorimpfstoffe

Klinische Prüfungen mit zellbasierten Tumorimpfstoffen unterliegen seit dem Jahr 2004 der Genehmigung durch die zuständige Bundesbehörde (Paul-Ehrlich-Institut) und der Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission. Nach Einführung der Genehmigungspflicht ist die Anzahl der beim Paul-Ehrlich-Institut eingegangenen Genehmigungsanträge rückläufig (Abb. 3). Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass seither die Herstellung von in klinischen Prüfungen eingesetzten zellbasierten Tumorimpfstoffen nach den Prinzipien der EU-Richtlinie für *Good Manufacturing Practice* (GMP) erfolgen muss (*Commission Directive* 2003/94/EC). Davon sind insbesondere Forschungseinrichtungen an Universitätskliniken betroffen, wo die relativ strengen GMP-Anforderungen meist noch nicht implementiert sind.

Außerhalb von klinischen Studien dürfen somatische Zelltherapeutika in Deutschland nur nach deren Zulassung in den Markt gebracht werden. Eine speziell auf somatische Zellen zugeschnittene *Guideline* ist zurzeit von Seiten der EMEA in Vorbereitung (CHMP/410869/06). Der Entwurf einer weiteren Leitlinie der EMEA (*Guideline*) befasst sich

mit der quantitativen Bestimmung der biologischen Aktivität (*Potency*) zellbasierter Tumorimpfstoffe (CHMP/BWP/271475/06).

Zitierte Literatur

- [1] Sitzmann, F.C.: Der Wandel des Infektionsgeschehens durch Schutzimpfungen: über die Notwendigkeit von Impfungen. *Sozialpädiatrie* 13 (1991), 690-698.
- [2] Ellis, R.W.: New technologies for making vaccines. *Vaccine* 17 (1999), 1596-1604.
- [3] Plotkin, S.A.: Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* 11 (2005), S5-S11.
- [4] Pfeleiderer, M.: Die Zulassung von Influenzaimpfstoffen – vom saisonal aktualisierten Impfstoff zum Pandemiefall. *ImpfDialog* 4 (2005), 175-182.
- [5] Pfeleiderer, M.: Pandemische Influenzaimpfstoffe-Optionen und Stand der Entwicklung. *Epi. Bull.* 44 (2006), 382-385.
- [6] Zündorf, I., Dingermann, T.: Grippeimpfstoffe im Zeichen von Epidemie und Pandemie. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1 (2007), 3001-3009.
- [7] Meeusen, E.N.T., et al.: Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2007), 489-510.
- [8] Adu-Bobie, J., et al.: Two years into reverse vaccinology. *Vaccine* 21 (2003), 605-610.
- [9] Lattanzi, M., et al. The future of vaccines. *Microbiology today* (Feb. 2006), 9-11.
- [10] Sala, F., et al.: Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21 (2003), 803-808
- [11] Liu, M.A., et al.: DNA vaccines: Recent developments and future possibilities. *Hum. Gene Ther.* 17 (2006), 1051-1061.
- [12] Wolff, J.A., et al.: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 (1990), 1465-1468.
- [13] Ulmer, J.B., et al.: Heterologous protection against influenza b injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 (1993), 1745-1749.
- [14] Liu, M.A.: DNA vaccines : A review. *J. Int. Med.* 253 (2003), 402-410.
- [15] Widera, G., et al.: Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J. Immunol.* 164 (2000), 4635-4640.
- [16] Luckay, A., et al.: Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune response in Rhesus macaques. *J. Virol.* 81 (2007), 5257-5269.
- [17] Garmory, H.S., et al.: DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet. Vaccines Ther.* 1 (2003), 2.
- [18] Dunachie, S.J., Hill, A.V.S.: Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *J. Exp. Biol.* 206 (2003), 3771-3779.
- [19] McConnell, M.J., et al.: Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against Anthrax. *Mol. Ther.* 15 (2007), 203-210.
- [20] Glenting, J., Wessels, S.: Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.* 4 (2005), 26.
- [21] Parmiani, G., et al.: Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J. Immunol.* 178 (2007), 1975-1979.
- [22] Copier, J., et al.: Overview of tumor cell-based vaccines. *Int. Rev. Immunol.* 25 (2006), 297-319.
- [23] Hege, K.M., et al.: GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men. *Int. Rev. Immunol.* 25 (2006), 321-352.
- [24] Osada, T., et al.: Dendritic cell-based immunotherapy. *Int. Rev. Immunol.* 25 (2006), 377-413.
- [25] So-Rosillo, R., et al.: Sipuleucel-T (APC8015) for prostate cancer. *Exp. Rev. Anticancer Ther.* 6 (2006), 1163-1167.
- [26] Emens, L.A.: Roadmap to a better therapeutic tumor vaccine. *Int. Rev. Immunol.* 25 (2006), 415-443.
- [27] Dudley, M.E., et al.: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298 (2002), 850-854.

- [28] Dudley, M.E., et al.: Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23 (2005), 2346-2357.

Die Autoren:



Dr. Jürgen Scherer (geb. 1960); Biologiestudium an der Universität Mainz; 1991 Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung; zweijähriger Postdoc-Aufenthalt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin; seit 1993 am Paul-Ehrlich-Institut, zunächst im FG ‚Rekombinante Impfstoffe‘, von 1996 bis 2007 im FG ‚Virusimpfstoffe‘, und seit April 2007 kommissarischer Leiter des FG ‚Arzneimittel für neuartige Therapien, Gewebezubereitungen‘.



Dr. Thomas Hinz (geb. 1960); Biologiestudium an der Uni Giessen; 1992 Promotion im Fach Molekularbiologie; 1992 Postdoc am DKFZ in Heidelberg; seit 1993 als Postdoc am Paul-Ehrlich-Institut; seit 1999 Leiter des Fachgebiets Therapeutische Impfstoffe.



Prof. Dr. Klaus Cichutek; 1976-1984 Studium Chemie, Hauptfach Biochemie, Diplomarbeit und Promotion in Biochemie, Nebenfach Pharmakologie, an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster; 1985-1988 Forschungsaufenthalt im Molecular Biology and Virus Laboratory der University of California, Berkeley, USA, als DFG-Stipendiat und Stipendiat der University of California; 1988-1994 Leiter der Forschungsgruppe „Molekularbiologie“ am Paul-Ehrlich-Institut, Langen; seit 1994 Leiter der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ am Paul-Ehrlich-Institut, Langen; seit 1998 apl. Prof. im Fachbereich Biochemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M. nach Habilitation im Jahr 1992; seit 2001 Vizepräsident des Paul-Ehrlich-Instituts, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Langen.

Anschrift:

Prof. Dr. Klaus Cichutek
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen
cickl@pei.de