

## 3 SLN als Impfstoffadjuvantien

### 3.1 Einleitung

#### 3.1.1 Impfstoffadjuvantien

Impfungen bieten die kostengünstigste Möglichkeit, Infektionskrankheiten zu bekämpfen. Der Zusatz von Adjuvantien zu einer Vakzine kann die Menge des notwendigen Antigens reduzieren. Somit wird der Preis der Vakzine verringert, wenn das relativ teure Antigen durch ein billiges Adjuvans ersetzt wird. Ebenso läßt sich die Anzahl der für einen ausreichenden Infektionsschutz notwendigen Impfungen reduzieren, wodurch die Compliance gefördert und die Kosten für die Arztkonsultationen gesenkt werden. Mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellte Subunit-Vakzinen sind zwar sicherer als lebende attenuierte oder abgetötete Mikroorganismen, zeigen aber auch eine geringere Immunogenität [Vogel 2000] und erfordern den Zusatz von potenten Adjuvantien.

Die Bezeichnung **Adjuvans** kommt vom lateinischen Wort „adjuvare“, was helfen und unterstützen bedeutet. Ein immunologisches Adjuvans ist eine Substanz, die wenn sie einer Vakzine zugesetzt ist, die spezifische Immunantwort des Organismus auf das Antigen verstärkt, verlängert oder verändert. Neue Adjuvantien sollten also eine stärkere Immunantwort induzieren und bzw. oder die Dauer des Infektionsschutzes verlängern.

Die Wirkweise von Adjuvantien beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Adjuvantien können einen sogenannten **Depot-Effekt** bewirken. Dieser ist für gelartige Adjuvantien, wie Aluminiumhydroxid oder Emulsionen wie Freund's unvollständiges Adjuvans (engl. Freund's incomplete adjuvant, FIA) nachgewiesen [Shirodkar et al. 1990]. Der Depoteffekt führt zu einer verlängerten biologischen und immunologischen Halbwertszeit. Besonders kleine Antigene, die schnell von der Einstichstelle abtransportiert werden, können durch die Assoziation mit diesen Adjuvantien effektiver zu den Lymphknoten gebracht werden. Des weiteren wird sowohl die Antigen-Aufnahme als auch die Prozessierung und Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC) gefördert [Lindbald et al. 1997].

Adjuvantien können auch eine gesteigerte Produktion **immunmodulierender Zytokine** induzieren. Sie fördern die verschiedenen durch T-Helferzellen vermittelten Immunantworten [Mosmann und Coffman 1989]. Man unterscheidet die T-Helferzell-Reaktion Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2). Bei Th1 wird überwiegend Interferon- $\gamma$  und Interleukin-2 gebildet, bei Th2 überwiegend Interleukin-4 und -5. Die Th1-Reaktion führt zu verstärkter zellulärer Immunität (zytotoxische T-Zellen) während die Th2-Reaktion durch Induktion hoher Antikörpertiter die humorale Immunität unterstützt. Aluminium-Adjuvantien stimulieren vorwiegend die Th2-Reaktion [Mosman und Coffman 1989]. Saponin-Adjuvantien und Lipopolysaccharide führen vorwiegend zu einer Th1-Reaktion [Ulrich und Myers 1995]. Die zellvermittelte Immunität trägt wesentlich zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, wie Mycobakterien, Listerien, Leishmanien und HIV bei. Die antikörpervermittelte Immunität dagegen schützt gegen extrazelluläre Pathogene.

Der Gesamteffekt eines Adjuvans resultiert aus dem Zusammenspiel multipler Faktoren und läßt sich nicht auf einen einzigen Mechanismus reduzieren [Donnelly 1997]. Aufgrund dessen ist die Anwendbarkeit von in vitro Tests zum Screenen und Entwickeln neuer Adjuvantien begrenzt [O'Hagan et al. 1997]. Der Einsatz beschränkt sich wenn überhaupt auf Versuche zur Aufklärung der Wirkmechanismen.

Die geschichtliche Entwicklung von Impfstoffadjuvantien beginnt in den Zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Ramon beobachtete, daß Pferde, die an der Einstichstelle einer Diphtherie-Impfung einen Abszeß bildeten, stärkere Antitoxintiter entwickelten als Tiere, bei denen dies nicht auftrat [Ramon 1926]. Im selben Jahr beschrieb Glenny die adjuvante Wirkung von **Aluminiumhydroxid** in Diphtherie-Toxoid Vakzinen [Glenny et al. 1926]. In den Dreißiger Jahren entwickelte Freund die Formulierung die bis heute zu den stärksten Adjuvantien zählt [Freund et al. 1937]. Er mischte zu einer W/O-Emulsion aus wäßriger Antigen-Suspension und Paraffinöl abgetötete Mycobacterien tuberculosis. Diese Zubereitung wird als **Freunds vollständiges Adjuvans** bezeichnet (FCA). Ein großer Nachteil sind aber die starken lokalen Entzündungen an der Einstichstelle, die zur Entwicklung von Granulomen oder sterilen Abszessen führen [Allison und Byars 1991]. Aufgrund der starken Gewebereaktionen, darf FCA bei Menschen nicht angewendet werden. Bei Tieren wird FCA nur zu experimentellen Zwecken eingesetzt. Freunds unvollständiges Adjuvans (FIA), daß keine Mycobacterium tuberculosis enthält, wird in einigen veterinären Vakzinen eingesetzt. FIA hat eine geringere adjuvante Wirkung als FCA. Die lokalen Nebenwirkungen von FIA sind geringer als bei FCA, aber noch immer erheblich [Schmidt et al.

1996]. Die Verträglichkeit kann durch andere Kombinationen von Ölen und Tensiden in Hinblick auf das verwendete Antigen optimiert werden [Chang et al. 1998]. Heutzutage wird FIA wegen der noch immer erheblichen Nebenwirkungen, wie Granulomen oder Zystenbildung an der Injektionsstelle, nicht mehr beim Menschen eingesetzt [Murray et al. 1972, Gupta et al. 1993]. Die Wirkung von FIA basiert auf Depotbildung, denn die Injektion von FIA und Antigen an unterschiedlichen Stellen erhöht die Immunantwort nicht [Freund 1956].

Johnson entdeckte 1956 die adjuvante Wirkung von Endotoxinen gram-negativer Bakterien [Johnson et al. 1956]. Ellouz identifizierte 1974 Muramyldipeptid (MDP) als die kleinste adjuvantwirkende Komponente von *Mycobacterium tuberculosis* [Ellouz et al. 1974]. Erst in letzter Zeit fand man heraus, daß die unmethylierte CpG-Sequenz der mycobacteriellen DNA für die starke immunstimulierende Wirkung verantwortlich ist [Sun 1998].

Die bisher einzigen für die humane Anwendung zugelassenen Adjuvantien sind Aluminiumverbindungen [Shirodkar et al. 1990] und MF59 [Ott et al. 1995].

Die zumeist eingesetzten Aluminium-Adjuvantien bestehen aus Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat. Das Antigen ist dabei durch elektrostatische Bindung an die Partikel adsorbiert und so in das Gel inkorporiert. Die Vakzine wird physikalisch und chemisch stabilisiert und es kommt zur Depotbildung. Des weiteren wird die Aufnahme in APC gefördert und immunkompetente Zellen durch Aktivierung des Komplementsystems stimuliert [Gupta 1998]. Dies führt zu einer schnelleren, stärkeren und länger anhaltenden Immunität. [Gupta et al. 1995]. Allerdings zeigt sich dieser Vorteil nur bei der ersten Immunisierung und nicht mehr bei den Boosterungen [Aprile und Wardlaw 1966, Gupta et al. 1995]. Probleme bereiten lokale Reaktionen wie Erytheme [Collier et al. 1979], subkutane Knoten [Frost et al. 1985] und Granulome [White et al. 1955, Erodohazi und Newman 1971], die besonders bei den Boosterungen auftreten [Blennow et al. 1994]. Ebenfalls kommt es zur Stimulation von IgE Antikörpern, was IgE-vermittelte allergische Reaktionen fördern kann [Nagel et al. 1977, Odelram et al. 1994, Mark et al. 1995]. Aluminium-Adjuvantien sind nicht bioabbaubar [Gupta et al. 1997]. Sie können auch keine zellvermittelte Immunantwort induzieren und sind deshalb ungeeignet für Vakzinen gegen intrazelluläre Parasiten und virale Infektionen, wie z. B. das HI-Virus [Cox und Coulter 1997].

**MF59** ist eine O/W-Emulsion aus 4.3 % (w/v) Squalen, 0,5 % (w/v) Tween 80 und 0,5 % (w/v) Span 85. Squalen ist ein Triterpen, das in Säugern als natürliche Vorstufe des Cholesterols vorkommt. Die Kombination von Tween 80 und Span 85 stabilisierte schon die Emulsionen nach Woodard [Woodard 1989]. Er fand heraus, daß Tween 80 in O/W-Emulsionen eine adjuvante Wirkung zeigt. Die Wirkung und Stabilität konnte durch den Zusatz von Span 85 noch erhöht werden. Bei der Optimierung der Formulierung von MF59 zeigte sich, daß ein Zusatz von Muramylpeptid nicht notwendig war, da ohne diesen Zusatz die gleiche Effizienz erreicht werden konnte [Ott et al. 1995]. Ebenso erkannte man, daß Emulsionen mit einer mittleren Partikelgröße von 200-300 nm effektiver sind als größere mit bis zu 1000-2000 nm [Ott et al. 1995]. Vermutet wird, daß die kleineren besser in Makrophagen aufgenommen werden. Da zum Erreichen einer adjuvanten Wirkung das Adjuvans und das Antigen auch an unterschiedlichen Stellen injiziert werden können, wirkt MF59 nicht durch Bildung eines Depots [Valensi et al. 1994]. MF59 wird zu den Lymphknoten transportiert und induziert die Bildung von Interleukin-2, -4, -5, -6 und Interferon- $\gamma$  [Valensi et al. 1994]. MF59 stimuliert sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort. Die Wirksamkeit und Sicherheit von MF59 als Adjuvans von Vakzinen mit rekombinanten viralen Antigenen wurde in präklinischen Tierstudien [Ott et al. 1995] und in zahlreichen klinischen Studien [Langenberg 1995, Kahn 1994, Wang 1996] bewiesen. Getestet wurden Vakzinen gegen intrazelluläre Parasiten wie HI, Zytomegalie, Hepatitis B, Herpes simplex und Influenza Viren. Als Nebenwirkung treten gelegentlich vorübergehende Erytheme an der Einstichstelle und influenzaartige Symptome auf [Langenberg 1995]. MF59 ist bereits in Form zweier Influenza-Vakzinen auch auf dem deutschen Markt (Fluad<sup>®</sup>, Chiron Behring und ADDIGRiP<sup>™</sup>, MSD).

Weitere sich in der Entwicklung befindene Adjuvantien sind: Lipopolysaccharide [Johnson et al. 1956], Liposomen [Fortin und Therien 1993], Zytokine [Nunberg et al. 1989], Sapnine [Espinet 1951] und Polymere [Hunter und Bennett 1984].

**Lipopolysaccharide** kommen in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien vor. Seit 1956 ist bekannt, daß diese Lipopolysaccharide einen adjuvanten Effekt haben [Johnson et al. 1956]. Es konnte gezeigt werden, daß die in FCA enthaltenen Mycobakterien durch Bausteine der Kapselsubstanz ersetzt werden konnten, was zu besserer Verträglichkeit führte. Besonders oft beschrieben wurde MDP (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, syn. Muramyl-dipeptid) [Adam und Lederer 1984] und das GMDP (N-Acetylglucosaminyl-N-Acetylmuramyl-Dipeptid) [Grubhofer 1995]. Diese Verbindungen

steigern zwar die Immunantwort, doch treten gravierende Nebenwirkungen, wie Pyrogenität, Leukozytose, Uveitis und Adjuvans-Arthritis auf. Die Einarbeitung in Liposomen [Alving et al. 1992] oder O/W-Emulsionen [Sanchez-Pescador et al. 1988] reduziert die Toxizität. Der adjuvante Effekt konnte gleichzeitig sogar erhöht werden. Die Mischung von GMDP mit kolloidalen Feststoffpartikeln führt zu einer stärkeren humoralen Immunantwort [Grubhofer 1955]. Ein weiteres molekulares Adjuvans ist Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB) [Hilgers und Snippe 1992].

Als Adjuvantien eingesetzte **Liposomen** bestehen in der Regel aus bioabbaubaren Verbindungen wie Phospholipiden und können mit neutralen Helferlipiden, wie zum Beispiel Cholesterol kombiniert werden. Die adjuvante Wirkung beruht zum einem auf einem Depot-Effekt [Fortin und Therien 1993]. Hydrophile Antigene lagern sich in die wassergefüllten, von Lipiddoppelschichten umgebenen Innenräume der Liposomen ein, amphiphile und lipophile befinden sich in der Lipiddoppelschicht. Zum anderen werden die Antigene den Makrophagen präsentiert und leichter phagozytiert [van Rooijen 1992]. Liposomen fördern sowohl die zellvermittelte als auch die humorale Immunantwort [Pietrobon 1995, White et al. 1995]. In die Liposomen eingeschlossene Immunstimulatoren wie Lipopolysaccharide, Muramyl-Dipeptid oder Monophosphoryl-Lipid A [Alving 1993] fördern überdies die adjuvante Wirkung. Ähnliche Effekte wurden für den Zusatz von Interleukin 12 und 4 beschrieben [Lachman et al. 1995]. Liposomen weisen einige bedeutsame Nachteile auf: Ihre Produktion ist teuer, sie sind wenig lagerstabil und das Scaling-up ist – je nach Verfahren - schwierig. In Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren können Lösungsmittelrückstände enthalten sein. Schließlich wurden Empfindlichkeiten gegenüber körpereigenen Phospholipasen beobachtet. Das alles wird wohl dazu beigetragen haben, daß noch kein Produkt mit liposomalen Adjuvantien auf dem Markt ist.

**Saponine** sind eine heterogene Gruppe von Sterol- und Triterpenglycosiden. Seit den Fünfziger Jahren werden Saponine als immunstimulierendes Adjuvans in Tiervakzinen eingesetzt [Espinet 1951]. Saponine formen mit Cholesterol und Phospholipiden käfigartige Partikel von etwa 40 nm Durchmesser [Morein et al. 1987]. Die Wirkweise setzt sich aus verschiedenen Effekten zusammen: Depotbildung, Targeting zu den lymphatischen Organen, verbesserte Aufnahme durch die APC und andere immunmodulierende Effekte [Cox und Coulter 1997]. Formulierungen für die humane Anwendung gibt es noch nicht, denn die Komplexität der Saponine und eine zu hohe Toxizität [George 1965] hat ihren Einsatz bisher limitiert.

**Mikropartikel** aus bioabbaubaren Polymeren wie Poly-laktid-co-glykolid (PLGA) oder Block-Copolymeren bilden ein Antigendepot. Durch den Abbau des Polymers wird das Antigen verzögert freigesetzt [Cleland et al. 1996]. Manchen der Polymere, wie nichtionische Block-Copolymere, wird auch eine eigene immunstimulierende Wirkung zugeschrieben [Hunter und Bennett 1984]. Ein entsprechendes Produkt gibt es noch nicht. Dies ist auf eine Reihe von Problemen, wie der geringen Stabilität des Antigens während der Herstellung der Mikropartikel, der mangelnden Lagerstabilität und der Hydrolyse der Mikropartikel zurückzuführen.

Für **Zytokine**, wie Interleukin-2, Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$  konnte in Tiermodellen eine adjuvante Wirkung nachgewiesen werden [Odean et al. 1990, Nunberg et al. 1989, Luis et al. 1994]. Diese auch natürlich vorkommenden Zytokine werden in der Gewebsflüssigkeit jedoch sehr schnell inaktiviert. Diese Substanzen müssen also vor dem zu schnellen Abbau geschützt werden [Jankovic et al. 1997].

Als Ergebnis der vorstehenden Betrachtungen läßt sich festhalten, daß die Anforderungen an ein optimales Adjuvans, wie die Sicherheit, Effizienz, Stabilität, Kostengünstigkeit und universelle Einsetzbarkeit bisher nicht in einem Adjuvans vereinigt werden konnten.

#### 3.1.2 SLN als Impfstoffadjuvantien

Vor dem Hintergrund der bisherigen Überlegungen lag es nahe, die Anwendbarkeit von SLN als Impfstoffadjuvans zu untersuchen. Beim Vergleich mit bestehenden Systemen fallen die Ähnlichkeiten zu MF59 auf. Beide Systeme sind Dispersionen mit innerer Fettphase und äußerer Wasserphase. Es handelt sich in beiden Fällen um biokompatible und bioabbaubare Zubereitungen. Eine Formulierung mit Partikelgrößen im selben Größenbereich wie MF59 ist ohne weiteres möglich. Ebenfalls ist eine Sterilisierung leicht durchzuführen. Vorteilhafte Unterschiede sind die einfache Möglichkeit, die Oberfläche dieser festen Teilchen nach Wunsch zu modifizieren und die Option, durch diese Maßnahmen Antigene auf der Oberfläche binden zu können. Dies würde zu einem Depoteffekt führen, den MF59 nicht bietet. Des weiteren werden die festen Fettpartikelchen langsamer abgebaut als eine flüssige Emulsion. SLN können sehr einfach und billig produziert werden und sind lyophilisierbar [Schwarz und Mehnert 1997].

In Hinblick auf die Verringerung der Toxizität molekularer Adjuvantien durch die Integration in Liposomen oder Emulsionen und der gleichzeitigen Effektivitätssteigerung, lag es nahe, diese Eigenschaften auch für SLN zu untersuchen. Eine dem DDAB chemisch sehr ähnliche Substanz ist N,N-Di-( $\beta$ -stearoyl-ethyl)-N,N-dimethyl-ammoniumchlorid (syn.: Esterquat 1, EQ1). Diese ist auch in den Produkten Adjuvant LQ<sup>®</sup> und Veterinary Vaccine Adjuvant<sup>®</sup> der Firma Gerbu Biotechnik GmbH enthalten. Diese zu veterinären Zwecken verwendeten Adjuvantien zeigen ebenfalls Ähnlichkeiten zu SLN-Systemen.

In ersten Versuchen wurden bereits zwei SLN Formulierungen auf ihre Eignung als Adjuvans getestet [Olbrich et al. 2000, Olbrich et al. 2001a]. Hierbei handelte es sich um SLN aus 4 % Paraffin und 4 % Tween 80/Span 85 (7:3) (S1). Die Menge des Lipids und die Tensidmischung entsprach der Zusammensetzung von MF59. Die Menge und das Mischungsverhältnis der Tenside orientierte sich an den Emulsionen von Woodard [Woodard 1989]. Die zweite Formulierung enthielt zusätzlich noch 1 % EQ1 (S2). Diese beiden SLN-Zubereitungen wurden in jeweils 5 Schafen mit einer Mycoplasma bovis Vakzine im Vergleich zu FIA getestet. Als Ergebnis zeigte sich, daß S1 43 % und S2 79 % der Effektivität von FIA zeigten. In einem zweiten Versuch wurden beide Formulierungen gegen Aluminiumhydroxid und eine Vakzine ohne Adjuvans getestet [Olbrich et al. 2001a]. Hier zeigten S1 und S2 fast identische Titer, die etwa gleich hoch waren, wie die mit Aluminiumhydroxid. Alle drei Formulierungen zeigten aber signifikant höhere Titer als ohne Adjuvans. Müller und Olbrich führten auch die Bezeichnung „Stabiles Biokompatibles Adjuvans“ (SBA) für Adjuvantien auf Basis von SLN ein [Müller et al. 2000c]. Obwohl beide Studien eher experimentellen Charakter aufwiesen, zeigten sie eindeutige empirische Anhaltspunkte für die Eignung von SLN als Impfstoffadjuvantien.

#### **3.1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Einsatzmöglichkeiten von SBA als immunologisches Adjuvans grundlegend zu erforschen. Zum einen sollten die für eine adjuvante Wirkung optimalen Parameter ermittelt werden. Zum anderen sollte die Formulierung hinsichtlich der Biokompatibilität und Stabilität optimiert werden. Des weiteren sollte untersucht werden, mit welchen Antigenen SLN besonders gut als Adjuvantien eingesetzt werden können. Schließlich sollten Hypothesen zur Wirkweise aufgestellt werden.

## **3.2 SLN als Adjuvans für die Vakzinierung von Hennen**

### **3.2.1 Versuchsplanung**

Dieser Vorversuch diente der Etablierung des Testverfahrens an Hennen. Untersucht werden sollte, inwiefern sich die Immunisierung von Hennen zur Bearbeitung unserer Fragestellungen eignet. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zweier SLN Formulierungen. Die eine bestand aus Hartparaffin (4 %) und Tween 80/Span 85 im Mischungsverhältnis von 7:3 (4 %) (A1). Die zweite enthielt zusätzlich noch EQ1 (A2) (Tabelle 3.1). Der Gehalt an Lipid ist dem Adjuvans MF59 nachempfunden. Das Tensidgemisch wurde ebenfalls in Anlehnung an MF59 gewählt. Die Tensidmenge und das Mischungsverhältnis orientierte sich an den Emulsionen von Woodard [Woodard 1989]. Zur Beurteilung des immunstimulierenden Effektes wurden die Antikörper aus dem Eidotter bestimmt. Die Gewebeverträglichkeit wurde durch die pathologische Beurteilung des Gewebes um die Einstichstelle herum beurteilt.

### **3.2.2 Herstellung der Adjuvantien**

Die Formulierungen wurden von Herrn Dr. Carsten Olbrich produziert. Hartparaffin wurde auf etwa 10°C oberhalb seines Schmelzpunktes erwärmt und mit der wässrigen Tensidlösung versetzt. Die Homogenisation erfolgte im beheizbaren kontinuierlich arbeitenden LAB 60 Homogenisator. Pro Charge wurden 1,5 kg produziert. Die Temperatur betrug 85°C. Als Haupthomogenisationsdruck wurde 500 bar gewählt. Am zweiten Homogenisationsventil herrschte ein Druck von 50 bar. Die Dispersionen wurden 30 min lang im Umlauf homogenisiert. Anschließend wurde in der Wärme mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Die Isotonisierung erfolgte mit wasserfreiem Glycerol.



Tabelle 3.1: Zusammensetzung der SLN-Formulierungen A1 und A2. Die Prozentangaben beziehen sich auf Massenprozent.

	Lipid	Tensid	Quart. Verbindung
A1	Hartparaffin 4 %	Tween80/Span85 (7:3) 4 %	keine
A2	Hartparaffin 4 %	Tween80/Span85 (7:3) 4 %	EQ1 1 %

### 3.2.3 Partikelgrößen und Zetapotentialbestimmung

Die Partikelgröße wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Laserdiffraktometrie (LD) bestimmt. Durch die Bestimmung des Zetapotentials wurden die Unterschiede der Oberflächenladung zwischen den beiden Partikeln bestimmt (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Partikelgrößen- und Zetapotentialbestimmung der Adjuvansformulierungen A1 und A2.

	PCS Durch- messer	PI	LD (99 %)	Zetapotential
A1	102 nm	0,140	0,152 µm	- 25,0
A2	103 nm	0,150	0,147 µm	+ 44,8

Die Messungen wurden nach drei Monaten wiederholt. Dabei konnte keine Veränderung der Partikelgröße festgestellt werden. Der Zusatz von EQ1 induzierte eine positive Oberflächenladung. Diese hat offensichtlich aber keinen Einfluß auf die unter den gegebenen Homogenisationsbedingungen entstehende Partikelgröße. Beide Formulierungen waren über einen Lagerungszeitraum von 12 Monaten bei Raumtemperatur stabil. Dies ist durch den im Verhältnis zum Lipidgehalt hohen Tensidgehalt begründet.

### 3.2.4 Testung an Hennen

#### 3.2.4.1 Immunisierungsschema

Als Vorversuch wurde pro Formulierung eine Henne immunisiert. Die Zusammensetzung der Vakzinen ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Vakzinen

	Antigenlösung	PBS	Adjuvans	Henne
Vakzine 1	100 µl	200 µl	300 µl A1	A1
Vakzine 2	100 µl	200 µl	300 µl A2	A2

Die Antigenlösung besteht aus inaktivierten *Mycoplasma bovis* (siehe 2.2.5.1). Den Hennen wurde jeweils 0,6 ml in den Pektoralmuskel injiziert. Die Boosterungen erfolgten am Tag 34 und am Tag 69 nach der Grundimmunisierung.

#### 3.2.4.2 Probennahme

Zur Verfolgung des Verlaufs der Antikörperentwicklung wurde von beiden Hennen jeweils jeden zweiten Tag ein Ei präpariert.

#### 3.2.4.3 Entwicklung des ELISA-Tests

Zur Antikörperbestimmung mußte ein ELISA entwickelt werden. Folgende Parameter mußten dafür experimentell ermittelt werden:

- Menge des Antigens mit der die Platte beschichtet wird
- Konzentration mit der die Proben vermessen werden
- Konzentration des enzymmarkierten Antikörpers
- Menge des Substrates
- Entwicklungsdauer.

Zu diesem Zweck wurden sogenannte Schachbrettplatten angefertigt, auf denen die verschiedenen Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen wurden (Abbildung 3.1).

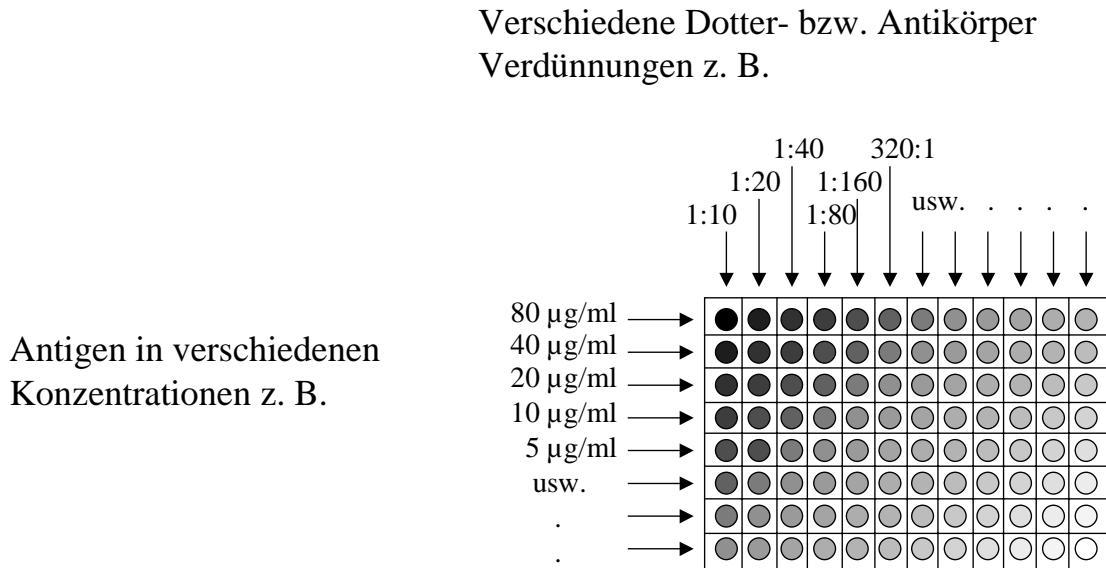


Abbildung 3.1: Beispiel einer sog. Schachbrettplatte (96 Well Mikrotiterplatte) zur Ermittlung der optimalen Antigenkonzentration und Antikörperverdünnung.

Durch die systematische Variation der verschiedenen Parameter ließen sich die geeigneten Konzentrationsverhältnisse ermitteln. Das Beschichtungsantigen, der enzymmarkierte Antikörper und das Chromogensubstrat mußten auf jeden Fall im Überschuß zugegeben werden, damit einzig der zu bestimmende Antikörper die limitierende Komponente war. Die Entwicklungszeit mußte immer genau eingehalten werden, da die Ergebnisse sonst stark verfälscht werden konnten. Wichtig war ebenfalls, in dem Bereich zu arbeiten, wo eine Verdünnungsreihe der Proben einen linearen Zusammenhang zwischen Verdünnungsgrad und Extinktion offenbart. Wird dies nicht sichergestellt, so kann es sein, daß sehr hohe Antikörperkonzentrationen fälschlich als geringer angesehen werden. Für jedes Huhn mußte in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Eiablage (Präimmun, nach der Grundimmunisierung, nach der 1. Boosterung und 2. Boosterung) jeweils die optimale Antikörperverdünnung gefunden werden. Bei Verdünnungsreihen zeigte sich, daß Proben beider Hennen im gleichen Konzentrationsbereich lagen. Somit konnten sie in der selben Verdünnung vermessen werden.

Für diesen Assay wurde folgende Arbeitsvorschrift erstellt:

- Beschichtung der Platten mit Antigenlösung (20 mg/ml), jeweils 100 µl pro Well
- Inkubation für zwei Stunden bei 37°C
- Inkubation über Nacht bei 2-8°C
- Dreimaliges Waschen mit ELISA-Puffer
- Abblocken unspezifischer Bindungen mit 200 µl Gelatinelösung pro Well
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C
- Dreimaliges Waschen mit 100 µl ELISA-Puffer
- Zugabe der zu bestimmenden Antikörperprobe (Arbeitsverdünnung 1:20) 50 µl
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C
- Dreimaliges Waschen mit 100 µl ELISA-Puffer
- Zugabe des enzymmarkierten Antikörpers (Arbeitsverdünnung 1:10000) 50 µl
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C
- Dreimaliges Waschen mit 100 µl ELISA-Puffer
- Zugabe des Chromogensubstrats o-Phenylendiamin (OPD) 100 µl
- Abstoppen der enzymatischen Reaktion nach 12 min mit 50 µl ein molarer Schwefelsäure
- Vermessung im Mikrotiterplattenreader bei 492 nm

### 3.2.4.4 Vergleich der Antikörpertiter gegen die Zeit

Durch die Darstellung der im ELISA-Test gemessenen Extinktionen gegen den Zeitpunkt der Eiablage erhielt man die (Abbildung 3.2).

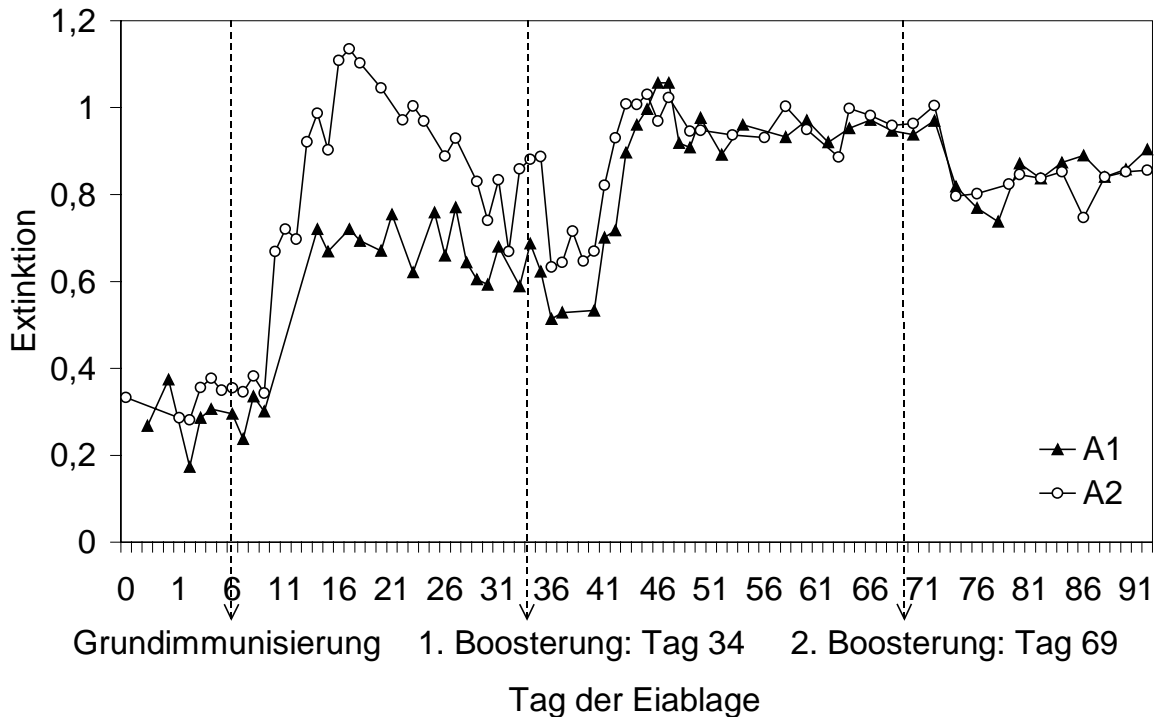


Abbildung 3.2 Höhe der im ELISA-Test gemessenen UV-VIS-Extinktionen der Dotterproben in Abhängigkeit vom Tag der Eiablage. Je größer die Extinktion, je höher war die Konzentration des gegen *Mycoplasma bovis* gerichteten IgY. Die Henne A1 ist mit einer Vakzine immunisiert worden, der das SLN-Adjuvans A1 zugesetzt worden ist und Henne A2 bekam eine Vakzine unter Zugabe von A2. Die senkrechten Striche kennzeichnen die Zeitpunkte der Immunisierungen.

Bei beiden Hennen erkennt man einen deutlichen Anstieg der Titer zwischen dem 10. und 12. Tag nach der Grundimmunisierung (GI). Bei A2 war der Anstieg wesentlich stärker ausgeprägt als bei A1. Bis zum Zeitpunkt der ersten Boosterung (B1) fielen die Titer wieder leicht ab. Ebenfalls 10 bis 12 Tage nach B1 stieg der Titer bei Huhn A1 und A2 auf annähernd gleich Werte. Diese entsprachen etwa der Extinktion, die A1 schon nach der GI erreicht hat. Es kam zu einer Plateaubildung auf hohem Niveau. Die zweite Boosterung (B2) führte zu keiner weiteren Erhöhung der Titer.

Des weiteren läßt sich erkennen, daß es bei beiden Hennen sowohl nach der B1 als auch nach der B2 zunächst zu einem leichten Abfall der Titer kam. Ob dies auf die Vakzine oder auf den Streß bei der Impfung zurückzuführen ist, ließ sich nicht feststellen. Aus der Be-

trachtung der beiden Profile lassen sich leichte rhythmische Schwankungen der Titer ablesen.

#### 3.2.4.5 Gewebeschnitte

Vier Wochen nach der letzten Boosterung wurden die Hühner euthanasiert. Bei der makroskopischen Betrachtung des Injektionsorts im Pektoralmuskel konnte man bei A1 keine Läsionen finden. Bei A2 sah man drei gelbliche Herde von etwa 2x2x1 mm, 6x3x1 mm und 3x2x2 mm (Abbildung 3.3). Von diesen Veränderungen wurden Präparate angefertigt. Histologisch wurden diese Foci als sterile körperfremde Granulome eingestuft (Abbildung 3.4). Ähnlich, doch in wesentlich schlimmeren Ausmaß treten solche Läsionen nach Anwendung von FCA auf (vgl. Abbildung 3.14).

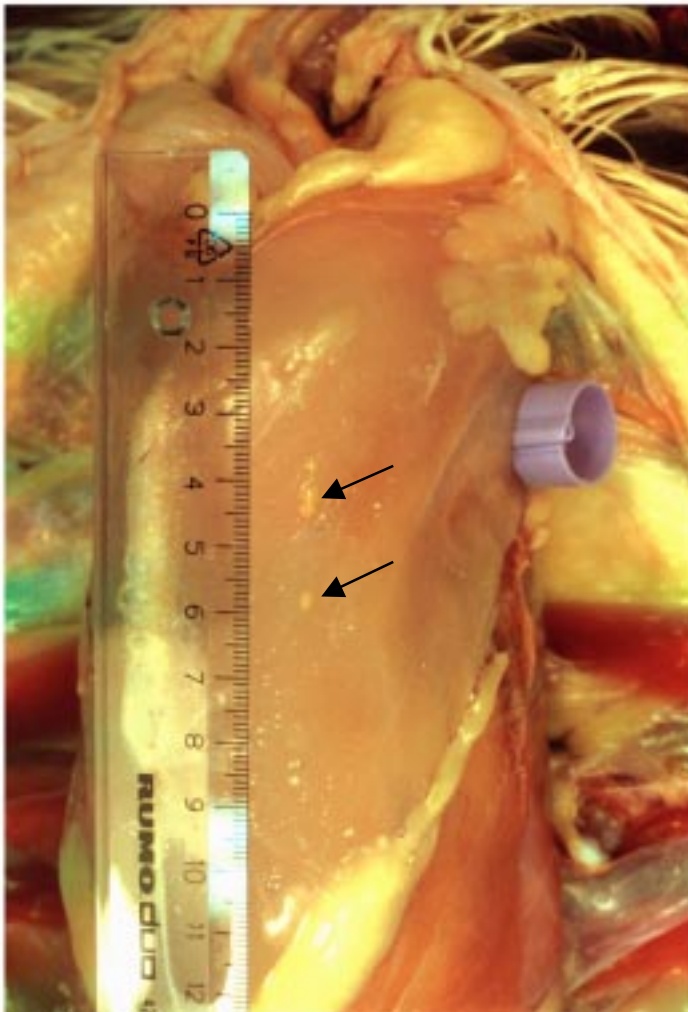


Abbildung 3.3: Gewebsveränderungen im Pektoralmuskel in der Umgebung der Injektionsstelle bei Huhn A2

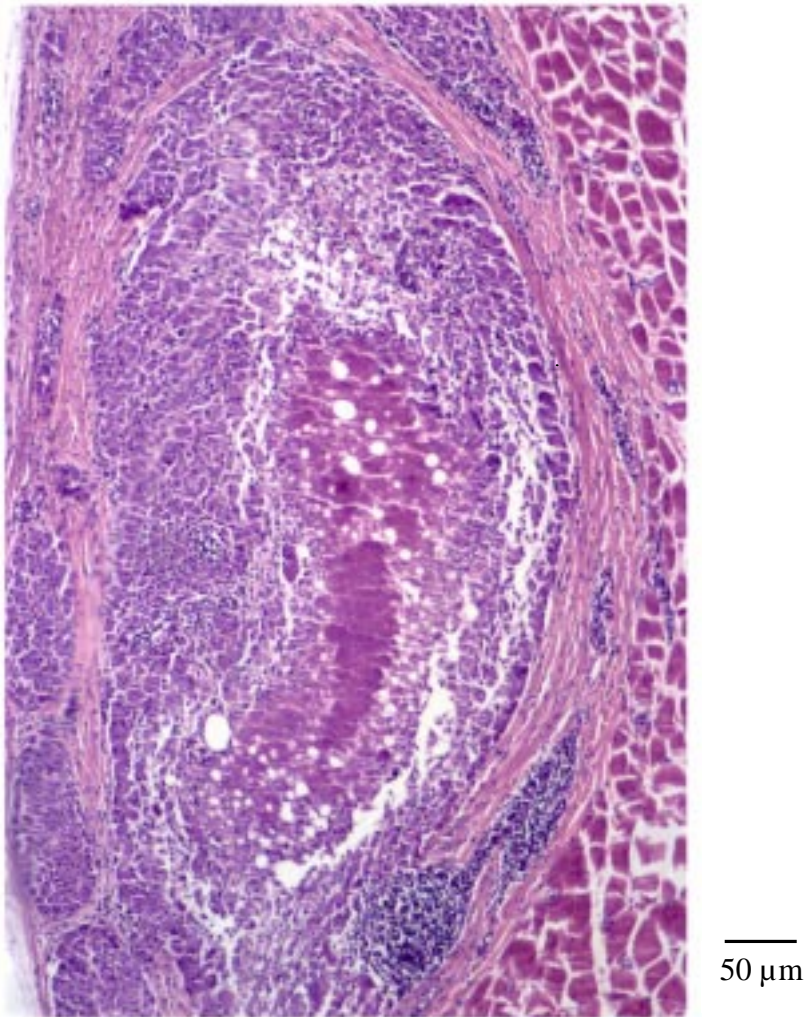


Abbildung 3.4: Gewebepräparat (200fache Vergrößerung) von der Einstichstelle im Pektoralmuskel bei Huhn A2. Dabei erkennt man, daß es sich bei der Läsion um ein körperfremdes steriles Granulom handelt.

### **3.2.5 Zusammenfassung**

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß sich das Huhnmodell gut zur Testung der Adjuvanswirkung eignet. Mit minimaler Belastung der Tiere können Erkenntnisse über die Kinetik der Antikörperproduktion, die Höhe der Antikörpertiter und die Gewebeverträglichkeit gewonnen werden. Die Zubereitung A1 war sehr gut verträglich. Die Zubereitung A2 erzeugte leichte Gewebeveränderungen, die jedoch weniger stark als bei Aluminiumverbindungen ausfielen.

Schon 1926 erkannte man, daß Tiere, die an der Einstichstelle einer Immunisierung eine Gewebsreaktion entwickelten, oftmals eine stärkere Immunantwort zeigten [Ramon 1926]. Bei FCA, FIA und Aluminiumhydroxid ist das noch immer der Fall. Allerdings ist die durch A2 hervorgerufene Schädigung wesentlich geringer als bei FCA. Trotzdem ist es zur Etablierung eines neuen Adjuvans unerlässlich, daß dieses keine oder nur sehr geringe Gewebereizungen verursacht. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich diese Gewebereizungen durch Modifizierung der Formulierung vermeiden lassen. Ein Vergleich gegenüber anderen Adjuvantien und einer Vakzine ohne Adjuvans kann sicherlich genauere Aussagen zur Effizienz dieser Adjuvantien ermöglichen.



### **3.3 Untersuchung zum Einfluß der Adjuvansmenge und der Partikelgröße auf die Immunantwort am Huhnmodell**

#### **3.3.1 Versuchsplanung**

Der erste Versuch diente der Etablierung des Huhnmodells. In einem zweiten Schritt sollten die Auswirkungen der Veränderung verschiedener Partikeleigenschaften auf die Antikörperentwicklung und die Gewebeverträglichkeit untersucht werden. Als modifizierbare Parameter wurden die Menge, die Zusammensetzung und die Partikelgröße von SLN ausgewählt.

Grundlegend für das weitere Vorgehen war die Veränderung in der Zusammensetzung der SLN. Im ersten Versuch zeigte sich, daß das Huhn, welches die SLN aus Hartparaffin mit EQ1 erhalten hat, leichte Gewebeveränderungen aufwies. Nun soll untersucht werden, inwiefern man das durch Veränderung der Rezeptur unterbinden kann. Zu diesem Zwecke wurde das nicht bioabbaubare Hartparaffin durch das bioabbaubare Lipid Compritol 888 ATO ersetzt.

Die Konzentration des Adjuvans in der Vakzine war beim ersten Versuch 2 %. In diesem Versuch wurde die Konzentration variiert. Sie wurde auf rund 4 % erhöht, auf rund 1 % erniedrigt und bei ca. 2 % gehalten. Untersucht werden sollte, ob diese Konzentrationsveränderungen einen Einfluß auf die Effizienz der Immunantwort oder auf die Gewebeverträglichkeit haben.

Ebenfalls sollte der Einfluß der Größe der SLN auf die Immunantwort und die Gewebeverträglichkeit untersucht werden. Dazu wurden neben SLN, die etwa gleiche Partikelgrößen zeigten, wie die Partikel aus dem ersten Versuch, Partikel verwendet deren mittlerer PCS-Durchmesser deutlich über 100 nm lag.

#### **3.3.2 Formulierungsentwicklung und Herstellung der Adjuvantien**

Das Hartparaffin wurde durch Compritol 888 ATO ersetzt. Die Menge und das Mischungsverhältnis der Tenside wurde beibehalten (Tabelle 3.4).

### 3 SLN als Impfstoffadjuvantien

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der SLN-Formulierungen (Die Prozentangaben beziehen sich auf Massenprozent.)

	Lipid	Tensidmischung	Kationisches Lipid
SLN	Compritol 4 %	Tween80/Span85 (7:3) 4 %	EQ1 1 %

Hergestellt wurden die kleinen SLN [A(kl)] mit dem beheizbaren kontinuierlich arbeitenden LAB 60 Homogenisator. Hierbei wurde eine Temperatur von 85°C, ein Druck von 500 bar und eine Chargengröße von 1,5 kg gewählt. Am zweiten Homogenisationsventil lag ein Druck von 50 bar an. Nach Vereinigung des geschmolzenen Fettes und der heißen Tensidlösung mittels eines Rührwerkes wurde im Produktbehälter zunächst eine Präemulsion hergestellt, welche anschließend unter den genannten Bedingungen 30 min lang im Umlauf homogenisiert wurde. Eine Sterilfiltration der warmen Dispersion erfolgte im Anschluß mit einem 0,22 µm Filter. Die abschließende Isotonisierung wurde durch Zusatz von wasserfreiem Glycerol erreicht.

Die Herstellung der größeren SLN [A(gr)] erfolgte am Micron LAB 40 Homogenisator, der durch einen Heizring beheizt wurde. Das Produktionsvolumen betrug hier nur 40 ml. Vor der Homogenisation mußte eine Präemulsion aus geschmolzenem Fett und heißer Tensidlösung mittels eines Ultraturrax hergestellt werden. Die Homogenisation wurde in drei Zyklen bei 500 bar und 85°C durchgeführt. Die Isotonisierung erfolgte wie bei der anderen Formulierung.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Partikelgrößen- und Zetapotentialbestimmung der SLN-Formulierungen A(kl) und A(gr)

	PCS Durchmesser	PI	Zetapotential
A(kl)	101 nm	0,101	+ 42,3 mV
A(gr)	750 nm	0,406	+40,3 mV

### 3.3.3 Testung an Hennen

#### 3.3.3.1 Immunisierungsschema

Pro Formulierung wurden jeweils zwei Hennen vakziniert (Tabelle 3.6). Als positiver Vergleich fungierte FCA. Bei den Boosterungen wurde aus Gründen des Tierschutzes FIA verwendet. Als Kontrollgruppe dienten zwei Hennen, die nur mit dem Antigen in phosphatgepufferter Natriumchloridlösung (PBS) vakziniert wurden. Als Antigen diente Mäuseimmunglobulin G (Mäuse-IgG), welches in PBS verdünnt wurde. Pro Immunisierung wurde jedem Huhn 1 ml der Vakzine in den Pektoralmuskel injiziert. Der angegebene Gehalt der SLN-Zubereitungen in den Vakzinen bezieht sich auf den Lipidgehalt.

Tabelle 3.6: Übersicht über die Zusammensetzung der verschiedenen Vakzinen und Zuordnung zu den damit immunisierten Hennen (Die Prozentangaben beziehen sich auf Massenprozent.)

	Adjuvans	Antigen	Hennen
Vakzine 1	A(kl) 3,8 %	MausIgG 0,1mg/ml	72 + 73
Vakzine 2	A(kl) 1,8 %	MausIgG 0,1mg/ml	74 + 75
Vakzine 3	A(kl) 0,9 %	MausIgG 0,1mg/ml	76 + 77
Vakzine 4	A(gr) 1,8 %	MausIgG 0,1mg/ml	78 + 79
Vakzine 5	FCA / FIA (0,1 ml/1,1 ml)	MausIgG 0,1mg/ml	80 + 81
Vakzine 6	keins	MausIgG 0,1mg/ml	82 + 83

Die Grundimmunisierung (GI) wurde den Hennen verabreicht, nachdem alle Junghennen begonnen hatten, Eier zu legen. Die Immunisierungen erfolgten am 55. und 120. Tag nach der GI.

### 3.3.3.2 Probennahme

Von jeder Henne wurden mindestens zwei Präimmuneier gesammelt. Weitere Dotter wurden, soweit es der Legerhythmus der Tiere zuließ, von jedem zweiten Tag präpariert.

### 3.3.3.3 Auswertung der Dotterproben

#### 3.3.3.3.1 Entwicklung des ELISA-Tests

Die Auswertung der Dotterproben erfolgte wiederum mittels ELISA-Testverfahren. Wegen des neuen Antigens mußte auch der Assay neu entwickelt werden. Des weiteren wurde das Substrat ausgetauscht. Das mutagene und kanzerogene o-Phenylendiamin (OPD) wurde durch Tetramethylbenzidin (TMB) ersetzt. TMB ist ein wesentlich empfindlicheres Substrat und nicht mutagen oder kanzerogen [Mc Kimm-Breschkin 1990]. Das hatte zur Folge, daß die Dotterproben wesentlich stärker verdünnt werden mußten, da geringere Konzentrationen detektiert werden konnten. Die Arbeitskonzentrationen aller Substanzen wurden wieder mittels Schachbrettplatten ermittelt (vgl. 3.2.4.3).

Anschließend war es erforderlich, die Arbeitsverdünnungen der Dotterproben zu bestimmen. In diesem Verdünnungsbereich muß ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verdünnungsgrad der Dotterextrakte und der Extinktion bestehen. Durch Verdünnungsreihen mit beispielhaften Dotterproben von jeder Gruppe, wurde der jeweilige Verdünnungsgrad ermittelt.

Der ELISA-Test wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Beschichtung der Platten mit Antigenlösung (0,625 µg/ml), jeweils 100 µl pro Well
- Inkubation für zwei Stunden bei 37°C
- Inkubation über Nacht bei 2-8°C
- Dreimaliges Waschen mit 100 µl ELISA-Puffer
- Abblocken unspezifischer Bindungen mit 200 µl Gelatinelösung pro Well
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C
- Dreimaliges Waschen mit 100 µl ELISA-Puffer
- Zugabe der zu bestimmenden Antikörperprobe (Arbeitsverdünnung für die Antikörper-Zeit-Profile: Hennen 72-79, 82 + 83: 1:7508, Hennen 82+83: 1:164728, jeweils 50 µl pro Well)
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C

- Dreimaliges Waschen mit 100  $\mu$ l ELISA-Puffer
- Zugabe des enzymmarkierten Antikörpers (Arbeitsverdünnung 1:10000) 50  $\mu$ l
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C
- Dreimaliges Waschen mit 100  $\mu$ l ELISA-Puffer
- Zugabe des Chromogensubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) 200  $\mu$ l
- Abstoppen der enzymatischen Reaktion nach 20 min mit 50  $\mu$ l ein molarer Schwefelsäure
- Vermessung im Mikrotiterplattenreader bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm

#### **3.3.3.3.2 Vergleich der Antikörpertiter gegen die Zeit**

Um die Schwankungen der Antikörpertiter auch wirklich detektieren zu können, war es wichtig im Bereich der linearen Abhängigkeit von Verdünnungsgrad und Extinktion zu arbeiten.

Bei den Hennen 72 - 79 und 82 + 83 konnte die Arbeitsverdünnung zur Darstellung im Antikörper-Zeit-Profil auf 1:7508 festgelegt werden.

Für die Hennen 81 und 82 mußte eine Verdünnung von 1:164728 gewählt werden. Von jedem Huhn wurde von jedem zweiten Tag eine Probe vermessen und die Extinktionswerte im Verhältnis zum Zeitpunkt der Eiablage aufgetragen.

Für die einzelnen Huhngruppen ergaben sich die folgenden Profile:

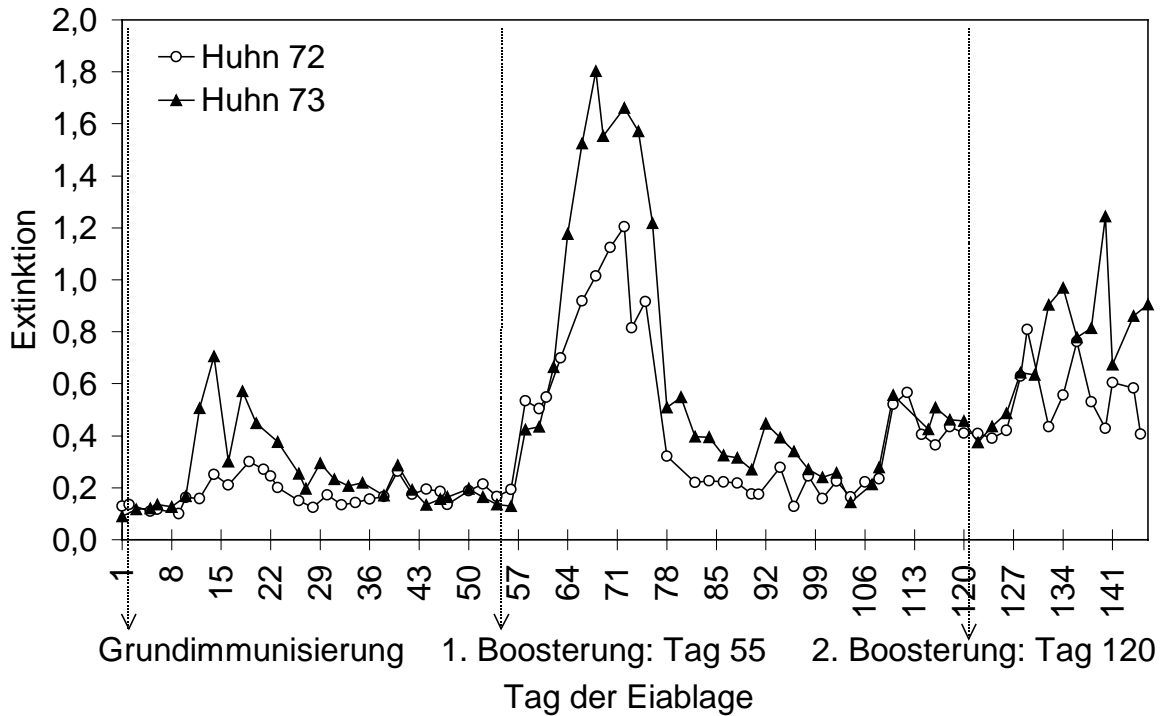


Abbildung 3.5: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 72 + 73 (beide 3,8 % A(kl)). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet.

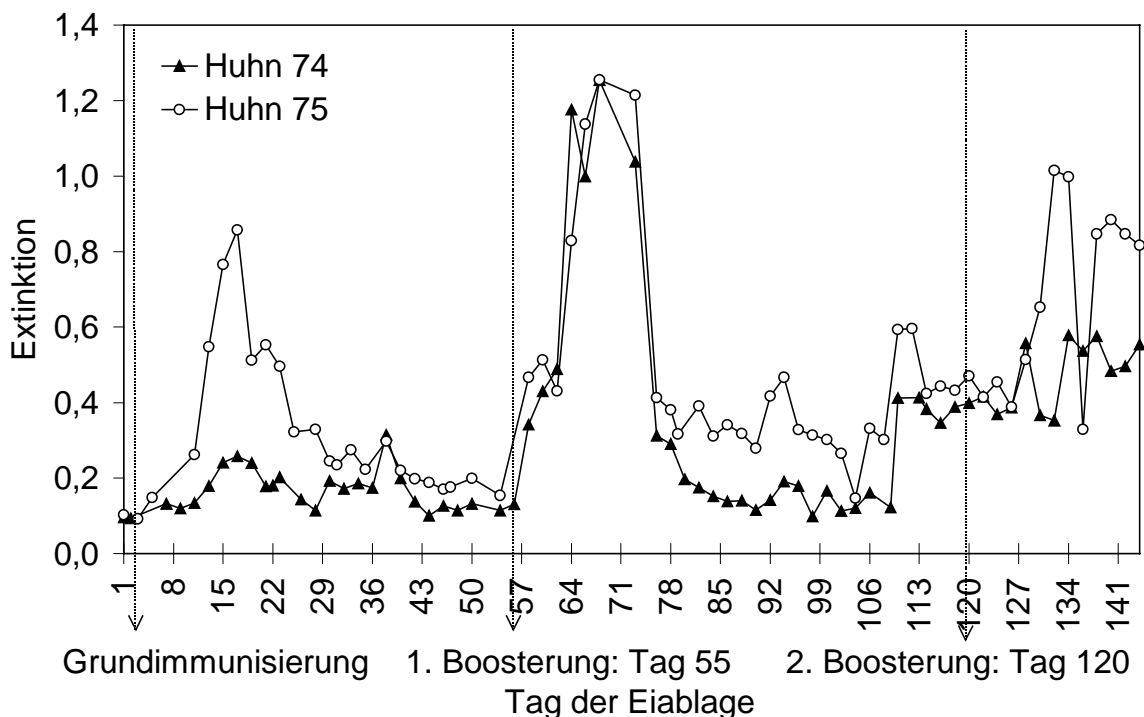


Abbildung 3.6: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 74 + 75 (beide 1,8 % A(kl)). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet.

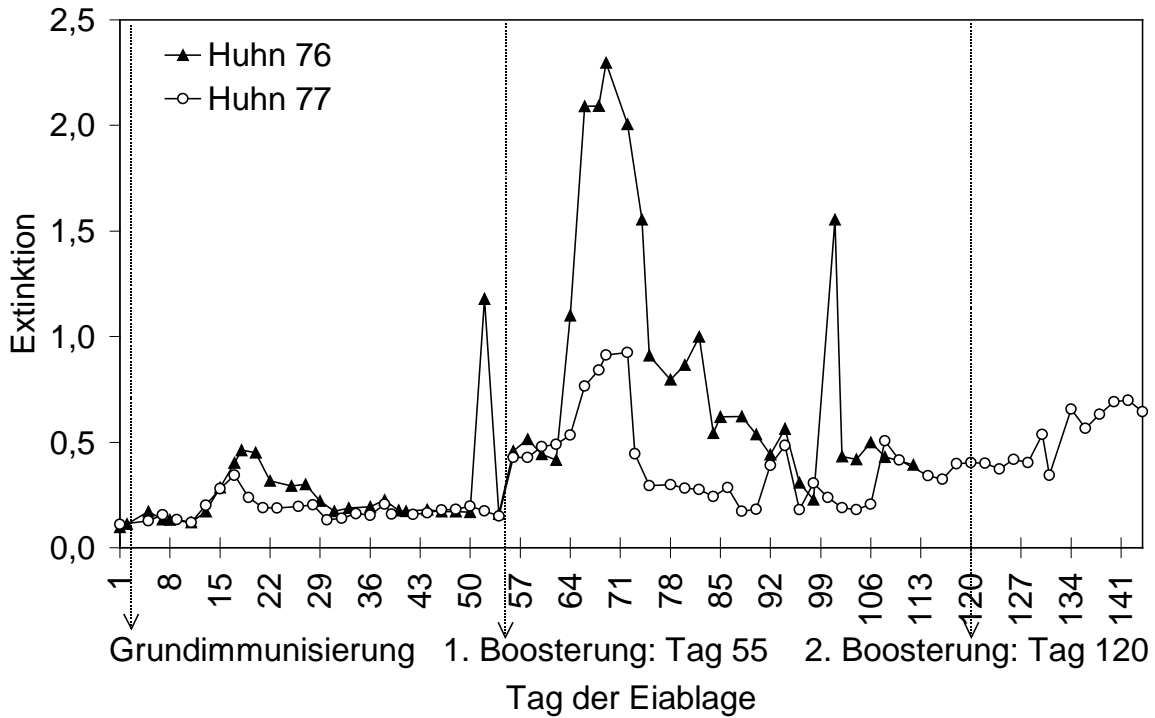


Abbildung 3.7: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 76 + 77 (beide 0,9 % A(kl)). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet. Huhn 76 ist vor der B2 gestorben.

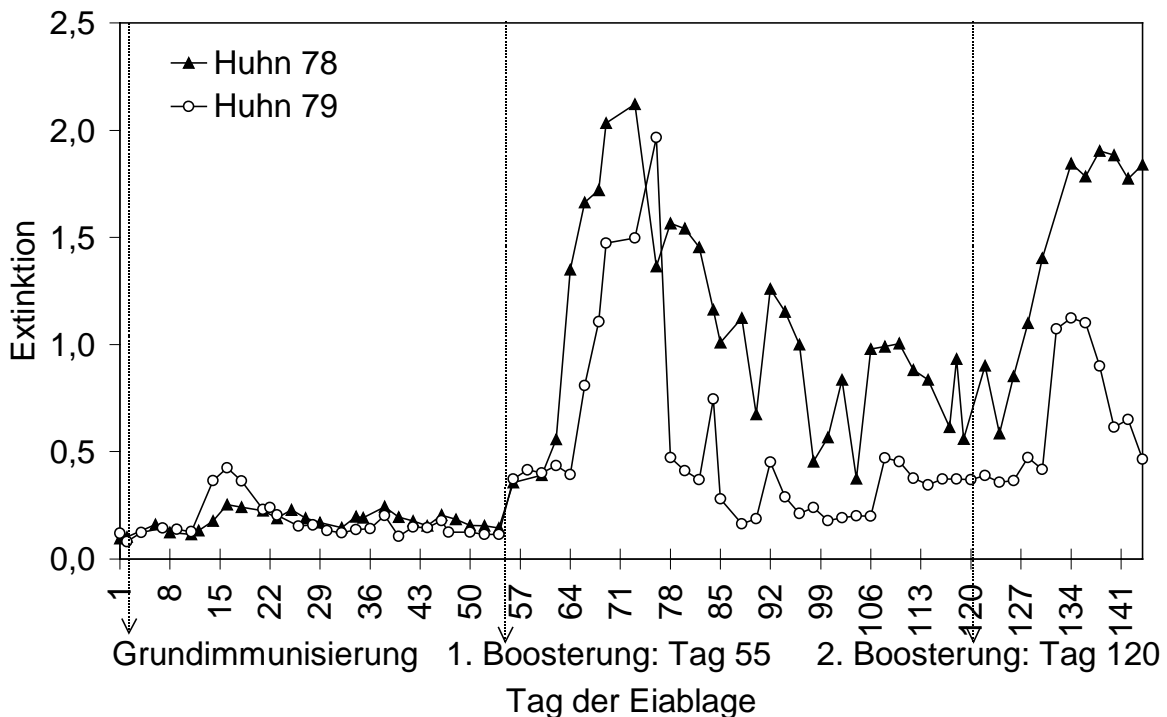


Abbildung 3.8: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 78 + 79 (beide 1,8 % A(gr)). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet.

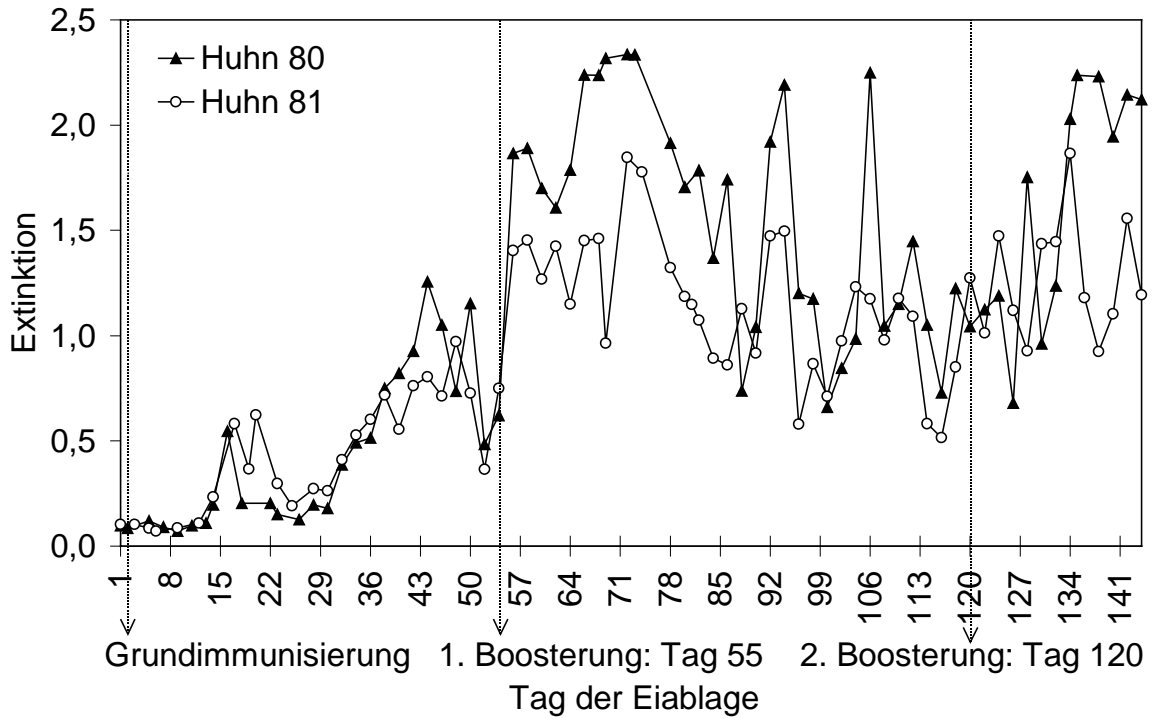


Abbildung 3.9: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 80 + 81 (beide FCA / FIA). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet.

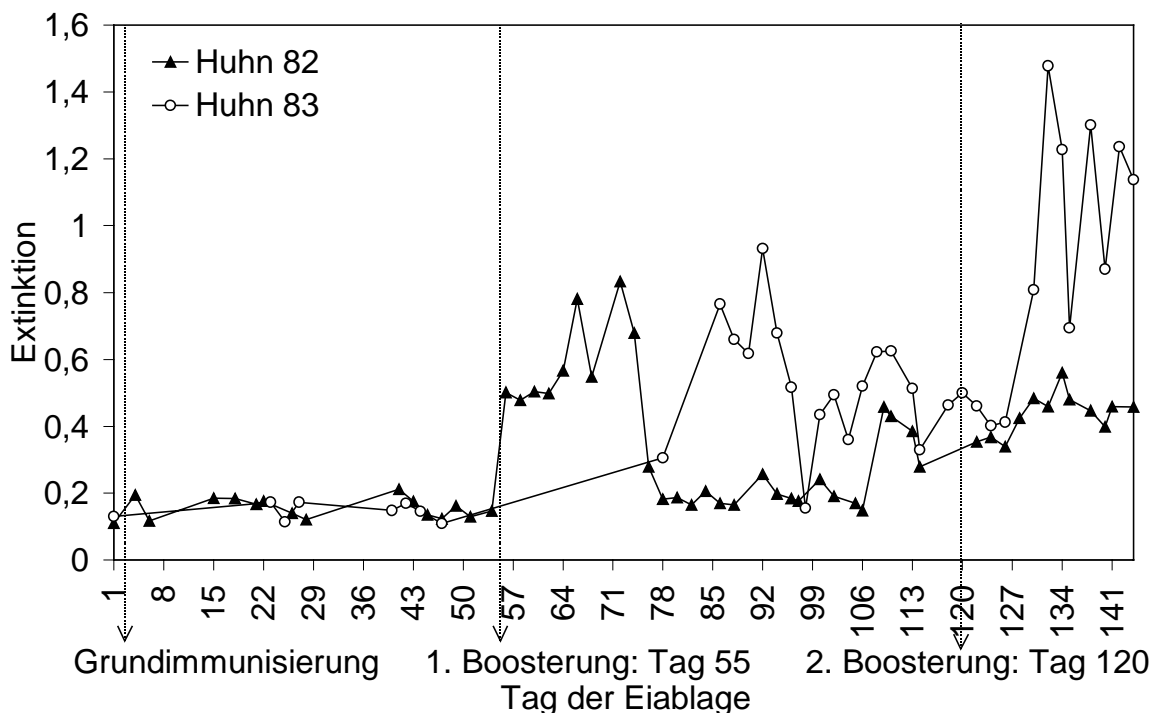


Abbildung 3.10: Entwicklung der Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit und den Vakzinierungen bei den Hennen 82 + 83 (beide kein Adjuvans). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind mit einem senkrechten Strich in der Grafik gekennzeichnet.

Bei allen Hennen, die ein Adjuvans bekommen haben, sind charakteristische Anstiege der Antikörpertiter nach allen drei Immunisierungen sichtbar. Die Kontrollhennen ohne Adju-



vans zeigten keinen Anstieg nach der Grundimmunisierung. Dieser wurde also nur durch den Zusatz eines Adjuvans induziert.

Die Antikörper-Zeit-Profile der SLN-Hühner zeigten alle einen schmalen, steilen Anstieg der Titer nach der B1, der bei den Kontrollhühnern ohne Adjuvans und den FCA-Hühnern nicht in dieser Form auftrat. Nach diesem Peak, fielen die Titer wieder bis fast auf den Anfangswert ab, um nach der B2 wieder anzusteigen. Der Effekt der B1 war allerdings stärker ausgeprägt als bei der B2. Für Aluminium-Adjuvantien wurde schon ähnliches berichtet, nämlich, daß der Effekt des Adjuvans auf die Immunantwort am ausgeprägtesten bei den ersten Immunisierungen ist, und dann abnimmt [Aprile und Wardlaw 1966, Gupta et al. 1995]. Andererseits sollte man in Erwägung ziehen, nach der B2 länger abzuwarten.

Dieser Verlauf, mit dem Vorkommen eines kleineren Anstiegs schon nach der GI und dem schmalen, steilen Peak nach der B1 scheint charakteristisch für das SLN-Adjuvans zu sein. Diese Verläufe unterscheiden sich signifikant von denen ohne Adjuvans und von denen mit FCA. Dies zeigt eine vorhandene immunmodulierende Wirkung des SLN-Adjuvans.

Der Titerverlauf unter FCA unterschied sich von diesem Profil. Nach der GI traten sogar zwei Peaks auf: Ein erster kleinerer und ein zweiter größerer. Nach der B1 war der Anstieg nicht so schmal und die Titer fielen vor der B2 auch nicht wieder bis fast auf die Anfangsextinktion ab.

Einzig Huhn 78 (1,8 % A(kl)) zeigte einen Titerverlauf, der mehr FCA ähnelte, als den anderen SLN-Hühnern. Der Anstieg nach der B1 war hier nicht so schmal und steil, sondern auch breiter und die Werte fielen nicht mehr bis auf die Ausgangsextinktion ab. Bei Henne 79, die die gleiche Vakzine bekommen hat, war das leider nicht zu erkennen. Es läßt sich also mutmaßen, daß die Zunahme der Größe der SLN einen Einfluß auf die immunmodulierende Wirkung hat. Dieser ähnelt eher FCA/FIA als dem Einfluß der kleineren SLN.

Einen Einfluß der Konzentration der SLN in der Vakzine auf den Verlauf der Immunantwort ließ sich hingegen nicht erkennen. Einzig Henne 77 zeigte einen geringeren Profit von der Immunisierung als die anderen. Bei Henne 76, die das gleich bekommen hat, war das nicht der Fall.

Um zu beiden Fragestellungen genauere Aussagen treffen zu können, müßte natürlich die Anzahl der Tiere pro Formulierung erhöht werden, um die vorhandenen interindividuellen Schwankungen auszugleichen.

Des weiteren ließen sich leichte rhythmisch wiederkehrende Schwankungen der Antikörperproduktion erkennen.

Zwischen den weißen und den braunen Hennen war kein Unterschied im Ansprechen auf die Vakzinen ersichtlich. Mal reagierte die eine Rasse stärker, mal die andere oder beide gleich. Es bestand also kein detektierbarer Rassenunterschied im Hinblick auf die untersuchten Parameter.

#### 3.3.3.3 Vergleich der Antikörpertiter

Für jedes Huhn wurde jeweils eine Probe von der Spitze des Antikörperanstiegs nach der GI, der B1 und der B2 ausgewählt. Die Zeitpunkte von denen die Proben stammen müssen, wurden in den Antikörper-Zeit-Profilen ermittelt (Abbildung 3.11).

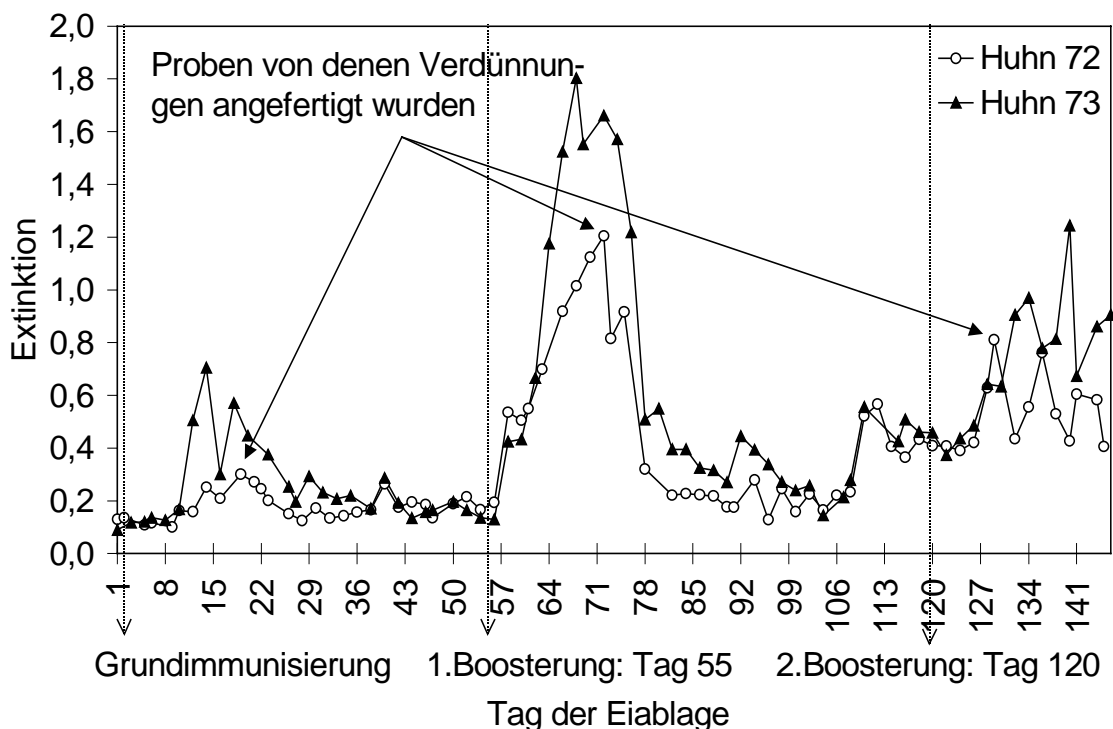


Abbildung 3.11: Ermittlung der Proben, von denen Verdünnungsreihen angefertigt werden sollten (hier beispielhaft an den Antikörper-Zeit-Profilen von den Hennen 72 und 73 dargestellt). Für jedes Huhn wurde jeweils eine Probe von der Spitze des Antikörperanstiegs nach der GI, der B1 und der B2 gewählt.

Von diesen Proben wurden Verdünnungsreihen gemacht und mittels des unter 3.3.3.3 beschriebenen ELISA-Tests vermessen (Abbildung 3.12).

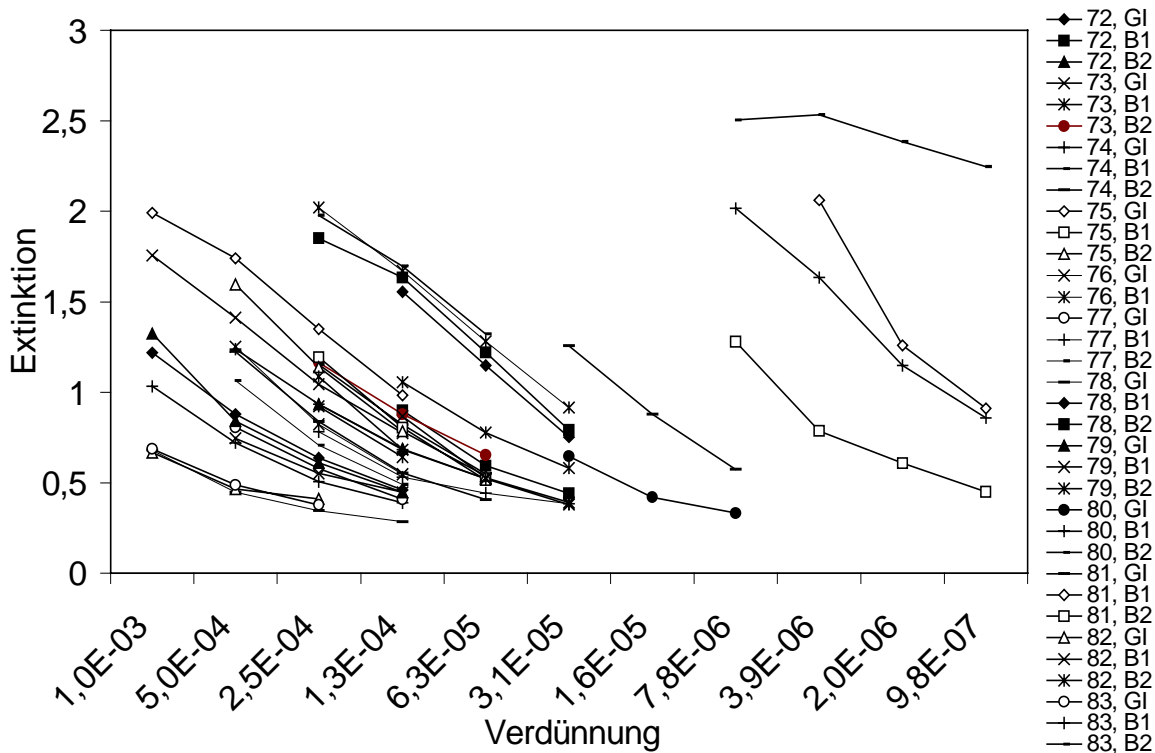


Abbildung 3.12: Verdünnungsreihen zum Titervergleich. Die Dotterproben der verschiedenen Hennen wurden so lange verdünnt, bis die Extinktionen der Verdünnungsreihen im linearen Meßbereich des ELISA-Tests lagen. Eine Verdünnung von 1:1000 wird z. B. als eine Verdünnung von 0,001 angegeben. Von jeder Henne wurden insgesamt drei Proben (und zwar je eine von den Antikörperpeaks nach der GI, B1 und B2) gemessen. In der Legende bedeutet z. B. die Bezeichnung „72, GI“ den Antikörpertiter im Eidotter von Henne 72 zum Zeitpunkt des IgY-Peaks nach der Grundimmunisierung (GI). Man erkennt auf dieser Grafik, daß die Proben von den mit FCA immunisierten Hennen (80 + 81) wesentlich stärker verdünnt werden mußten als die der anderen.

Beim willkürlich festgelegten Extinktionswert von 1,0 wurde verglichen, wie stark die einzelnen Proben verdünnt werden mußten, um diese Extinktion zu zeigen (vgl. Abbildung 3.12). Je stärker verdünnt werden mußte, um diese Extinktion zu erreichen, um so höher war die Antikörperkonzentration der Probe. Die reziproken Werte der Verdünnungen wurden miteinander verglichen (vgl. Abbildung 3.13).

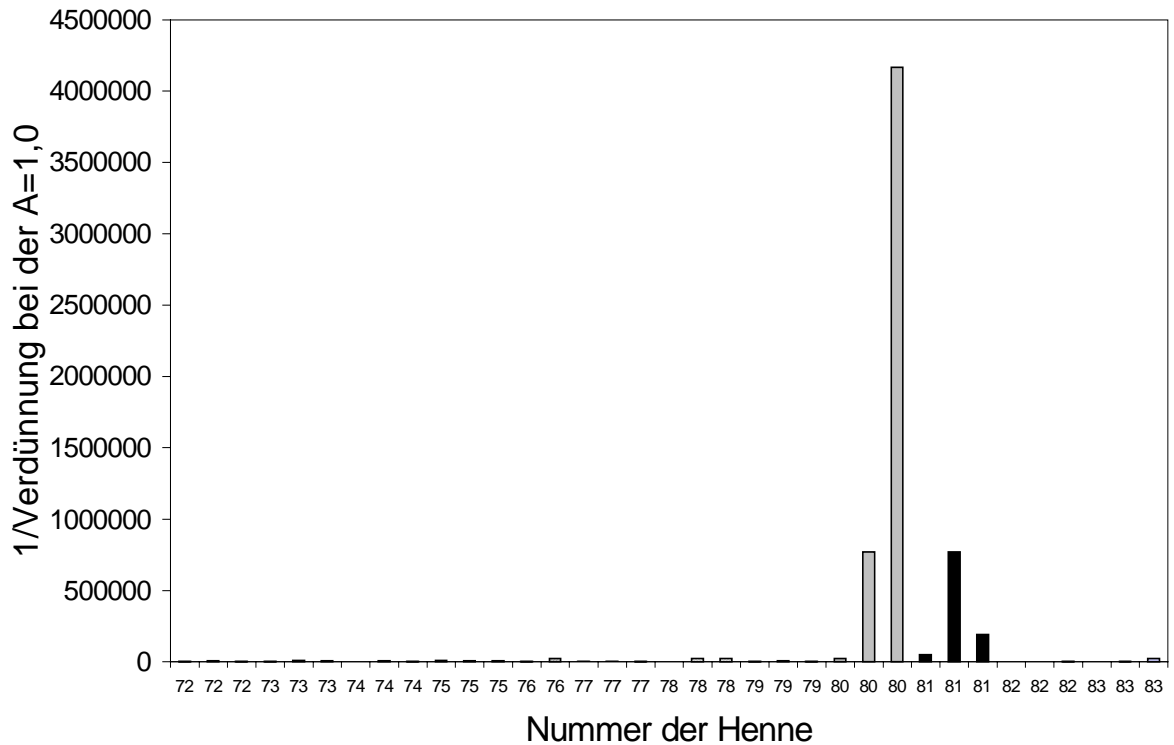


Abbildung 3.13: Vergleich der Antikörpertiter in den Eidottern der unter Zusatz von verschiedenen (oder keinen) Adjuvantien immunisierten Hennen. Der erste Wert von 72 bezeichnet z. B. den Antikörpertiter im Eidotter von Henne 72 zum Zeitpunkt des IgY-Peaks nach der Grundimmunisierung (GI), der zweite Wert den Titer nach der B1 und der dritte Wert den Titer nach der B2. Auf der y-Achse ist die Konzentration, bis zu der verdünnt werden mußte, um eine Extinktion von 1,0 zu erreichen reziprok aufgetragen.

In dieser Grafik erkennt man, daß die durch FCA stimulierten Antikörpertiter (Hennen 80 + 81) 30 bis 160 mal höher waren, als die durch SLN-Zusatz hervorgerufenen. Die Höhe des durch FCA stimulierten Antikörpertiters variierte aber auch zwischen den beiden Hühnern der Gruppe stark. Der Titer der Henne 80 war fünf mal höher als der Titer der Henne 81. Die Titer der GI, der B1 und der B2 zeigten bei Henne 80 einen stufenförmigen Anstieg. Bei Henne 81 dagegen, wurden durch die GI und die B1 quantitativ gleiche Titer wie bei Huhn 80 induziert, doch fiel der Titer nach der B2 wieder ab. Dies entsprach dem Verlauf der SLN-Adjuvantien.

Bezüglich dieses Antigens war der Vergleich mit FCA für diese SLN-Formulierung nicht geeignet. Eine solche starke immunstimulierende Wirkung wurde nicht erreicht.

Da die Titer der SLN-Hühner und der Kontrollhühner ohne Adjuvans in diesem Maßstab nicht verglichen werden konnten, wurden die Werte der Hennen 80 und 81 in der Abbildung 3.14 nicht dargestellt.

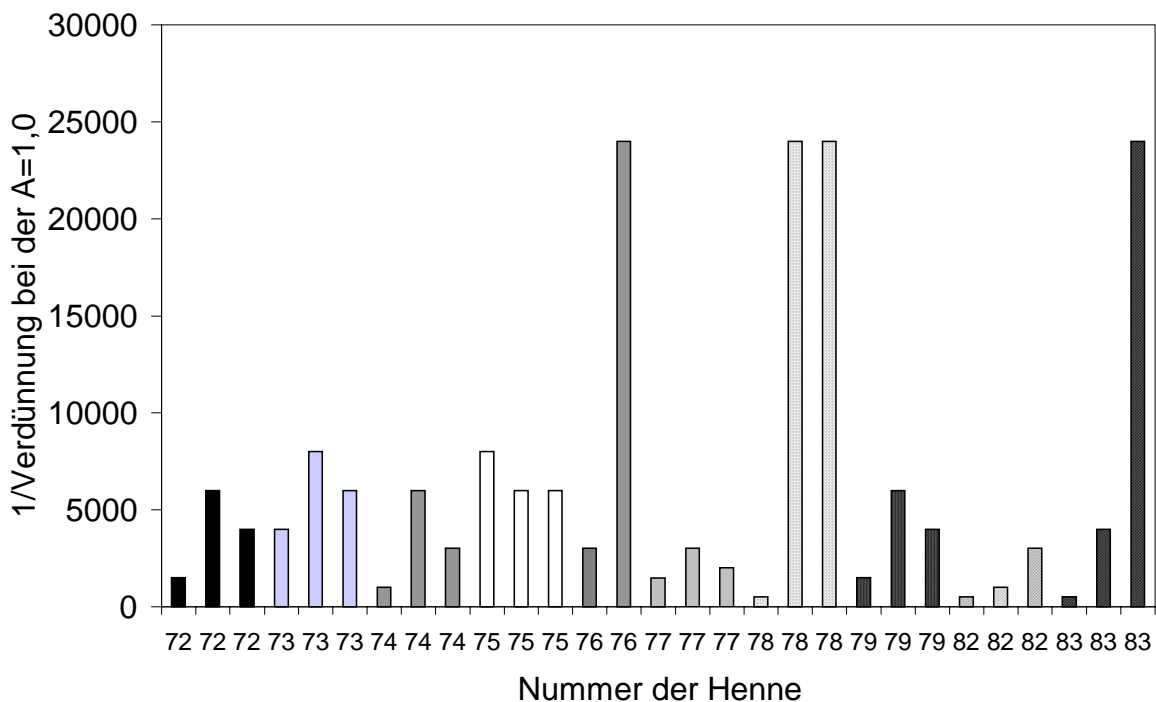


Abbildung 3.14: Antikörpertitervergleich zwischen Hennen mit SLN als Adjuvans und den Kontrollhennen ohne Adjuvans. Der erste Wert von 72 bezeichnet z. B. den Antikörpertiter im Eidotter von Henne 72 zum Zeitpunkt des IgY-Peaks nach der Grundimmunisierung (GI), der zweite Wert den Titer nach der B1 und der dritte Wert den Titer nach der B2. Auf der y-Achse ist die Konzentration, bis zu der verdünnt werden mußte, um eine Extinktion von 1,0 zu erreichen, reziprok aufgetragen.

Die Hennen ohne Adjuvans (82 + 83) zeigten beide eine stufenförmige Titerentwicklung, d. h. die Titer nahmen von der GI über die B1 zur B2 hin zu. Bei Hennen, die ein SLN-Adjuvans bekommen haben, zeigte der Titer nach der B2 allerdings niedrigere Werte als nach der B1. Dieser Verlauf scheint charakteristisch für das SLN-Adjuvans zu sein. Es deutet auf eine die Immunantwort modulierende Wirkung hin. Eine Ausnahme war nur Huhn 78. Hier waren die Titer nach der B1 und der B2 gleich.

Die Werte schwankten innerhalb eines Paares von Hennen, die die selbe Vakzine bekommen haben, zum Teil stark. Zum Beispiel war der Titer nach der B2 bei Henne 83 achtmal höher als bei Henne 82. Fast das gleiche galt für die Hennen 76 und 77. Der Test wurde also noch von einer extern nicht zu beherrschenden Größe beeinflusst. Aufgrund dessen ist auch eine Aussage über den Effekt der unterschiedlichen Größen der SLN und deren verschiedenen Konzentrationen schwierig. Es läßt sich allerdings mutmaßen, daß eine Größenzunahme den Effekt verändert, während die Konzentrationsänderung im Bereich von 3,8 % bis 0,9 % nicht zu wahrnehmbaren Unterschieden führt.

Bei den SLN-Hennen waren die Titer nach der B1, mit Ausnahme bei Huhn 77, höher als bei den Kontrollhennen. Bei der B2 war diese Aussage nicht mehr möglich. Allerdings ist zu bedenken, daß diese Titerunterschiede relativ gering sind, im Vergleich zu den Titerunterschieden, die zwischen diesen Hühnern und den FCA-Hühnern bestanden.

#### 3.3.3.4 Gewebeschnitte

Vier Wochen nach der letzten Boosterung wurden die Hühner euthanasiert. Die Injektionsstellen im Pektoralmuskel wurden makroskopisch beurteilt. Zur histologischen Beurteilung wurden Gewebeschnitte angefertigt.

Die Befunde der beiden Hennen, die unter Zusatz von FCA immunisiert worden waren, unterschieden sich nicht. Deshalb wird in Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16 beispielhaft nur Henne 81 dargestellt.

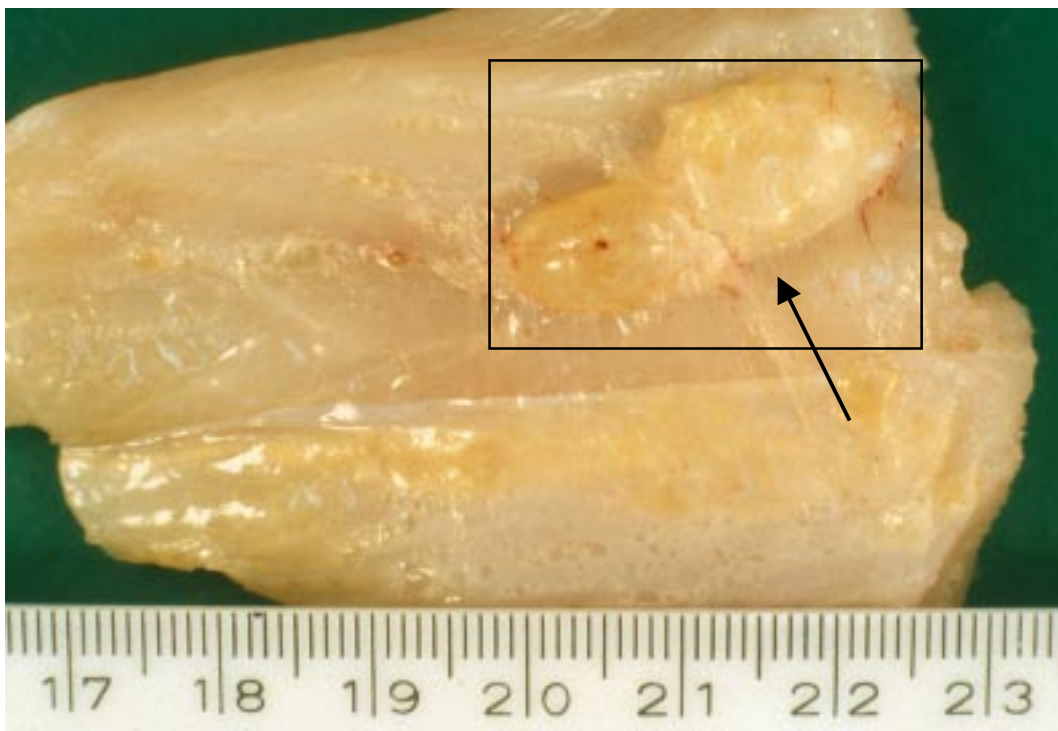


Abbildung 3.15: makroskopische Abbildung der Injektionsstelle bei Henne 81 (FCA/FIA). Hier zeigte sich ein 2,6x12 mm großer, gelblich-weißer Abszeß, der eine rahmige Flüssigkeit enthält. Dabei handelte es sich um ein steriles Granulom.

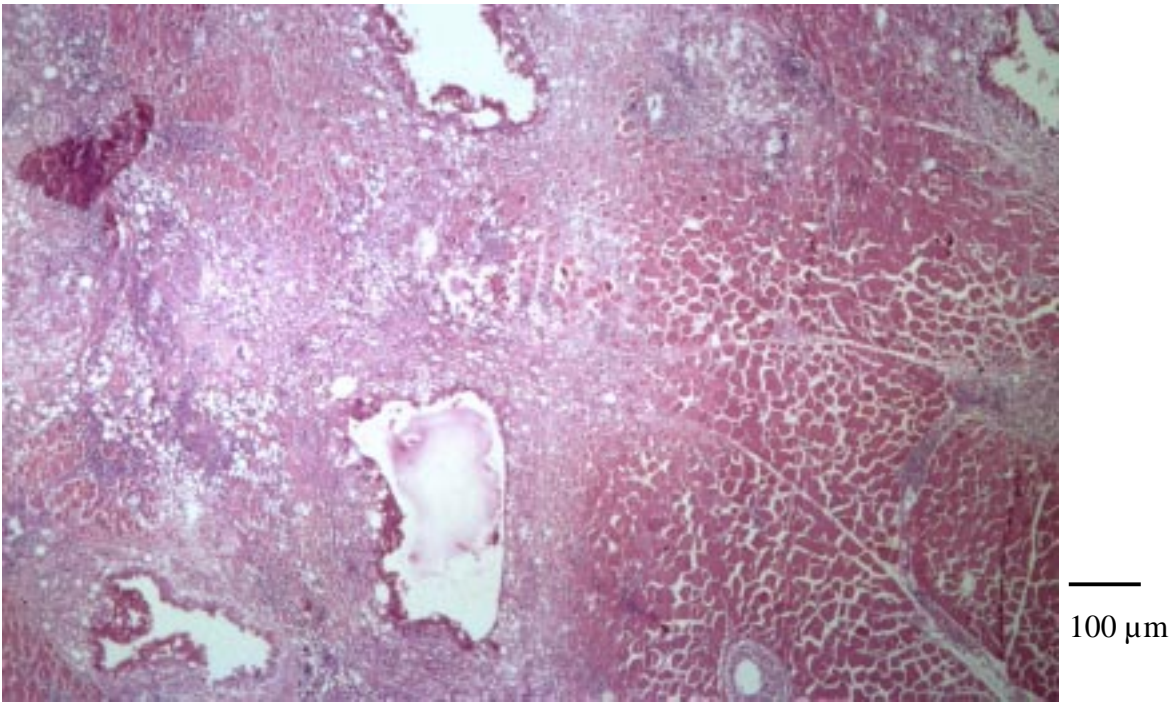


Abbildung 3.16: Gewebeschnitt (100fache Vergrößerung) von Henne 81 (FCA). Auf dieser mikroskopischen Abbildung sind hochgradige entzündliche Veränderungen an der Injektionsstelle zu erkennen. Das Granulom ist nicht abgekapselt und das umliegende Gewebe infiltriert.



Abbildung 3.17: Makroskopische Abbildung der Injektionsstelle bei Henne 83 (kein Adjuvans). Die makroskopische Beurteilung der Kontrollhühner zeigte, bis auf eine kleine Narbe im Bereich des Stichkanals bei Huhn 83, keine Auffälligkeiten. Das Gewebe wurde nicht geschädigt.



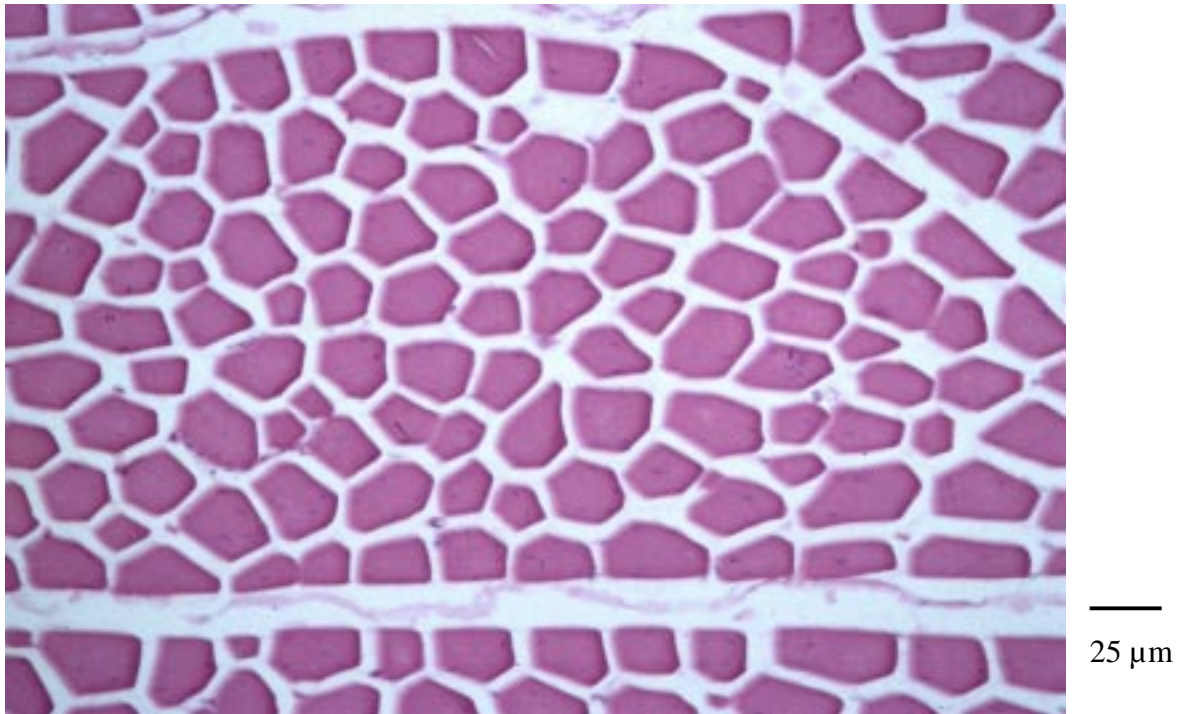


Abbildung 3.18: Gewebeschnitt (400fache Vergrößerung) von Henne 83 (kein Adjuvans). Die histologische Untersuchung bestätigte, daß das Gewebe nicht geschädigt worden ist. Man sieht hier einen unbeeinträchtigten Zellenverbänd.

Bei den Hennen, die A(kl) erhalten haben, konnten keine Veränderungen entdeckt werden. Der makroskopische Befund glich den Kontrollhühnern. Einzig bei den Hennen, die A(gr) erhalten haben, konnten nach ausführlicher Suche leichte Gewebeauffälligkeiten gefunden werden. Diese sind in Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20 dargestellt.



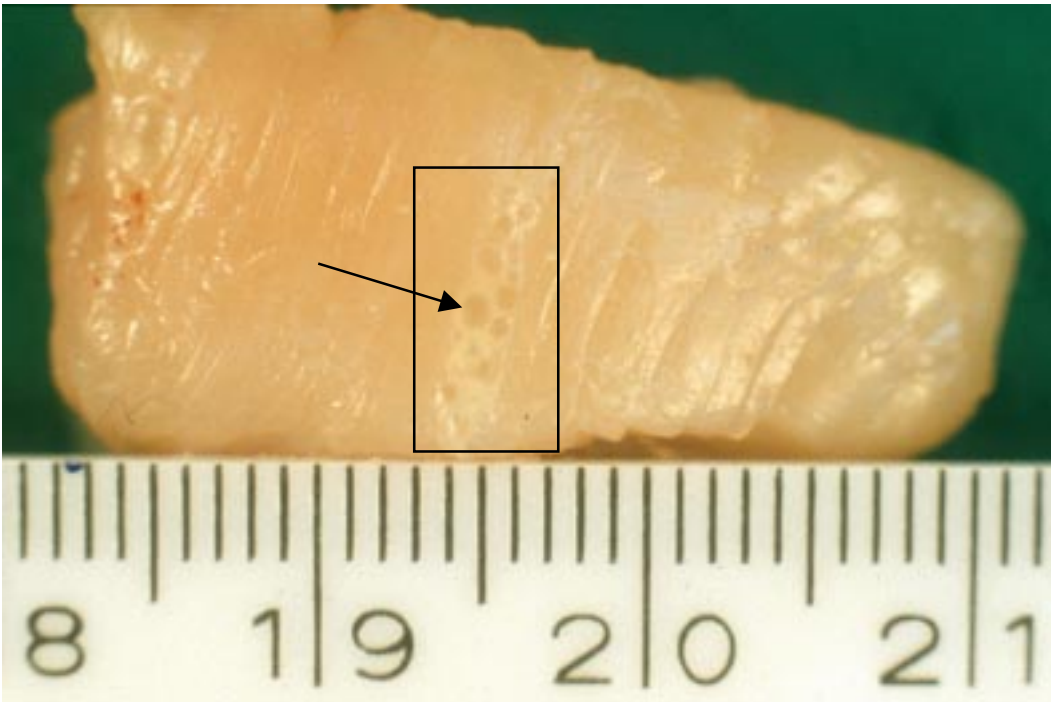


Abbildung 3.19: Makroskopische Abbildung der Injektionsstelle bei Henne 79 (A(gr) 1,8%). Man erkennt eine leichte Gewebeauffälligkeit. Dabei handelte es sich um unauffällige 1,5 mm x 8 mm große, bläschenartige Veränderungen. Diese unterschieden sich signifikant von den sterilen Granulomen der FCA-Hennen.

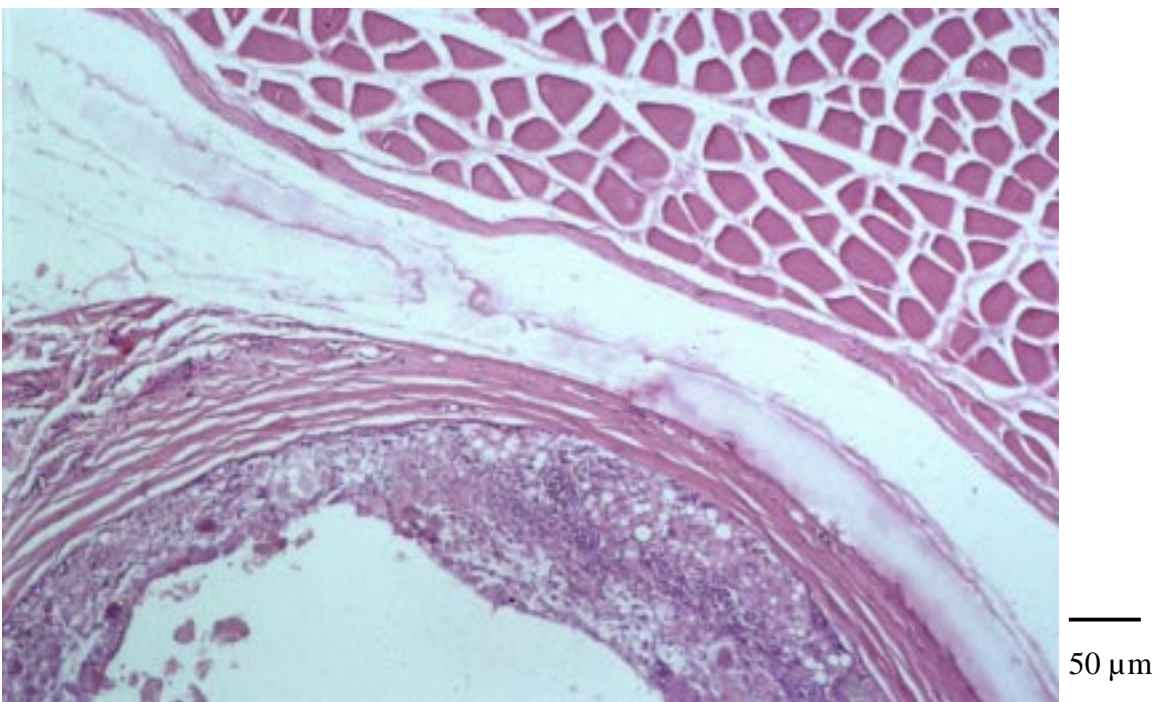


Abbildung 3.20: Die mikroskopische Ansicht (200fache Vergrößerung) des Gewebepreparates von Henne 79 (A(gr) 1,8 %). Man erkennt, daß die Veränderungen (unten links) eingekapselt waren. Umliegendes Muskelgewebe (oben rechts) war nicht beeinträchtigt.

Die neuen SBA-Formulierungen zeigten also keine gewebeschädigenden Eigenschaften. Der Austausch von Hartparaffin gegen Compritol führte zu einer Zunahme der Verträglichkeit und Abnahme der gewebeirritierenden Wirkung, bei sonst gleichbleibender Zusammensetzung des Adjuvans.

#### **3.3.4 Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Zum einen war eine immunmodulierende Wirkung des SLN-Adjuvans klar zu erkennen. Die Antikörper-Zeit-Profile unterschieden sich deutlich von denen der Hennen, die ohne Adjuvans immunisiert worden sind. Mit Ausnahme von Huhn 78 (welches unter Zusatz von 1,8 % der großen SLN A(gr) vakziniert worden ist) unterschieden sich die Profile auch von denen, die durch FCA-Zusatz erhalten worden sind. Das Profil von 78 ähnelte diesem mehr. Da das Huhn 79 die selbe Formulierung A(gr) erhalten hat, und diesen Effekt nicht zeigte, läßt sich nur spekulieren, ob der Grund die Größe der SLN war. Auch die Antikörpertiter, die durch das SBA stimuliert worden sind unterschieden sich von denen ohne Adjuvans. Ohne Adjuvans ergab sich ein stufenförmiger Anstieg der Titer von der GI über die B1 zu B2. Nach der B2 wurde der höchste Wert erreicht. Mit SLN als Adjuvans ist der Titer nach der B1 der höchste. Die Titer nach der B1 und oftmals auch nach der GI sind höher als ohne Adjuvans. Einzig bei Huhn 78 ist es wieder anders, denn hier waren die Titer nach der B1 und der B2 gleich hoch.

Des weiteren läßt sich feststellen, daß durch die Veränderung der Formulierung Gewebeirritationen verhindert werden konnten. Im ersten Versuch zeigten sich bei dem Huhn, welches die Formulierung aus Hartparaffin, Tween 80/Span 85 und EQ1 bekommen hat, leichte Läsionen. Diese konnten durch den Austausch des nicht bioabbaubaren Hartparaffin gegen das bioabbaubare Compritol und sonst gleichbleibender Zusammensetzung verhindert werden. Die Kombination von EQ1 mit Compritol statt mit Hartparaffin reduzierte diese Lokalreaktionen stark. Es konnte also gezeigt werden, daß SLN ohne Zusatz von EQ1 sehr gut gewebeverträglich waren und keine Lokalreaktionen an der Einstichstelle induzierten. Durch die Optimierung der Formulierung ließ sich die selbe gute Verträglichkeit auch für Formulierungen mit EQ1 erreichen. Allerdings waren die Gewebereaktionen nicht nur abhängig von der Zusammensetzung der Formulierung, sondern auch von der Partikel-

größe. Die größeren Partikel induzierten leichte Gewebereaktionen, die nicht gravierend waren, sie aber von den kleineren Partikeln unterschieden. Die optimierten SLN-Formulierungen zeigten eine bessere Verträglichkeit als die Adjuvantien nach Freund und auch als Aluminiumadjuvantien.

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei A(kl) um eine lagerstabile, lyophilisierbare und sterilisierbare Formulierung handelt. Dies sind zusammen mit der kostengünstigen Herstellung ideale Voraussetzungen für den Einsatz in der Praxis. Die Formulierung A(gr) muß hinsichtlich der Stabilität noch optimiert werden.

Die Antikörpertiter der einzelnen Hennen unterlagen externen, nicht beeinflussbaren interindividuellen Schwankungen. Aufgrund der Gruppengröße von  $n = 2$  waren keine signifikanten Effekte der Adjuvansmenge und -größe zu erkennen. Dies war jedoch auch nicht das Ziel dieser orientierenden Studie, sondern es sollte untersucht werden, ob mit bioabbaubaren Lipiden Gewebereaktionen vermieden werden können und ob Parameter vorhanden sind, auf die das untersuchte System empfindlich mit Effizienzsteigerung oder -minderung reagiert. Allerdings läßt sich vermuten, daß eine Größenzunahme Auswirkungen hat, während eine Veränderungen der Konzentration im Bereich von 3,8 % über 1,8 % bis 0,9 % eher keine zu haben scheint. Die größeren Partikel induzierten leichte Gewebereaktionen, die kleineren dagegen bei keiner der untersuchten Konzentrationen. Wie schon erwähnt können leichte Gewebereaktionen auch ein Zeichen für eine adjuvante Wirkung sein. Ebenso zeigte ein Huhn der Gruppe, die mit Zusatz von A(gr) immunisiert wurde, einen Titerverlauf, der sich von denen der anderen SBA Hühnern unterschied und eher FCA ähnelte. Ein Einfluß der Konzentration auf die Antikörper-Zeit-Profile, die Titerentwicklung und die Gewebeverträglichkeit konnte nicht festgestellt werden.

Die beobachteten Titersteigerungen fielen geringer aus als erwartet. Dies kann zum einen darin begründet liegen, daß das Vakzinierungsprotokoll noch nicht optimal war. Andererseits liefert die Studie aber auch wertvolle Informationen über den möglichen Wirkmechanismus. Als Antigene wurden *Mykoplasma bovis* (in Analogie zu den vorausgegangenen Schafstudien) und Mäuseimmunglobulin G (die erzeugten Antikörper wurden von einem kooperierenden Partner in einem anderen Projekt benötigt) eingesetzt. Gegen solche Antigene bildet sich vorwiegend eine Immunreaktion vom Th2-Typ, die vor allem durch die Bildung von Antikörpern gekennzeichnet ist. Das System MF59 dagegen induziert vorwiegend eine Immunreaktion vom Th1-Typ, die zur Verstärkung der zellulären Immunität

führt und sich gegen intrazelluläre Krankheitserreger richtet. Da das SBA-System MF59 nachempfunden ist, hat es offenbar auch einen ähnlichen Wirkmechanismus. Die weitere Testung des Systems hat daher analog zu Experimenten mit MF59 zu erfolgen.

Als Ergebnis dieses ersten Teiles läßt sich festhalten, daß eine exzellente Gewebeverträglichkeit des SBA-Systems aufgezeigt worden ist, eine die Immunantwort modulierende Wirkung anhand der Kurvenverläufe nachgewiesen werden konnte und Informationen über den potentiellen Wirkmechanismus erhalten wurden.

### **3.4 Ausblick**

Aufgrund der Überlegungen zum Wirkmechanismus des SLN-Adjuvans, ergeben sich folgende Perspektiven.

Um eine bessere Effizienz zu erreichen, sollte zum einen das Antigen gewechselt werden. Vakzinen mit viralen Subunit-Antigenen, bei denen auch MF59 die Immunantwort stark stimuliert [Ott 1998], erscheinen vielversprechend. Es steht zu vermuten, daß SBA ähnlich wie MF59 eher die zelluläre, gegen intrazelluläre Parasiten gerichtete Immunität fördert als die humorale und deshalb in Verbindung mit viralen Vakzinen eine höhere Effektivität zeigen dürfte. Dieser Fragestellung sollte nachgegangen werden.

Eine weitere Perspektive bietet der Einsatz von SBA als Adjuvans für DNA-Vakzinen. Durch den Zusatz von kationischen Lipiden wie z. B. EQ1 oder DOTAP kann DNA auf der Partikeloberfläche kondensiert werden. Die Eignung der Formulierung A(kl) als Gentransfervektor zur nicht-viralen in vitro Transfektion konnte bereits gezeigt werden [Olbrich et al. 2001b].