

4. Diskussion

In dieser Studie wurde die Wirksamkeit eines polyvalenten DNA/rMVA/rSFV Impfstoffes in Rhesusaffen gegen die intrarektale Belastung mit dem pathogenen SIVmac251 getestet. In allen Tieren der Impfstoffgruppe konnten im Verlauf der Immunisierung zelluläre und humorale Immunantworten gegen SIV erzeugt werden, unmittelbar nach der Belastung wurden entsprechend im überwiegenden Teil dieser Gruppe anamnestic Reaktionen beobachtet. Zwar konnte keines dieser Tiere vor der Infektion geschützt werden, dennoch ergab sich eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich reduzierte Spitzenviruslast.

Da die Erzeugung effizient neutralisierender Antikörper gegen HIV und SIVmac251 als schwierig eingestuft wird, hat sich zusätzlich ein verstärktes Interesse an der durch Impfstoffe induzierten zellulären Immunantwort entwickelt, um so die virale Infektion möglichst in ihrem frühesten Stadium erfolgreich bekämpfen zu können (Letvin, 2002). Eine HIV Vakzine die beides zu induzieren vermag, wird deshalb immer häufiger gefordert (McMichael, 2003). Während sich die ersten Studien hauptsächlich auf die Evaluierung der Immunogenität einzelner Vektoren beschränkten, liegt der Fokus mittlerweile auf der Kombination dieser Vektoren (Prime Boost Strategie), um dadurch die bei mehrfacher Verwendung nur eines Vektors entstehende und sich bezüglich der gewünschten Immunreaktion nachteilig auswirkende anti-Vektor Antwort zu verhindern (Amara *et al.*, 2002b; Nilsson *et al.*, 2001). Diese Prime Boost Strategie wurde in der vorliegenden Studie nochmals erweitert, indem verschiedene Kombinationen dreier Vektoren getestet wurden.

Zwar konnten sowohl zelluläre als auch humorale Immunreaktionen durch die Immunisierung mit der Kombination DNA/rMVA/rSFV/rSFV erzeugt werden, diese waren jedoch nicht durchgehend nach jeder Immunisierung zu beobachten. SIV-spezifische Antikörper in den Tieren der Impfstoffgruppe wurden hauptsächlich nach der letzten rSFV Immunisierung induziert. Diese Beobachtung wird durch die T-Helferzellantworten im LPA bestätigt, denn auch hier ließen sich SIV-spezifische CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen, die an der Reifung von antikörperproduzierenden B-Zellen beteiligt sind, nur nach den beiden rSFV Immunisierungen nachweisen. Im Gegensatz hierzu konnten T-Zellantworten im IFN γ -ELISpot überwiegend nach den ersten beiden Immunisierungen (DNA/rMVA) beobachtet werden, im anschließenden Zeitraum fielen diese wieder ab. Die Verwendung von kurzen Peptiden (15 Aminosäuren lang) im ELISpot macht die Stimulation auch von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) möglich. Es ist also anzunehmen, dass die verschiedenen Bereiche des Immunsystems zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert wurden, d.h. Antikörper und T-

Helferzellen durch die subkutanen rSFV Immunisierungen und CTLs durch die intradermale DNA- bzw. intramuskuläre rMVA-Immunisierung. Die Induktion dieser Immunreaktionen scheint somit abhängig vom Vektor bzw. von der Art der Applikation zu sein. Diese Vermutung erhärtet sich durch die Betrachtung der Immunisierungen anderer Teilnehmer der ENVEP Studie. So wurde analog zu unseren Ergebnissen bei der Kombination DNA/rMVA/rSFV/rMVA erst nach der rSFV Immunisierung eine T-Helferzellantwort im LPA gemessen, SIV-spezifische Antikörper wurden überhaupt nicht induziert (Koopman *et al.*, 2004). Andere konnten mit ihrer Kombination (DNA/rSFV/rSFV/rMVA) fast im gesamten Verlauf der Immunisierungen humorale und zelluläre Immunreaktionen nachweisen, die sich auch nach der letzten Immunisierung steigerten (Negri *et al.*, 2004). Auffälligerweise ließen sich auch in dieser Gruppe die T-Helferzellantworten nach der ersten rSFV Immunisierung, SIV-spezifische Antikörper nach der zweiten rSFV Immunisierung und T-Zellen im IFN γ -ELISpot hauptsächlich nach der rMVA Immunisierung nachweisen. Möglicherweise wurden also die verschiedenen Bereiche des Immunsystems zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Abhängigkeit des Vektors bzw. der Art der Applikation induziert.

In dieser Studie wurde die Impfstoffeffektivität durch die intrarektale Belastung mit dem pathogenen SIVmac251 getestet. Dieses Modell eignet sich deshalb so gut für die Situation im Menschen, weil a) die meisten Menschen über die mukosale Route infiziert werden, b) es wie im Menschen zu einem graduellen Verlust der CD4⁺ T-Zellen kommt, auf den opportunistische Infektionen und der Ausbruch von AIDS folgen und c) sich wie bei HIV-1 nur schwer neutralisierende Antikörper bilden, welche die Virusreplikation streng unter Kontrolle halten können.

Zwar vermittelten die Immunisierungen keinen Schutz der Affen vor einer SIV Infektion, dennoch lag nach der Belastung die mittlere RNA Spitzenviruslast in der Impfstoffgruppe deutlich unter denen der beiden Kontrollgruppen, eines der Impfstofftiere (Rh 224) konnte die virale Replikation sogar kontrollieren. Allerdings näherten sich im folgenden Zeitraum die Mittelwerte der Viruslasten in allen drei Gruppen auf das gleiche Niveau an. Diese Ergebnisse wurden durch zwei weitere Viruslastbestimmungen (Provirus, zellassozierte Viruslast) bestätigt. Die durch den Vektor selbst ausgelösten Immunantworten, die zu einer Aktivierung der angeborenen antiviralen Immunreaktionen oder zu erhöhten antiviralen Chemokin-konzentrationen führen könnten, spielen hierbei offenbar keine Rolle, da die Tiere der Vektor Kontrollgruppe eine mindestens genauso hohe Virämie aufwiesen, wie die Affen der naiven Kontrollgruppe.

Interessanterweise zeigten die beiden Affen mit der geringsten RNA Spitzenviruslast (Rh 224 und Rh 225, Impfstoffgruppe) als einzige bereits zwei Wochen nach der Infektion eine deutliche, Gag-spezifische Immunantwort im IFN γ -ELISpot, die zwei weitere Wochen später in verstärkter Form erneut nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise hat also in diesen beiden Tieren die Etablierung einer Gag-spezifischen T-Zellantwort zu einer verbesserten Kontrolle der Viruslast geführt. Da die Reaktionen der Impfstoffgruppe auf die Peptide im ELISpot um einiges früher einsetzten als in den beiden anderen Gruppen, kann dieser Antwort durchaus ein anamnestischer Charakter zugesprochen werden. Folglich müssten diese Reaktionen durch Gedächtnislymphozyten ausgelöst worden sein, die während der Immunisierungsphase entstanden sind. Tatsächlich ließen sich in beiden Tieren vor allem nach den ersten beiden Immunisierungen (DNA/rMVA) Gag-spezifische T-Zellen im IFN γ -ELISpot nachweisen, in Rh 224 sogar noch im Zeitraum danach. Ob die Gag-spezifischen Reaktionen dieser beiden Tiere während der Immunisierungsphase von den gleichen Gag Peptiden wie die Reaktionen nach der Belastung verursacht wurden, wird sich bedauerlicherweise nicht klären lassen, da für nähere Analysen keine PBMCs dieser Zeitpunkte zur Verfügung stehen. Dies ist jedoch zumindest prinzipiell möglich, da die während der Immunisierungsphase reaktiven Peptidgruppen in beiden Affen in den nach der Belastung reaktiven Peptidgruppen enthalten sind.

Ein weiterer Grund für die geringere Spitzenviruslast in der Impfstoffgruppe könnte der sehr schnelle Anstieg der SIV-spezifischen Antikörpertiter sein. Alle Tiere dieser Gruppe wiesen nach der letzten rSFV Immunisierung SIV-spezifische Antikörper auf, die meisten zeigten entsprechend nach der Belastung eine anamnestische Reaktion. Auffällig ist, dass der Affe (Rh 224), der als einziger die Virusreplikation kontrollieren konnte, auch als einziges Tier SIV-spezifische Antikörper am Tag der Belastung aufwies. Eine antivirale Wirkung der SIV-spezifischen Antikörper in diesem Zeitraum kann nicht auf neutralisierenden Antikörpern beruhen, da solche erst im späteren Verlauf der Infektion nachgewiesen wurden. Sie könnten jedoch die Spitzenviruslast durch andere Mechanismen wie beispielsweise die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) reduziert haben.

Neutralisierende Antikörper traten in den infizierten Tieren aller Gruppen frühestens drei Wochen nach der Infektion auf, also erst nach dem Abfall der Spitzenviruslast und wurden folglich nicht durch die Impfstoffe induziert. Die gemessenen neutralisierenden Antikörper schienen nicht in der Lage zu sein, die virale Replikation rigide zu kontrollieren, da in den meisten Tieren trotz ihrer Präsenz hohe Viruslasten auch nach der Spitzenlast zu sehen waren. Dahingegen konnte das Tier Rh 224 nach einer sehr kleinen Spitzenviruslast die Virämie

schnell kontrollieren (ab Woche 6), wies aber im Gegensatz zu den übrigen infizierten Tieren zunächst gar keine neutralisierenden Antikörper auf (bis Woche 11) und im Anschluss daran den niedrigsten Titer neutralisierender Antikörper in der Impfstoffgruppe. Die Kontrolle der Virusreplikation in diesem Affen kann folglich nicht mit den gemessenen neutralisierenden Antikörpern zusammenhängen. Dieser auch durch andere Studien belegte Befund (Vogel *et al.*, 2002), spiegelt möglicherweise das Unvermögen neutralisierender Antikörper wieder, nach der Etablierung einer systemischen HIV Infektion die Virusreplikation wirkungsvoll zu reduzieren. Interessanterweise wies das die Virusreplikation kontrollierende Tier Rh 224 nicht nur den geringsten Titer bei den neutralisierenden Antikörpern auf, es zeigte auch überwiegend die niedrigsten Werte bezüglich der SIV-spezifischen Antikörper sowie der T-Zellantworten im IFN γ -ELISpot und LPA. Die Kontrolle der Virämie führte also eventuell zu einer Verknappung viralen Antigens, welche die Ausprägung der humoralen und zellulären Immunantworten im Folgezeitraum verringert haben mag.

Mukosale Antikörper waren weder vor noch nach der Belastung in den Affen nachweisbar. Das Fehlen einer solchen Antikörperantwort kann auf einer zu geringen Sensitivität der Nachweismethoden beruhen, obwohl die rektalen Eluate mit einer dem ELISA gegenüber sechzigfach sensitiveren Methode getestet wurden. Dessen ungeachtet sind vor der Belastung kaum mukosale Antikörper zu erwarten, da die gewählten Applikationsrouten sehr viel eher auf periphere Lymphknoten als auf MALTs (Engl.: Mucosa Associated Lymphoid Tissues) zielten. Die Kompartimentierung des Immunsystems (Cromwell *et al.*, 2000) lässt einen Austausch von Lymphozyten nur in beschränktem Umfang zu, was es möglich erscheinen lässt, dass die auf Grund der rSFV Immunisierung gebildeten SIV-spezifischen B-Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten nicht in die mit den Schleimhäuten assoziierten lymphatischen Gewebe einwandern konnten und somit auch keine Antikörper in die Mukosa sezernierten.

Die Messung der absoluten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen gab keinen Aufschluss über einen Einfluss der Immunisierung auf den Krankheitsverlauf, da im Fortgang dieser Messungen bis zum Ende der Studie, knapp ein Jahr nach der Belastung, keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auftraten. Lediglich ein Tier (Rh 214) lag trotz ansonsten klinischer Unauffälligkeit mit seinen Werten bereits dauerhaft unter 200 Zellen pro Mikroliter und wies damit ein Anzeichen der Krankheitsprogression auf.

Im folgenden werden die hier dargestellten Ergebnisse kurz mit denen der anderen, an der ENVEP-Studie beteiligten Institute verglichen. Alle Institute verwendeten unterschiedliche Kombinationen der Vektoren DNA, rMVA und rSFV (Immunisierungsschemata siehe

Tabelle 1.2). Die Immunreaktionen während der Immunisierungsphase fielen in den Impfstoffgruppen sehr unterschiedlich aus, in einigen konnten so gut wie keine Immunreaktionen nachgewiesen werden, in anderen wiederum waren solche Reaktionen im Verlauf der Immunisierung beobachtbar. Allerdings ließ sich in keinem Fall eine nach jeder Immunisierung weiter gesteigerte Immunantwort erzeugen. Darüber hinaus konnte zwar keines der immunisierten Tiere vor einer SIV Infektion geschützt werden, dennoch zeigt der Vergleich eine statistisch signifikante Reduktion der Spitzenviruslasten in den Impfstoffgruppen. Zudem waren einige Tiere in diesen Gruppen imstande, ähnlich dem Tier Rh 224, die Virämie zu kontrollieren. In der Impfstoffgruppe eines Teilnehmers (mit der Kombination DNA/rSFV/rSFV/rMVA) waren dazu sogar drei von vier Affen fähig (Negri *et al.*, 2004). Offensichtlich kann also im experimentellen Tiermodell die unterschiedliche Abfolge von Impfstoffvektoren entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Impfung, sprich der ausgelösten Immunantwort und der dadurch bewirkten Kontrolle des Erregers, haben (Lehner *et al.*, 1999).

Diese Studie zeigt wie wichtig es ist, die vorhandenen Vektoren in unterschiedlichen Kombinationen zu testen, um so eine möglichst langanhaltende und breite Immunantwort zu erzeugen. Es wäre jedoch wünschenswert, mit den hier erstmals durchgeführten Dreifachkombinationen von Impfstoffvektoren deutlichere Prime Boost Effekte zu erzielen, die jene von Zweifachkombinationen übertreffen. Die in der ENVEP Studie verwendeten Impfstoffschemata lassen sich möglicherweise durch folgende Änderungen optimieren:

a.) Die verwendeten DNA Mengen (200 µg pro Konstrukt) sind zwar prinzipiell ausreichend, um in einem Prime Boost Regime eine robuste T-Zellimmunität auszulösen, dennoch ist die Verwendung größerer Mengen (2,5 mg pro Konstrukt) *per se* immunogener. Weiterentwickelte Immunisierungsschemata sollten also eine entsprechend erhöhte Menge an DNA für die Immunisierung umfassen.

b.) Die in dieser Studie verwendeten Vakzine enthalten eine für rekombinante Impfstoffe bislang ungewöhnlich hohe Anzahl an SIV Genen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine so große Zahl an zu exprimierenden Genen in den Zielzellen zu einer Interferenz bezüglich der Antigenpräsentation und folglich zu einer verminderten Immunogenität führt. Es wäre deshalb von Interesse zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Genen und dem von ihnen ausgelösten Grad der Immunantwort gibt. Eine größere Anzahl von Genen kann vielleicht dennoch durch die räumliche oder zeitliche Trennung ihrer Applikation eingesetzt werden.

c.) Die verwendeten Vektoren bzw. Applikationsrouten müssen hinsichtlich der von ihnen

bevorzugt ausgelösten Immunantworten aufeinander abgestimmt sein. Die DNA/rMVA- und rSFV-Immunsierung scheinen in unserer Studie unterschiedliche Bereiche des Immunsystems aktiviert zu haben. Dies ist zwar grundsätzlich erstrebenswert, verhindert aber möglicherweise eine kontinuierliche Steigerung der einzelnen Immunantworten. Es ist also denkbar, dass die von uns verwendeten Vektoren besser abgestimmt werden müssen. Grundsätzlich können zu diesem Zweck einzelne der drei Vektoren durch andere ersetzt werden, eine optimierte Abstimmung lässt sich gleichwohl auch durch Veränderung der Applikationsrouten erreichen, da auch diese Einfluss auf die Art der Immunreaktion nehmen können.

Andere Herausforderungen ergeben sich aus der Weiterentwicklung der vorhandenen T-Zell-induzierenden Impfstoffvektoren, um so einige von ihnen in klinische Studien der Phasen II und III bringen zu können. Dazu gehört die Steigerung der Expression von Antigenen durch die Vakzine, die man durch Codonoptimierung der HIV Gene zu erreichen versucht. Andere Ansätze versuchen die Immunogenität durch verbesserte Adjuvanzien oder die Beigabe von Zytokinen zu verbessern. Darüber hinaus wird versucht, dendritische Zellen als professionell antigenpräsentierende Zellen durch Zusätze wie CpG-Oligonukleotide oder β -Defensin direkt zu aktivieren. Alternativ dazu gibt es Bestrebungen, eine stärkere T-Zellantwort durch die gezielte Expression der viralen Antigene in den dendritischen Zellen selbst zu erreichen. Hierfür sollten die Impfstoffvektoren entweder spezifisch solche Zellen ansteuern können oder aber die Vektoren werden so konstruiert, dass die Expression der HIV Gene z.B. durch die Auswahl des Promotors einzig in diesen Zellen erfolgt.

Da eine HIV Vakzine möglichst auch wirksame neutralisierende Antikörper mit einer breiten Spezifität induzieren sollte, müssen die Konzepte zur Entwicklung entsprechender Immunogene weiterentwickelt werden. Auch die Identifizierung weiterer Epitope, die für neutralisierende Antikörper mit breiter Spezifität geeignet sind, könnte einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung eines wirksamen HIV Impfstoffes leisten.

Schließlich müssen die in den Tiermodellen gewonnen Erkenntnisse auch erfolgreich in klinischen Studien umgesetzt werden. Deshalb ist es wichtig die Kapazitäten zur Durchführung von Phase III Studien in den Entwicklungsländern weiter auszubauen, ebenso wie die Produktionsmöglichkeiten der Impfstoffkandidaten bei deren Entwicklung bedacht werden müssen, um sie anschließend in den für solche Studien benötigten Mengen herstellen zu können. Viel Engagement und umfangreiche internationale Zusammenarbeit werden nötig sein, um dieses Ziel zu erreichen. Die Zeichen für solch eine Entwicklung stehen nicht schlecht.