

mRNA-basierte Immunprophylaxe gegen Influenzavirusinfektionen

Lothar Stitz

Institut für Immunologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems (D)

In seinem elften Brief der *«Lettres philosophiques»* aus dem Jahre 1734 schreibt Voltaire über einen «seit undenklichen Zeiten» geübten Brauch der Tscherkessen «Von der Einpfropfung der Kinderblattern» [1]. Zum Schutz der Schönheit ihrer Töchter, die für Harems der damaligen Zeit bestimmt waren, wurde den Mädchen im Kindesalter Pustelmaterial der «vollkommensten und zugleich günstigsten (d.h. gutartigsten) entwickelten Pocken» durch einen Hautschnitt eingesetzt. Tatsächlich übten die Chinesen bereits seit dem 15. Jahrhundert den Brauch, getrockneten und pulverisierten Schorf von Pocken «auf angenehmere Art durch die Nase aufzunehmen wie den Schnupftabak», also lange bevor durch Edward Jenner 1798 die Methode der Vakzinierung eingeführt wurde. Heute können protektive Immunisierungen gegen eine Vielzahl von Erregern wie Viren, Bakterien (bzw. deren Toxine) oder zukünftig gegen Parasiten durchgeführt werden [2]. Immunisierungen schützen nicht nur vor Erkrankung, sondern haben sogar schon zur weltweiten Eradikation zum Beispiel der Pocken geführt.

Verschiedene Formen von Vakzinen

Auch gegen das Influenzavirus werden seit Jahrzehnten Schutzimpfungen durchgeführt. Hierbei sind verschiedene Vakzine zum Einsatz gekommen; die klassischen basieren auf kompletten Viruspartikeln, inaktiviert (Totvakzine) oder attenuiert (abgeschwächte Lebendvakzine). Bei diesen Vakzinen bestehen grundsätzlich Sicherheitsprobleme, beispielsweise wegen nicht ausreichender Inaktivierung oder unzureichender Attenuierung mit Wiedergewinnung der Virulenz aufgrund von Mutationen. «Subunit»-Vakzine sind Viruspräparationen, die nach entsprechender Behandlung von Viruspartikeln virale Bestandteile, jedoch keine vermehrungsfähigen Erreger mehr enthalten. Durch die Identifizierung der entscheidenden antigenen Strukturen können hochgereinigte Subunit-Vakzine hergestellt werden. Alle bisher genannten Vakzine sind allerdings nur in der Lage, B-Zell-Antworten auszulösen – nicht aber T-Zell-Antworten. Die Identifizierung der immunogenen Bestandteile von Viren hat aber auch zur Entwicklung «synthetischer» Vakzine geführt, bei denen synthetisierte Peptide verwendet werden, welche die entscheidenden Muster für die Induktion einer spezifischen Immunantwort enthalten. Synthetische Vakzine haben den grossen Vorteil, dass sie verhältnismässig schnell an Veränderungen der Krankheitserreger angepasst werden können, allerdings stimulieren sie selten eine gute T-Zell-Antwort.

Eine Immunisierung mit synthetischen Vakzinen ist nur erfolgreich, wenn die Immunogenität von der Aminosäuresequenz und nicht von der dreidimensionalen Struktur der antigenen Determinante abhängig ist. Eine weitere Möglichkeit zur Immunisierung gegen Krankheitserreger sind rekombinante Vakzinen, bei denen mit Hilfe von Bakterien, Hefen, Säugerzellen oder rekombinanten Viren die gewünschten, für die Impfung notwendigen Proteine hergestellt werden. Insbesondere auf viralen Vektoren basierende Vakzine (z.B. Vacciniavirus, Adenovirus) haben sich als effektiv erwiesen, da durch diese Vektoren in vivo ausreichend Antigen hergestellt wird, das eine sehr gute humorale und zelluläre Immunantwort induzieren kann. Durch Impfwischenfälle sind rekombinante Vakzine jedoch in Misskredit geraten.


Schliesslich sind DNA-Vakzine zu erwähnen, bei denen Plasmid-DNA direkt injiziert wird; in transfizierten Zellen werden die auf der DNA kodierten Fremdproteine exprimiert. Der Vorteil besteht wiederum in der Induktion einer effizienten und langlebigen B- und T-Zell-Antwort. Allerdings ging der ursprüngliche Enthusiasmus wegen der häufig schwachen Stimulierung des Immunsystems und wegen Sicherheitsbedenken verloren. Während in der Tiermedizin einige DNA-basierte Impfstoffe gegen virale Infektionen lizenziert sind (West-Nile beim Pferd, hämatopoetische Nekrose beim Lachs, Melanom beim Hund), konnte trotz intensiver Bemühungen seit den 1990er Jahren bisher keine DNA-Vakzine für die Anwendung beim Menschen lizenziert werden.

Grundlagen zu mRNA-Vakzinen

Durch die Verwendung von messenger RNA (mRNA) besteht nun eine alternative nukleinsäurebasierte Vakzinierungsstrategie [3]. Die Verwendung von mRNA hat den grossen Vorteil, dass die Translation der Proteine direkt nach Aufnahme in die Zelle im Zytoplasma abläuft. Bei Verwendung von DNA ist zunächst ein Transport in den Zellkern notwendig, wo die Transkription in mRNA stattfindet und diese erst nach Verlassen des Zellkerns im Zytoplasma translatiert wird. Hierin wird eines der Hindernisse einer effizienten DNA-Immunisierung gesehen. Weiterhin ist anders als bei der Verwendung von DNA eine Integration der mRNA in das Zellgenom nicht möglich.

Für die Verwendung von mRNA als Impfstoff ist allerdings eine Stabilisierung dieser ansonsten sehr empfindlichen Nukleinsäuren notwendig, die durch ein von der Firma CureVac (Tübingen, Deutschland) entwickel-


Der Autor ist Miterfinder bei zwei Patent-einreichungen. Der Artikel ist eine Zusammenfassung einer bereits publizierten Arbeit.

tes Verfahren erreicht wird. Für die Herstellung einer solchen RNActive®-mRNA ist es lediglich notwendig, das Gen von Interesse durch spezielle Modifikationen und Formulierungen zu optimieren (Abb. 1 ). Solche mRNA enthalten an beiden Enden des für das Protein kodierenden offenen Leserahmens untranslatierte Regionen (UTR) (5' bzw. 3' UTR mit dem Translationsstartpunkt bzw. dem Translationsstopcodon) und einen Poly-A-Schwanz (wichtig als Schutz vor Degradation durch Nukleasen). Der offene Leserahmen wiederum ist sequenzoptimiert, enthält aber keine chemisch veränderten Nukleotide. Die Stabilisierung wird durch eine GC-Anreicherung des offenen Leserahmens und eine Komplexierung mit Protamin erreicht [4]. Die Tatsache, dass bei dieser Form der Immunisierung nur Nukleinsäure Verwendung findet, kürzt die Prozedur für die Herstellung der Vakzine erheblich ab. Es ist nur erforderlich, ein krankheitsverursachendes Virus zu charakterisieren und zu sequenzieren, wie es bei jedem Seuchenverdacht ohnehin durchgeführt wird. Anschliessend wird aufgrund der Sequenz von Nukleinsäureabschnitten, von denen bekannt ist, dass deren Translationsprodukte für die Induktion einer protektiven Immunantwort wichtig sind, eine DNA synthetisiert, die wiederum als Matrize für die zur Immunisierung zu verwendende mRNA dient. Somit ist es möglich, innerhalb sehr kurzer Zeit einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen.

mRNA-Vakzine gegen das Influenzavirus

Am Influenzavirusmodell wurden die zeitlichen Bedingungen, die Anwendbarkeit und die Effizienz einer mRNA-Vakzine überprüft [3]. Bei der bisher üblichen Methode zur Vermehrung von Influenzaviren in Bruteiern oder Gewebekulturen sind die Produktionszeiten erheblich länger, da Wachstumseigenschaften der Viren in vitro sehr unterschiedlich sind und eine ausreichende Produktion vor allem von der Anzahl neu gebildeter Viruspartikel abhängig ist. Dies führt dazu, dass für die Herstellung von Impfstoffen zum Beispiel für die saisonale Grippe mit einer Zeitdauer von 4–6 Monaten gerechnet wird. Im Falle eines mRNA-Impfstoffs haben wir im Rahmen unserer Untersuchungen Szenarien durchgespielt, die bereits 6–8 Wochen nach der Veröffentlichung der Virussequenzen zu einer anwendungsfähigen Vakzine geführt haben.

Das Erreichen eines Schutzes gegen Influenzaviren gestaltet sich aufgrund von Eigenschaften dieses Virus schwierig, da durch antigenen Drift und Shift ständig Veränderungen im viralen Hämagglutinin (HA) auftreten, gegen das virusneutralisierende Antikörper gerichtet sind. Diese Änderungen der antigenen Eigenschaften sind auch dafür verantwortlich, dass generell für jedes neu auftretende Influenzavirus neue Impfstoffe hergestellt werden müssen, was dazu führt, dass die Zusammensetzung eines Influenzaimpfstoffs jährlich angepasst werden muss. Neben neutralisierenden HA-spezifischen Antikörpern werden auch Antikörper gegen die Neuraminidase (NA) induziert, die allerdings nicht virusneutralisierend wirken, wohl aber die Viruslast während einer Infektion reduzieren können, da sie

die Freisetzung reifer Viruspartikel von der Wirtszelle verhindern können. Schliesslich wird eine antivirale T-Zell-Antwort gegen konservierte Virusproteine wie NP, M1 und PB2 gerichtet, die von MHC-Klasse-I-restringierten, CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen getragen wird. Die auftretenden veränderten antigenen Eigenschaften eines Influenzavirus fordern also eine schnell adaptierbare Vakzinierungsstrategie, deren Umsetzung mit Hilfe von mRNA-Immunisierungen untersucht wurde. Zunächst konnten wir nach intradermaler Verabreichung einer HA-mRNA zeigen, dass in Mäusen sowohl eine B- als auch eine T-Zell-Antwort induziert wurde. Wurden diese Tiere anschliessend infiziert, so überlebten alle Mäuse. Allerdings zeigten Tiere, die nur einmalig mit HA-mRNA vakziniert wurden, Anzeichen einer Erkrankung. Bei einer zweimaligen Verabreichung der jeweiligen HA-mRNA-Vakzine überlebten alle Tiere ohne klinische Symptomatik (Abb. 2A ). Bei einer kombinierten Vakzinierung von HA-mRNA und NA-mRNA reichte hingegen eine einmalige Vakzinierung aus, um alle Tiere vor Symptomen zu schützen. Dieser Schutz durch HA- oder NA-mRNA-Immunisierung wurde ausschliesslich durch Antikörper vermittelt, da sich bei Depletion der T-Zellen kein nachteiliger Effekt auf den Schutz ergab. Durch die Übertragung von Seren mRNA-immunisierter Mäuse auf naive Rezipienten und anschliessende Belastungsinfektion konnte der antikörpervermittelte Schutz bestätigt werden. In allen immu-

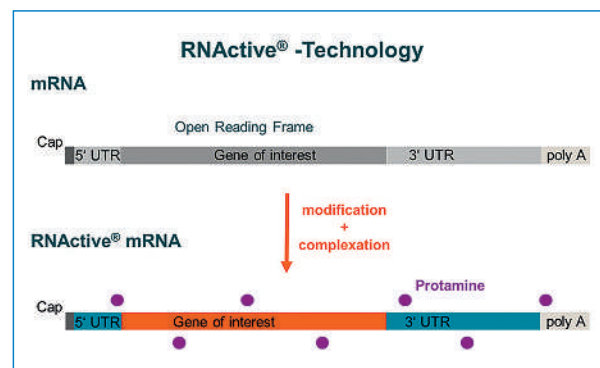


Abbildung 1 CureVacs RNActive-Technologie (mit freundlicher Genehmigung).

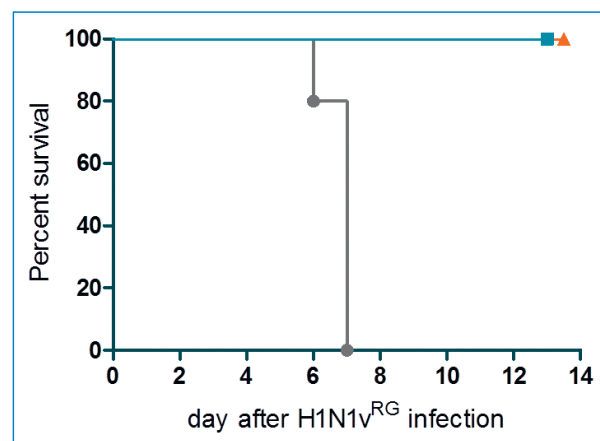


Abbildung 2A Schutz vor einer Influenzavirusinfektion bei Mäusen durch HA-mRNA-Immunisierung (▲). Eine T-Zell-Depletion verändert den Schutz nicht (●). Kontrolle (■).

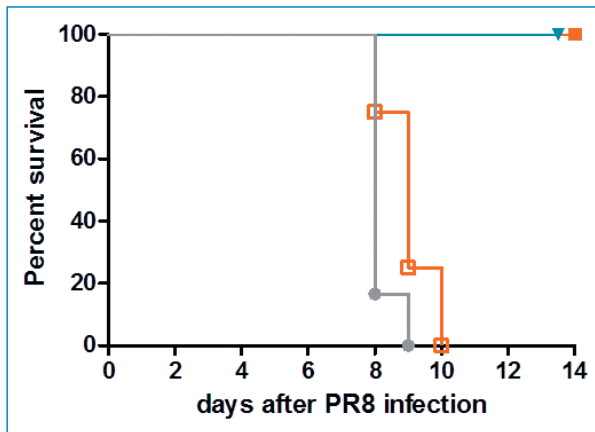


Abbildung 2B
Schutz vor einer homologen oder heterologen Influenzavirusinfektion durch NP-mRNA-Immunisierung (■). Eine T-Zell-Depletion führt zum Verlust des Schutzes (□). Kontrolle (●).

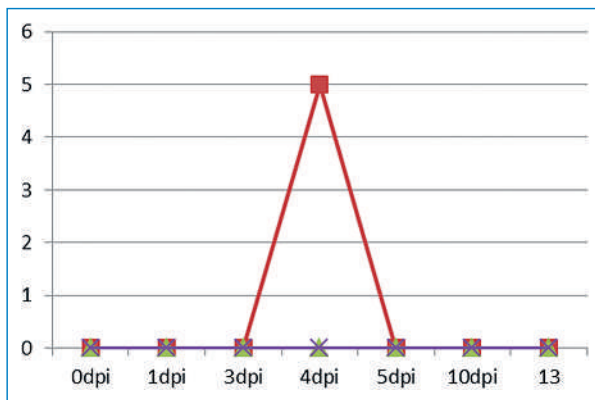


Abbildung 3A
Klinische Symptomatik nach Immunisierung mit einer HA-NP-NA-mRNA-Vakzine (▲) oder einem kommerziellen Impfstoff (X) und nachfolgender Belastungsinfektion. Kontrolle (■).

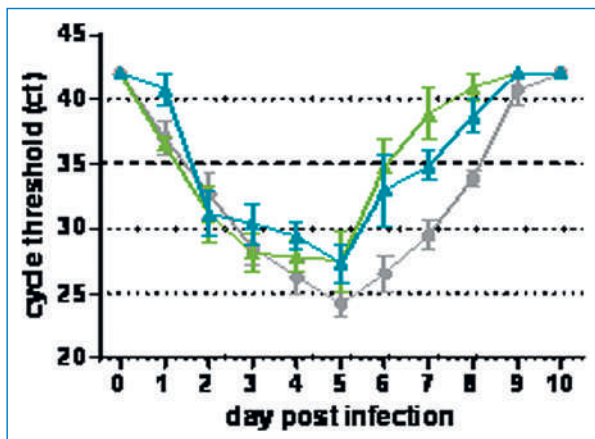


Abbildung 3B
Ergebnisse einer quantitativen RT-PCR aus Nasentupfern von HA-NP-NA-mRNA (▲) mit einem kommerziellen Impfstoff (▲) oder nicht-immunisierten Schweinen (●).

niserten Tieren war im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche Reduktion des Virustiters und eine schnellere Eliminierung des Virus aus den Lungen festzustellen. Im gleichen Modell konnte gezeigt werden, dass eine mRNA-Vakzine resistent gegen hohe Temperaturen ist (>38 °C). Weiterhin schützt die mRNA-Vakzine sowohl neugeborene als auch sehr alte Mäuse (18 Monate).

Auch die Langlebigkeit des induzierten Schutzes wurde bei Mäusen überprüft: Tiere, die im Alter von vier Wochen geimpft, aber erst im Alter von 16 Monaten infiziert wurden, überlebten ausnahmslos.

Um eine breitere Wirkung einer Influenzavakzine zu erreichen, die bei einer Epidemie oder Pandemie auch vor verschiedenen Influenza-A-Viren schützen kann, wurden Immunisierungen mit NP-mRNA durchgeführt und die Mäuse anschliessend mit unterschiedlichen Influenzastämmen infiziert (Abb. 2B [6]). NP induziert eine Kreuzprotektion gegen heterologe Viren durch eine T-Zell-vermittelte Reaktivität gegen konservierte Epitope. Um mögliche Limitationen des Mausmodells zu vermeiden, wurden auch Versuche bei Frettchen, einem anerkannten Modell für Influenzavirusinfektionen des Menschen, sowie bei Schweinen durchgeführt. In beiden Spezies konnte eine spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden. Bei Schweinen wurden auch Belastungsinfektionen durchgeführt, nach denen mRNA-immunisierte Tiere keine Erkrankung zeigten und die Viruseliminierung wiederum schneller verlief (Abb. 3 [6]). Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine Immunisierung mit mRNA einen effektiven Schutz gegen eine Influenzavirusinfektion vermittelt. Aufgrund von Arbeiten im Rabiesvirusmodell sind wir überzeugt, dass diese Befunde erfolgreicher mRNA-Vakzinierungen generalisiert werden können und mit mRNA-Vakzinen eine sehr breit anwendbare Methode zur Impfung gegen ein weites Spektrum von Pathogenen zur Verfügung steht.

Fazit

- Die mRNA-Vakzinierung bietet einen Schutz gegen Influenzaviren.
- Die mRNA-Vakzine ist innerhalb kurzer Zeit verfügbar.
- Die mRNA-Vakzine zeichnet sich durch hohe Sicherheit aus.
- mRNA-Vakzine sind wärmostabil.
- mRNA ist eine Vakzine-Plattform gegen ein breites Spektrum von Pathogenen.

Verdankung

Ich danke Dr. Annette Vogel für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Lothar Stitz
Institut für Immunologie
Friedrich-Loeffler-Institut
Südufer 10
D-17493 Greifswald-Insel Riems
[lothar.stitz\[at\]fli.bund.de](mailto:lothar.stitz[at]fli.bund.de)

Literatur

- 1 Voltaire. Lettres philosophiques ou Lettres anglaises, 1734.
- 2 The RTS,S Clinical Trials Partnership. A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01. Malaria Vaccine in African Infants. N Engl J Med. 2012;367:2284-95. DOI: 10.1056/NEJMoa1208394
- 3 Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. Nat Biotechnol. 2012;30(12):1210-6.
- 4 Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. Eur J Immunol. 2000;30:1-7.