

Reinhard Glück

Schweiz. Serum- & Impfstitut Bern

Influenza-Impfstoffe – Bewährtes und Neues

Zusammenfassung

Heutige Grippeimpfstoffe sind vorwiegend inaktivierte Virus-Vakzine. Klassische Vakzintypen sind entweder sog. Ganzvirus-Vakzine, Splitvirus-Vakzine oder Subunit-Vakzine. In Europa stehen zwei neue Grippeimpfstoffe, basierend auf Influenza-Subunits, vor der Einführung. Ein Produkt wurde in Italien entwickelt und verwendet zusätzlich zu den klassischen Subunit-Antigenen das neue Adjuvans MF59, um die Immunantwort zu erhöhen. Ein weiteres neues Produkt kommt in der Schweiz schon in der Impfsaison 1997/98 zum Einsatz: Hochgereinigte biologisch aktive Influenza-Subunits von den drei empfohlenen Impfstämmen werden an die Oberfläche von Lecithin-Liposomen gebunden.

Influenza-Viren haben eine pleomorphe Struktur mit einem Durchmesser von 100 nm bis 200 nm. Sie sind von einer Phospholipid-Membran umhüllt, auf deren Oberfläche die Membranproteine Hämagglutinin und Neuraminidase wie *Spikes* angeordnet sind. Ein drittes Protein, das sog. M₂-Ionenkanalprotein, ist ebenfalls in der viralen Membran integriert. Das virale Matrixprotein M liegt unmittelbar unter der Membran und steht in Kontakt mit dem Ribonukleoprotein. Eingebaut im Matrixprotein-Kapsid sind die acht einsträngigen RNS-Moleküle und Nukleoproteine (NP) zusammen mit den Polymerase-Proteinen¹ (Abb. 1). Eine Besonderheit der Influenza-Viren liegt darin, dass sie einer

ständigen antigenen Verwandlung unterliegen. Beide Oberflächenantigene der Influenza A-Viren, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) können sich mehr oder weniger verändern; je nach dem Grad der Veränderung spricht man von antigenem Drift oder Shift². Ein antigener Drift bedeutet eine kleine antigenere Variation des HA oder der NA, während ein Shift eine relativ grosse antigenere Veränderung beinhaltet, die bis zum Ersatz eines Gen-Segmentes gehen kann. Beispielsweise resultieren einige Punktmutationen und damit Veränderung der Aminosäure-Sequenz des HA in einem antigenen Drift³. Diese leichten Veränderungen verhindern eine Bindung der

zirkulierenden Antikörper, welche bei einer früheren Grippeinfektion gebildet worden waren, und das Virus kann nun den Wirt neu infizieren. Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass die wahrscheinlichste Erklärung für das Auftreten von neuen pandemischen Stämmen beim Menschen darin liegt, dass eine Rekombination zwischen Influenzaviren aus dem aviären Reservoir und zirkulierenden humanen Stämmen stattfindet⁴. Offensichtlich gibt es verschiedene Wege, welche zu pandemisch aktiven Viren führen. Aber die Hauptquelle aller Influenzavirus-Gene stammt aus dem Wasservogelreservoir, und viele Mutationen geschehen während der Adaptation an den humanen Wirt.

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Herstellung wirksamer Vakzine ist die jährliche Veränderung der Oberflächenantigene des Virus wegen des oben beschriebenen Drifts oder Shifts. Deshalb müssen jährlich neue Vakzine produziert werden, welche die antigenen Komponenten der aktuell zirkulierenden Stämme enthalten, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bestimmt werden. Gegenwärtige Vakzine enthalten zwei A-Influenza-Typen und einen B-Influenza-Typ.

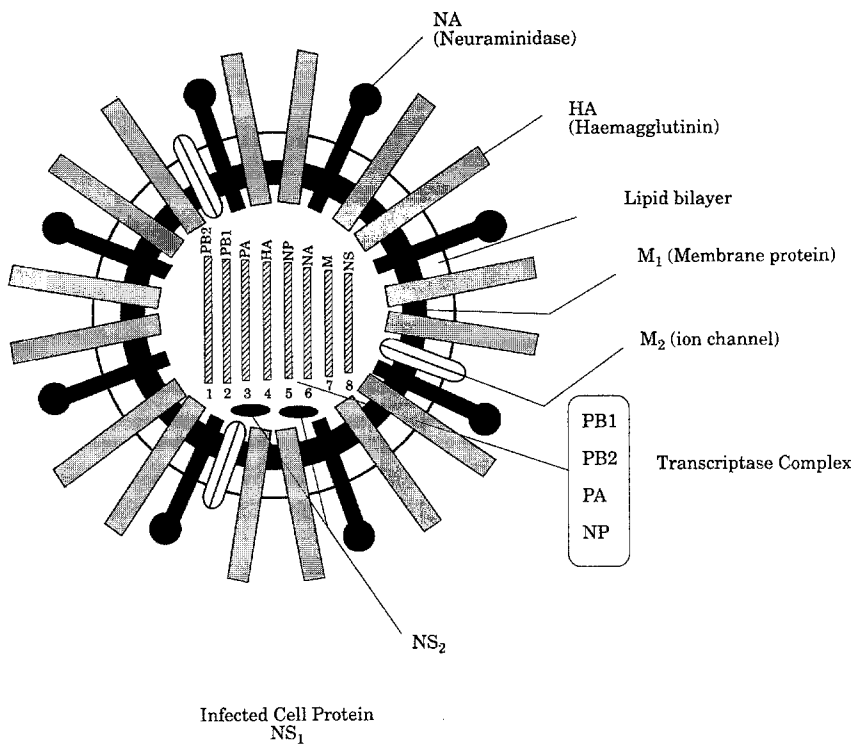


Abbildung 1. Struktur des Influenza-Virus.

Immunantwort gegen das Influenza-Virus

Eine Immunität gegen Influenza ist vermutlich lebenslang und subtypspezifisch⁵. Die Dauer der Immunität während eines antigenen Drifts ist schätzungsweise ein bis fünf Jahre, je nach Ausmass des Drifts⁶. Studien mit rekombinierten Vaccinia-Viren, welche je eines der 10 Genprodukte des Influenza A-Virus exprimierten, konnten deutlich zeigen, dass das HA und die NA die primär protektiven Antigene sind⁷. Weitere Studien in Mäusen, denen monoklonale Antikörper passiv verimpft wurden, zeigten, dass nur Antikörper gegen HA und NA schützend sind, nicht aber gegen M oder NP⁸. HA-Antikörper verhindern eine Infektion durch eine Neutralisation der Virusinfektiosität, während Antikörper gegen NA ein Ausbreiten der Viren in der Mukosa verhindern^{9,10}. In Menschen und Tieren wurden sowohl die

lokalen sekretorischen Antikörper als auch die humoralen Serum-Antikörper mit einer Verhinderung der Infektion assoziiert. IgA-Antikörper als primäre Verteidigung können intrazellulär die Virusreplikation hemmen und vermutlich aktiv an der Clearance von infektiösem Virus teilnehmen. Zusätzlich zu den humoralen und mukosalen Antikörpern tragen die CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen zu einer Immunität gegen eine Influenza-Infektion bei¹¹. Da CD4⁺-Zellen viele Epitope der viralen Proteine erkennen, vermögen viele T-Zellen bei der Abwehr mitzuwirken. Es scheint jedoch, dass die cytotoxischen T-Zellen eine relativ kleine Rolle bei der Abwehr einer Infektion spielen¹².

Klassische Influenza - Vakzine

Heutige Grippeimpfstoffe sind vorwiegend inaktivierte Virus-Vakzine. Die Virusstämme für die

Vakzine-Produktion werden in der Chorionallantois-Membran von befruchteten Hühnereiern vermehrt. Nach einer Inkubation von zwei bis drei Tagen wird das Virus in der Allantoisflüssigkeit geerntet und durch mehrere Reinigungsstufen gereinigt. Anschliessend wird das Virus inaktiviert. Heutige Vakzine-typen sind entweder sog. Ganzvirus-Vakzine, Splitvirus-Vakzine oder Subunit-Vakzine.

Eine Ganzvirus-Vakzine enthält gereinigte, intakte und inaktivierte Influenzaviren. Splitvakzine bestehen aus mit Detergens zerlegten Virusbestandteilen sowie aus noch verbleibenden inaktivierten Viren. Subunit-Vakzine schliesslich enthalten isolierte HA und NA. Die Immunogenität dieser drei Vakzine-Typen wurde in vielen Publikationen verglichen und diskutiert: Es scheint, dass Ganzvirus-Vakzine höhere Antikörpertiter induzieren bei Impfungen mit einem vorgängig tiefen Antikörpertiter, während Subunit-Vakzine eine gute Antikörper-Stimulation bei Individuen mit hohen Titern bewirkt². Eine Übersicht über die Profile der drei klassischen Grippe-Tot-Impfstoffe ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Neue Influenza-Vakzine kurz vor der Markteinführung

Sogenannte Lebendvirus-Impfstoffe befinden sich nach wie vor im experimentellen Stadium. Solche neuen lebenden Influenza-Vakzine werden durch eine sog. „Genetic Reassortment“-Technologie zwischen einem attenuierten Laborstamm sowie einem aktuell zirkulierenden Virus hergestellt. Es ist jedoch sehr wichtig, dass bei solchen Stämmen die genetische Stabilität, Sicherheit und Immunogenität jedesmal sorgfältig überprüft werden muss, bevor sie in Impfstoffen verwendet werden können. Der Zeitaufwand, der dafür notwendig ist, wird vermut-

Impfstoff	Ganzvirus	Splitvirus	Subunit
Antigen-Präsentation	optimal	suboptimal	suboptimal
Antigen-Zusammensetzung	enthält alle Bestandteile	enthält nur noch Hämagglutinin, Neuraminidase, M- und S-Protein	enthält nur ausgewählte Bestandteile
	intaktes abgetötetes Virus	nicht intaktes Virus	nur ausgewähltes Antigen
Immunogenität	+++ (*, **)	++ (***)	+

* Der Ganzvirus-Impfstoff war im Vergleich zum Splitvirus-Impfstoff immunogener²³.
 ** Der Ganzvirus-Impfstoff war auch im Vergleich zum Subunit-Impfstoff immunogener¹⁴.
 *** Andererseits erwies sich der Splitvirus-Impfstoff im Vergleich zum Subunit-Impfstoff als immunogener²⁴.

Tabelle 1. Verschiedene Profile von Grippe-Tot-Impfstoffen.

lich eine rasche Verwendung solcher Vakzine hemmen. Lebendvirus-Vakzine wären besonders geeignet für eine mukosale (nasale) Applikation. In den USA befindet sich eine solche Vakzine zur Zeit in der klinischen Phase III-Prüfung (1997).

In Europa stehen zwei neue Grippeimpfstoffe, basierend auf Influenza-Subunits, vor der Zulassung. Ein Produkt wurde in Italien entwickelt und verwendet zusätzlich zu den klassischen Subunit-Antigenen ein neues Adjuvans, um die Immunantwort zu erhöhen.

Das sog. MF59-Adjuvans resp. Microfluidizer No. 59, besteht aus einer Mischung von Tween 80, Span95 resp. Sorbitol Trioleat und Squalen¹³ (Abb. 2). Die Vakzine wurde bisher in acht klinischen Versuchen an über 1000 Freiwilligen verimpft und mit kommerziellen Produkten verglichen. Die neue Vakzine wurde generell gut vertragen mit einer leicht erhöhten Inzidenz von lokalen Nebenwirkungen. Der Antikörpertiter im Hämagglutinationshemmtest (geometrisches Mittel) am Tag 28 war signifikant besser in der MF59-Gruppe als in der in Italien verwendeten Subunit-Vakzine.

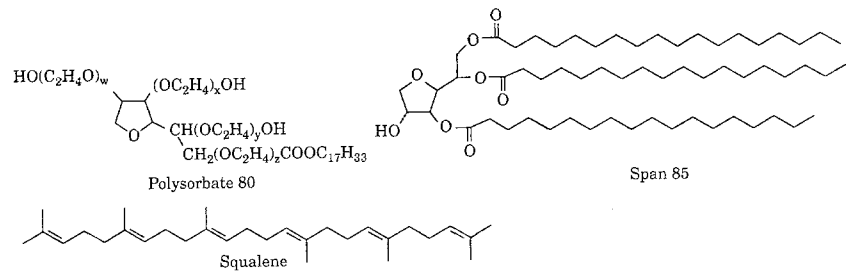


Abbildung 2. MF59-Adjuvans: Squalen-Wasser-Emulsion. Zusammensetzung: 43 mg/ml Squalen, 2,5 mg/ml Polyoxyäthylen Sorbitol Monooleat (Polysorbat 80 oder Tween 80), 2,4 mg/ml Sorbitol Trioleat (Span 85).

Ein weiteres neues Produkt kommt in der Schweiz schon in der Impfsaison 1997/ 98 zum Einsatz: Hochgereinigte biologisch aktive Influenza-Subunits von den drei empfohlenen Impfstämmen werden an die Oberfläche von Lecithin-(Phosphatidylcholin-) Liposomen gebunden¹⁴ (Abb. 3). Dadurch wird die antigene Oberfläche, die dem Immunsystem angeboten wird, praktisch verzehnfacht. Auch diese Vakzine wurde in mehr als 1000 Freiwilligen getestet und ergab deutlich bessere Ergebnisse sowohl in der Immunogenität als auch Reaktogenität. In einer Studie wurde die liposomale Vakzine mit einer kommerziellen Subunit-

sowie Ganzvirus-Vakzine verglichen. Die neue sog. virosomale Vakzine induzierte die höchsten Antikörpertiter (geometrischen Mittelwerte) sowie signifikant höhere Raten von Serokonversionen verglichen mit den anderen beiden kommerziellen Produkten (Tabelle 2).

In einer weiteren Studie konnte nach der virosomalen Vakzine im Vergleich zu Ganzvirus-Vakzinen auch eine überlegene Stimulation der Zellproliferation von peripheren Lymphozyten gemessen werden: Der virosomale Impfstoff stimulierte in vitro die mononukleären Zellen deutlich besser sowohl bei alten als auch jungen Indivi-



Abbildung 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von virosomaler Influenza-Vakzine, Vergrößerung $\times 100\,000$. Quelle: Th. Wyler, Zoologisches Institut der Universität Bern.

duen¹⁵. Diese neue Vakzine wurde auch intranasal appliziert und zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse¹⁶.

Influenza-Vakzinen als Spray-Formulierung würden die Akzeptanz der Gripeschutzimpfung in der Bevölkerung erheblich erhöhen. Zusätzlich würde die erhöhte Stimulation der sekretorischen IgA-

Antikörper zu einem vermutlich besseren Schutz führen als parenteral applizierte Impfstoffe.

Weitere neue Grippe-Vakzine verwenden sog. ISCOMs¹⁷, AS21¹⁷ oder Mikropartikel¹⁸ als Adjuvans. Diese Impfstofftypen befinden sich noch in der klinischen Testphase.

Wirksamkeit der Gripeschutzimpfung

Die Wirksamkeit der Gripeschutzimpfung wurde vielfach getestet und untersucht. Es wird geschätzt, dass gesunde Menschen im Falle eines antigenetischen Drifts ungefähr zu 70% geschützt sind. Bei älteren Leuten ist die Schutzrate wahrscheinlich etwas tiefer, aber es bleibt unbestritten, dass die Impfung den Schweregrad der Komplikationen wie Hospitalisation oder Tod signifikant reduziert. Eine sog. „Case-Control“-Studie in England konnte zeigen, dass die Mortalitätsrate in der ganzen untersuchten Bevölkerung um 75% reduziert war, wenn die Leute jährlich geimpft worden waren¹⁹. In einer anderen Studie in den USA lag die Reduktion bei 54%²⁰. Den grössten Benefit der Impfung hatten Insassen von Altersheimen mit chronischen Erkrankungen, wo ein besonders starkes Ansteckungsrisiko besteht.

Ein Doppelt-Blindversuch, plazebokontrolliert, wurde kürzlich in den USA unter der gesunden arbeitenden Bevölkerung durchgeführt²¹. Auch dieser Versuch wies der Impfung deutliche Benefits nach: Die Berechnung aller Kosten ergab eine Ersparnis von \$47 pro geimpfte Person unter Einbezug der Kosten für Impfung und Impfstoff. Die Schlussfolgerung an dieser Studie war, dass von allen präventiven Massnahmen, die der praktizierende Arzt heute zur Verfügung hat, wenige Mittel medizinisch und ökonomisch so wirksam seien wie die Gripeschutzimpfung.

Richtlinien für die Impfung

Verschiedene Richtlinien wurden durch die Nationalen Gesundheitsämter Europas und Amerikas herausgegeben. Die Gripeschutzimpfungs-Empfehlung von 28 europäischen Ländern wurde kürzlich

Vakzine	Geometrischer Mittelwert Anti-HA-Titer (Bereich)						Anzahl/≥ facher Anstieg/total (%)		
	H1N1 Singapore		H3N2 Beijing		B/Yamagata		H1N1 Singapore	H3N2 Beijing	B/Yamagata
	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach			
Ganzvirus	2,9 (0-80)	29,1* (0-320)	25,2 (0-160)	130* (10-640)	3,4 (0-20)	16,3 (0-640)	1/32 (59) p < 0,01	19/32 (59) p < 0,01	14/32 (44) p < 0,01
Virosomen	2,4 (0-80)	44,2* (0-640)	20,6 (0-320)	142* (20-2560)	2,4 (0-40)	17,5* (0-320)	52/63 (83) p < 0,01	50/63 (79) p < 0,01	42/63 (67) p < 0,01
Subunit	1,8 (0-40)	14* (0-320)	26,4 (0-160)	121* (10-5120)	2,9 (0-40)	11,4* (0-160)	14/31 (45) p < 0,01	16/32 (52) p < 0,01	10/32 (32) p < 0,01

* Gibt Werte an, welche signifikant zu Basiswerten sind (p < 0,01).

Tabelle 2. Alle drei Vakzine stimulierten einen signifikanten Titeranstieg (p = 0,01). Die höchsten geometrischen Mittelwerte wurden in der Virosomen-Gruppe erzielt. Die höchste Serokonversionsrate war ebenfalls in der Virosomen-Gruppe zu beobachten (p = 0,038-0,0016). Die schwächste Serokonversion wurde mit dem klassischen Subunit-Impfstoff erzielt.

verglichen mit derjenigen des U.S. Immunization Practices Advisory Committee²². 24 von 28 Ländern Europas (86%) hatten offizielle Empfehlungen. Europäische und amerikanische Richtlinien waren in guter Übereinstimmung betreffend die Impfung von Risikogruppen (Herz- und Lungen-Erkrankungen). Innerhalb Europas bestand eine 81-86%ige Übereinstimmung betreffend die Impfung der älteren Bevölkerung, unabhängig ihres Gesundheitszustandes sowie betreffend die Impfung von Patienten mit Diabetes, Nierensuffizienz und Immunsuppression. Schliesslich gab es eine 71%ige Übereinstimmung bei der Empfehlung für Angestellte in Altersheimen und Spitälern, die die Grippe dort übertragen können. Im Gegensatz zu den USA empfahlen 62-71% der europäischen Länder keine Impfung bei Patienten mit Hämoglobinopathien, Kindern und Teenagern, welche Salicylate einnehmen oder Hausangestellten, welche bei Risikopatienten arbeiten. Es wurde vermutet, dass die Unterschiede bei den Impfempfehlungen eine gewisse Unsicherheit reflektieren, die die Risiken durch die Grippe und die Benefits der Impfung betreffen. Zudem wurden Unterschiede bei den Gesundheitssystemen sowie unterschiedlichen Anstrengungen bei der Präventivmedizin für die bestehenden Differenzen verantwortlich gemacht.

Summary**Current and new influenza vaccines**

Current influenza vaccines in use at present are predominantly inactivated virus vaccines. The vaccines currently in use are designated whole-virus vaccines, split virus vaccines or subunit vaccines. In Europe, two new types of influenza vaccines have reached the commercial introduction. One is produced in Italy and uses the new adjuvant MF59 to enhance the immune response. The other type is produced in Switzerland and uses phosphatidyl choline (lecithin) liposomes as surface antigen carriers.

Résumé**Influenza vaccins: Classique et nouveautés**

Les vaccins actuels sont principalement des vaccins viraux inactivés. Les différents types de vaccins classiques sont des vaccins à virus entier, des vaccins à virus fractionné ou des vaccins à subunités. En Europe deux nouveaux vaccins grippaux de types subunité se trouvent devant leur introduction. L'un des deux produits a été développé en Italie; en plus des antigènes subunité classiques le vaccin contient le nouvel adjuvant MF59 destiné à augmenter la réponse immunitaire. L'autre produit sera déjà introduit en Suisse pour la saison vaccinale 1997/98: Des antigènes viraux sous forme de subunité biologiquement active, hautement purifié, provenant des trois souches vaccinales recommandées sont liées à la surface des liposomes de lécithine.

Literaturverzeichnis

- 1 Lamb RA, Krug MR. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. Chapter 45. Fields Virology, Third Edition. Ed. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al. Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers, 1996: 1353–1395.
- 2 Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. Chapter 46. Fields Virology, Third Edition. Ed. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al. Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers, 1996: 1397–1445.
- 3 Six HR, Webster RG, Kendal AP, Glezen WP, Griffis C, Couch RB. Antigenic analysis of H1N1 viruses isolated in the Houston metropolitan area during four successive seasons. *Infect Immun* 1983; 42: 433–458.
- 4 Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian- to – human transmission of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989; 63:4603–4608.
- 5 Gill PW, Murphy AM. Naturally acquired immunity to influenza type A. Lessons from two coexisting subtypes. *Med J Aust* 1985; 142: 94–98.
- 6 Frank AL, Taber LH, Glezen WP, Paredes A, Couch RB. Reinfection with influenza A (H3N2) virus in young children and their families. *J Infect Dis* 1979; 140: 829–836.
- 7 Epstein SL, Misplan JA, Laswon CM, Subbarao EK, Connors M, Murphy BR. β_2 -microglobulin-deficient mice can be protected against influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase. *J Immunol* 1993; 150:5484–5493.
- 8 Askomas BA, McMichael AJ, Webster RG. The immune response to influenza viruses and the problem of protection against infection. In: Beare AS ed. Basic and applied influenza research. Boca Raton, FL: CRC Press, 1982: 159–188.
- 9 Clements ML, Betts RF, Tierney EL, Murphy BP. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild type virus. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 157–160.
- 10 Murphy BR, Kasel JA, Chanok RM. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N Engl J Med* 1972; 286:1329–1332.
- 11 Lightman S, Cobbold S, Waldmann H, Askonas BA. Do L3T4 + T cells act as effector cells in protection against influenza virus infection. *Immunology* 1987; 62:139–144.
- 12 McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PAS. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 1983; 309:13–17.
- 13 Martin T, Gasparini R, De Donato S, Ambrozaitis A, Schwarz J et al. Enhanced immunogenicity of Chiron Biocine adjuvanted influenza vaccine in the elderly. Abstract W12-5, for “Options for the Control of Influenza III”, Cairns, Australia, 4–9 May 1996.
- 14 Glück R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Scarpa B, Cryz SJ Jr. Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in elderly people. *Lancet* 1994; 344:160–163.
- 15 Saurwein-Teissl M, Steger MM, Glück R, Cryz S, Grubeck-Loebenstein B. In vitro studies on the stimulatory effects of a new virosome influenza vaccine on T cells from young and old healthy individuals. Abstract for Symposium of Oesterr. Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Vienna November 21–23, 1996.
- 16 Glück R. Humoral, mucosal and systemic immunization using immunopotentiating reconstituted in-

- influenza virosomes (IRIV) based vaccines. Abstract W12-2, for “Options for the Control of Influenza III”, Cairns, Australia, 4–9 May 1996.
- 17 *Bengtsson KL, Sjölander A.* Adjuvant activity of iscoms; effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine* 1996; *14*:753–760.
- 18 *Wood J, Coombes AGA, Major D, Minor PD, Davis SS.* Polyactide microparticles as adjuvants for parenteral delivery of influenza vaccine. Abstract W12-1, for “Options for the Control of Influenza III”, Cairns, Australia, 4–9 May 1996.
- 19 *Ahmed A'EH, Nicholson KG, Nguyen-Van Tam JS.* Reduction in mortality associated with influenza vaccine during 1989–1990 epidemic. *Lancet* 1995; *346*:591–595.
- 20 *Nichol KL, Margolis KL, Wuorema J, Von Sternberg T.* The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. *N Engl J Med* 1994; *331*:778–784.
- 21 *Nichol KL, Lind A, Margolis M, McFadden R.* et al. The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. *N Engl J Med* 1995; *333*:889–893.
- 22 *Nicholson KG, Snachem R, Palache AM.* Influenza immunization policies in Europe and the United States. *Vaccine* 1995; *13*:365–368.
- 23 *McElhaney JE.* Antibody response to whole-virus and split-virus influenza vaccines in successful ageing. *Vaccine* 1993; *11*:1055–1060.
- 24 *Zei T.* Immunogenicity of trivalent influenza vaccines (1989–1990 winter season) in volunteers of different groups of age. *Vaccine* 1991; *9*:613–617.

Korrespondenzadresse

Dr. R. Glück
Schweiz. Serum & Impfinstitut
Postfach 2707
CH-3001 Bern