

Immunogenität und Protetivität eines inaktivierten Hepatitis A-Impfstoffes auf Liposomenbasis

F. Ambrosch¹, B. Althaus², R. Glück², Ch. Herzog², Susanna Jonas¹, G. Wiedermann¹

Einleitung

Als Folge der in den letzten Jahrzehnten eingetretenen epidemiologischen Veränderungen hat die Hepatitis A auch in klinischer Hinsicht zunehmend an Bedeutung gewonnen (3, 4). Dies war der Anlaß für die Entwicklung geeigneter langfristig wirksamer Impfstoffe.

Unsere Arbeitsgruppe am Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien hat bereits vor rund zehn Jahren begonnen, den ersten technologisch ausgereiften inaktivierten Hepatitis A-Impfstoff (6) klinisch und immunologisch zu untersuchen. Dieser von SmithKline Beecham in Rixensart entwickelte Impfstoff (Havrix[®]) enthält formalin-inaktiviertes Hepatitis A-Virus, das zur Steigerung der immunisierenden Wirkung an das bei den meisten inaktivierten Virusimpfstoffen verwendete Adjuvans Aluminiumhydroxid adsorbiert ist. In mehreren Studien haben wir diesen Impfstoff hinsichtlich der erforderlichen Antigenosis, des optimalen Impfschemas, der Wirksamkeit und der Schutzdauer sowie zuletzt der Stabilität und der Kombinierbarkeit mit anderen Impfstoffen ausführlich untersucht (1, 2, 5, 14, 15, 21, 22, 23). Die von uns publizierten Ergebnisse waren auch Grundlage für die Empfehlungen des amerikanischen Center of Disease Control zur Durchführung der Hepatitis A-Impfung (8).

Inzwischen wurden auch von anderen Herstellern ähnliche Impfstoffe auf der gleichen Basis entwickelt und zum Teil auf den Markt gebracht. Daneben wurde auch versucht, durch Erhöhung der Antigenosis die Immunogenität der Impfstoffe zu verbessern und das Impfschema zu vereinfachen (18).

Ein neuartiges immunologisches Prinzip wurde hingegen vom Schweizer Serum- und Impfinstitut in Bern aufgegriffen (12, 13). Dabei wird das inaktivierte Hepatitis A-Virus nicht an Aluminiumhydroxid, sondern an Liposomen gebunden. Diese Liposomen bestehen aus natürlichen Phospholipiden, im wesentlichen aus Lecithin, und bilden doppelmembranige Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 15 nm. Das inaktivierte Hepatitis A-Virus bindet sich mit seinen hydrophoben Ankersequenzen an die Oberfläche dieser Vesikel. Außerdem befindet sich an der Oberfläche dieser Liposomen auch Influenzavirus-Hämagglutinin des verbreiteten H1N1-Stammes A/Singapore/6/86, das sich an neuraminsäurehaltige Rezeptoren immunkompetenter Zellen binden kann. Dadurch kann offensichtlich der Immunisierungsvorgang verstärkt und beschleunigt werden. Die solcherart konstruierten Liposomen werden auch als IRIV's (Immunostimulating Reconstituted Influenza Virosomes) bezeichnet.

Tabelle 1:

Epaxal-Studie KV-9208
Demographische Daten der Probanden

	weiblich	männlich	gesamt
Anzahl	57	55	112
durchschnittl. Alter (Jahre)	21	23	22
Standardabweichung (Jahre)	2	5	4
Median (Jahre)	20	22	21

Tabelle 2:

Epaxal-Studie KV-9208
Studien-Plan

	Tag -7	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Monat 6	Monat 12	Monat 13
Voruntersuchung	x						
Blutabnahme	x		x	x	x	x	x
Impfung		x				x	
Fragebogen		x				x	
Blutchemie	x		x				
anti-HAV	x		x	x	x	x	x

Tabelle 3:

Epaxal-Studie KV-9208
Hämatologische und
blutchemische Untersuchungen

Untersuchte Laborparameter:
<u>Hämatologische Befunde:</u>
Erythrozyten
Haemoglobin
Färbeindex
Haematokrit
MCV (mittl. Zellvolumen)
MCH (mittleres Zell-Hb)
MCHC (mittlere Zell-Hb-Konz.)
Leukozyten
Thrombozyten
<u>Blutchemische Befunde:</u>
Alkalische Phosphatase
Gamma-GT
GOT
GPT

sowie eine Blutabnahme zur Feststellung eventuell vorhandener HAV-Antikörper und zur Überprüfung der hämatologischen und blutchemischen Parameter (Tab. 3) vorgenommen wurde. Weitere Blutabnahmen zur Wiederholung der Blutuntersuchungen sowie zur quantitativen Bestimmung der gebildeten Antikörper erfolgten am Tag 14 und 28 sowie nach 6, 12 und 13 Monaten. Etwaige Lokal- und Allgemeinreaktionen in den ersten drei Tagen nach der Impfung wurden mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens durch Selbstaufzeichnung dokumentiert. Dabei wurden sowohl lokale als auch allgemeine Reaktionen anhand einer Punkteskala beantwortet (0 = keine Reaktion, 1 = mild, 2 = mäßig, 3 = schwer).

Die serologischen Untersuchungen der Serumproben erfolgte mit Hilfe einer von Berna entwickelten ELISA-Methode. Dabei wurden Titer ab einem Wert >10 mIU/ml als positiv bewertet. Ein Teil der Sera wurde mit einer Modifikation des von BINN (7) entwickelten Virus-Neutralisationstests untersucht.

Ergebnisse

Verträglichkeit

Lokale Impfreaktionen wurden von insgesamt 45 Personen (40%) angegeben (Tab. 4). Die Symptome wurden aber fast immer als mild eingestuft und dauerten durchschnittlich ein bis zwei Tage.

Insgesamt 38 Personen (34%) geben systemische Beschwerden an (Tab. 5). Die Stärke der Beschwerden war mild bis mäßig, sie dauerten ein bis eineinhalb Tage. Das am häufigsten genannte Symptom war Kopfschmerz. Insgesamt zeigt sich das Bild einer typischen Backgroundsymptomatik.

Die Sicherheit, Verträglichkeit und Antigenität dieses neuen Impfstoffes waren in mehreren Untersuchungen bestätigt worden (9, 10, 11, 16, 17, 20). Wir führten mit diesem Impfstoff (Epaxal®) eine klinisch-immunologische Studie durch (KV-9208), um die Immunogenität, die Antikörperkinetik und die protektive Wirkung der gebildeten Antikörper genauer zu untersuchen.

Material und Methode

Der von uns untersuchte Impfstoff enthielt 500 RIA-Einheiten Hepatitis A-Virusantigen (Stamm RG-SG) gekoppelt an 100 mcg Lezithin pro Impfdosis (0,5ml). Die Injektion wurde intramuskulär in den linken M. deltoideus verabreicht.

Geimpft wurden 112 gesunde erwachsene Personen, im wesentlichen Medizinstudenten (Tab. 1). Sie wurden gemäß der Deklaration von Helsinki über Art und Zweck der Untersuchung informiert und erklärten sich schriftlich mit der Teilnahme einverstanden. Der Studienplan (Tab. 2) sah eine Grundimmunisierung mit einer einzelnen Impfdosis und eine Boosterung nach einem Jahr vor.

Etwa eine Woche vor der ersten Impfung erfolgte eine Voruntersuchung, in der die Anamnese erhoben und die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft wurden

Tabelle 4:

Epaxal-Studie KV-9208
Lokalreaktionen

Symptom	N	durchschnittliche Stärke nach Score	Durchschnittliche Dauer in Tagen
Schmerz	25	1.00	1.24
Rötung	6	—	2.67
Verhärtung	19	1.07	1.89
Schwellung	11	1.12	2.09
Verfärbung	3	—	2.00
Juckreiz	2	1.25	1.00
Schweregefühl	2	—	2.00
Druckempfindlichkeit	2	1.00	1.50

Tabelle 5:

Epaxal-Studie KV-9208
Systemische Reaktionen

Symptom	N	durchschnittliche Stärke nach Score	Durchschnittliche Dauer in Tagen
Kopfschmerzen	25	1.32	1.36
Unwohlsein	14	1.15	1.50
Appetitlosigkeit	11	1.30	1.36
Müdigkeit	2	2.00	2.00
Übelkeit	4	1.00	1.50
Halsschmerzen	3	1.30	2.67
Husten	2	1.35	2.00
Temperatur	2	37.7° C	1.50
Ohrsausen	1	2.00	1.00
Juckreiz	1	0.75	2.00
Magenbeschwerden	1	X	1.00
Schwindel	1	1.00	1.00
Schnupfen	1	1.50	2.00

Tabelle 6:

Epaxal-Studie KV-9208
Immunogenität

	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Monat 6	Monat 12	Monat 13
N	112	111	111	86	98	97
GMT (mIU/ml anti-HAV) < 10	109	176	179	175	1884	
Serokonversion	—	97%	99%	99%	99%	100%

Keiner der untersuchten Laborparameter zeigte bei der postvakzinalen Nachkontrolle am Tag 14 eine Veränderung, die auf einen Effekt der Impfung hätte zurückgeführt werden können. Insbesondere war keine klinisch relevante Beeinflussung der Leberenzyme festzustellen.

Immunogenität

Bereits am Tag 14 zeigten 97% und am Tag 28 sogar 99% der Probanden im ELISA eine Serokonversion (Tab. 6). Nur ein Proband hatte nach einem Monat einen Titer von weniger als 10 mIU/ml. Der geometrische Mittelwert aus allen auswertbaren Probanden zeigte nach 14 Tagen und nach 28 Tagen 109 bzw. 176 mIU/ml (Abb. 1).

Zur Überprüfung der protektiven Wirkung der gebildeten Antikörper wurde zunächst eine Stichprobe von sechs Seren mit Hilfe eines neu entwickelten Virusneutralisationstests (NT) untersucht (Tab. 7). Dabei zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine gute Korrelation zwischen ELISA und NT (mit Ausnahme der im Monat 13 abgenommenen Proben, da hier der NT nicht ausverdünnt wurde), insbesondere auch bereits am Tag 14 und 28 (Abb. 2).

Diskussion

Aufgrund experimenteller Befunde und theoretischer Überlegungen erschien es mit dem neu entwickelten Hepatitis A-Liposomenimpfstoff möglich, die immunisierende Wirkung des inaktivierten Hepatitis A-Virus zu verstärken und zu beschleunigen und so mit einer einmaligen Grundimpfung etwa das gleiche zu erreichen wie mit zwei Impfdosen des konventionellen Impfstoffes. Die gemessenen ELISA-Titer, die am Tag 14 bereits eine Serokonversion von 97% und am Tag 28 eine solche von 99% zeigen, scheinen diese Erwartungen zu bestätigen.

Es ist jedoch von anderen Untersuchungen bekannt, daß die in einem frühen Stadium der Immunisierung gebildeten Antikörper im ELISA bereits gut reagieren, aufgrund ihrer geringeren Affinität aber ihre volle protektive Wirkung noch nicht voll entfaltet haben. Dies läßt sich anhand der virusneutralisierenden Aktivität beurteilen (19). Aus diesem Grund wurden zunächst je zwei Personen mit niedrigen, mittleren und hohen ELISA-Titern ausgewählt und ihre zu den einzelnen Zeitpunkten abgenommenen Sera im Neutralisationstest untersucht (Tab. 7). Dabei zeigt sich bereits eine gute Übereinstimmung mit den ELISA-Titern bis in einen Bereich von etwa 500 mIU/ml. (Bei dem höheren Titer im Monat 13 können die Werte nicht mehr verglichen werden, da die Sera für den Neutralisationstest in dieser ersten Serie nicht ausverdünnt wurden.) Diese wird auch durch die gute Korrelation der einzelnen Werte im Korrelationsdiagramm (Abb. 2) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9 bestätigt.

Allerdings ist eine statistische Signifikanz auf Grund der geringen Anzahl von untersuchten Sera noch nicht gegeben. Für eine endgültige Aussage ist daher die Untersuchung einer größeren Zahl von Personen bzw. Sera erforderlichlich.

Tabelle 7:

Epaxal-Studie KV-9288

Titer-Vergleich ELISA – Neutralisationstest

SERUM NR. 32		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	12	neg.
2.	133	1 : 36
3.	149	1 : 60
4.	120	1 : 49
5.	145	1 : 55
6.	38.250	1 : 82

SERUM NR. 93		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	9	neg.
2.	124	1 : 26
3.	127	1 : 40
4.	171	1 : 51
5.	126	1 : 49
6.	4.288	1 : 49

SERUM NR. 58		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	11	neg.
2.	79	1 : 31
3.	104	1 : 60
4.	170	1 : 30
5.	118	1 : 52
6.	743	1 : 45

SERUM NR. 104		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	20	neg.
2.	243	1 : 84
3.	314	1 : 99
4.	496	1 : 171
5.	435	1 : 141
6.	2.486	1 : 180

SERUM NR. 68		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	8	neg.
2.	114	1 : 53
3.	222	1 : 25
4.	272	1 : 57
5.	266	1 : 83
6.	54.289	1 : 120

SERUM NR. 142		
Blut- abnahme	ELISA	Neutr.- test
1.	1	neg.
2.	39	1 : 34
3.	83	1 : 53
4.	99	1 : 73
5.	102	1 : 62
6.	832	1 : 83

Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden klinischen Bedeutung der Hepatitis A erhält auch die Impfstoffforschung neue Impulse. Eines der Ziele ist dabei die Vereinfachung des Impfschemas.

Wir untersuchten einen neuen vom Schweizer Serum- & Impfinstitut entwickelten Impfstoff auf Liposomenbasis (Epaxal®), bei dem inaktiviertes Hepatitis A-Virus zusammen mit Influenzavirus-Antigen an der Oberfläche von Liposomen gebunden ist, die aus natürlichen Phospholipiden bestehen.

Insgesamt 112 Personen erhielten zwei Dosen des Impfstoffes i. m. Die Verträglichkeit wurde anhand von Selbstbeobachtungs-Bögen beurteilt, außerdem wurden am Tag 0 und 14 das Blutbild und die blutchemischen Parameter kontrolliert. Zur Beurteilung der Immunogenität wurden zu diesen Zeitpunkten sowie nach 1, 6, 12 und 13 Monaten Blutproben für die Bestimmung der Hepatitis A-Antikörper mittels ELISA und Neutralisationstest gewonnen.

Die Verträglichkeit des Impfstoffes war lokal und allgemein ausgezeichnet. Die Serokonversion im ELISA-Test betrug 99% nach der 1. und 100% nach der 2. Impfung. ELISA- und Neutralisationstiter zeigten eine gute Korrelation.

Schlüsselwörter

Hepatitis A-Impfung, Liposomen, Immunogenität, Protektivität, ELISA, Virusneutralisationstest.

Summary

Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine

Vaccine research concerning hepatitis A vaccine is presently pursuing two goals: to make vaccines even more effective and to make vaccination procedures easier.

We investigated a new inactivated hepatitis A vaccine based on liposomes (Epaxal®) developed by the Swiss Serum- and Vaccine Institute (Berna). These liposomes are composed of natural phospholipids, which carry on its surface inactivated hepatitis A viruses as well as influenza virus haemagglutinin.

Altogether 112 volunteers received two doses of this vaccine in month 0 and month 12 intramuscularly. Tolerability was evaluated by means of questionnaires, besides that bloodchemical and haematological investigations were performed on day 7 and 14. Blood samples for serologic evaluation drawn on days 7, 14, 28 and at months 6, 12 and 13 were investigated by ELISA and partially by neutralization test. Local and systemic tolerability of the vaccine was excellent. Seroconversion rates were 99% after one and 100% after two doses. ELISA and neutralization titers were well correlated.

Key words Hepatitis A vaccine, liposomes, immunogenicity, protectivity, ELISA, neutralization test.

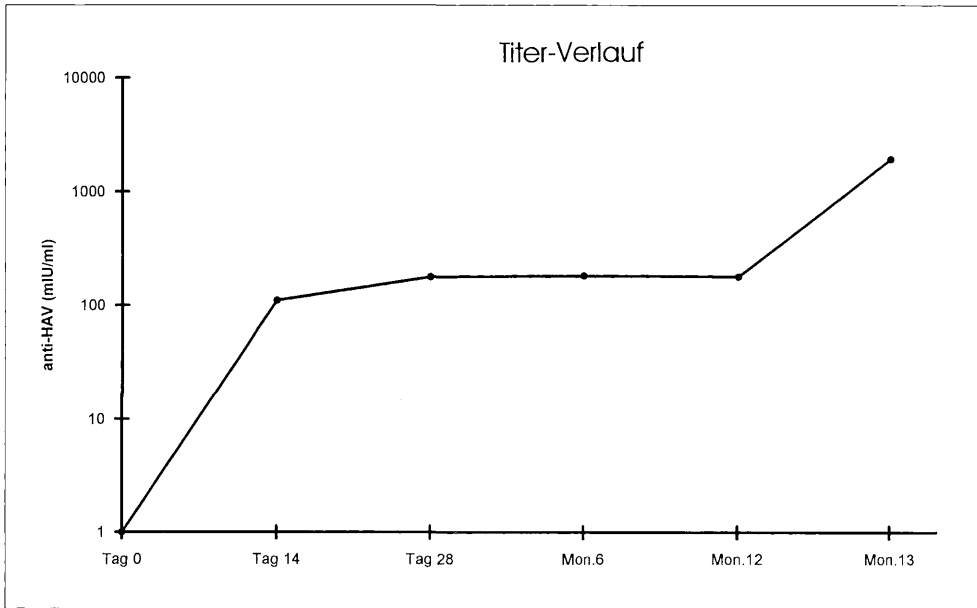


Abbildung 1:
Epaxal-Studie KV-9208

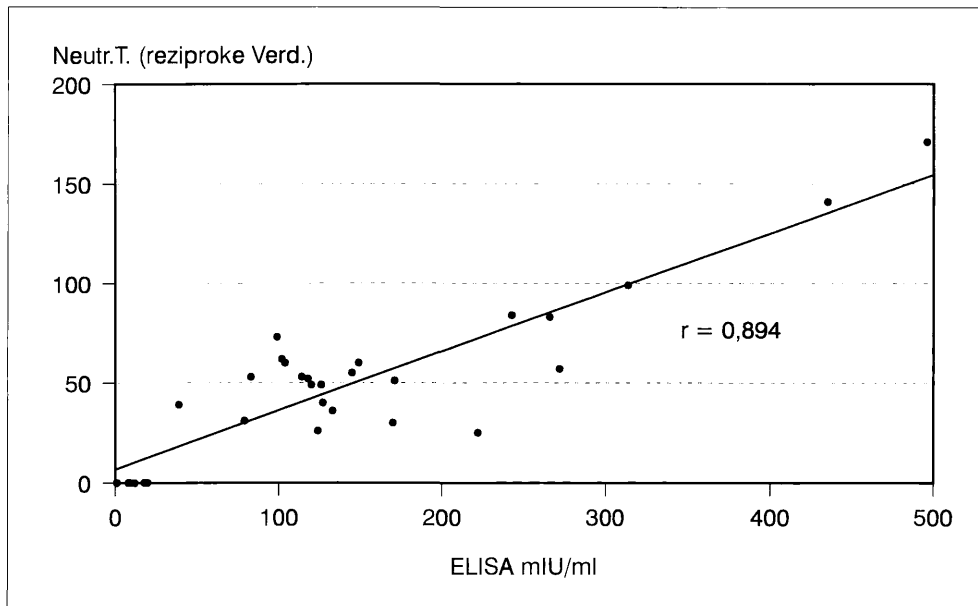


Abbildung 2:
Epaxal-Studie KV-9208
Vergleich zwischen ELISA und Neutralisationstest

Literatur

1. AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G., ANDRÉ, F. E., d'HONDT, E., DELEM, A., SAFARY, A. (1991): Comparison of HAV antibodies induced by vaccination and natural infection. In: *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, p. 98-100. Eds.: Hollinger, B., Lemon, S. M., Margolis, H. S., Williams and Wilkins, Baltimore.
2. AMBROSCH, F., ANDRÉ, F. E., DELEM, A., d'HONDT, E., JONAS, Susanna, KUNZ, Ch., SAFARY, A., WIEDERMANN, G. (1992): Simultaneous vaccination against hepatitis A and B: Results of a controlled study. *Vaccine* 10, Suppl. 1, 129-131.
3. AMBROSCH, F., JONAS, Susanna, KUNZ, Ch., ANDRÉ, F., WIEDERMANN, G. (1994): Aktive Immunisierung gegen Hepatitis A – Impfstrategien und zukünftige Perspektiven. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 16, 115-122.
4. AMBROSCH, F., JONAS, Susanna, KUNZ, Ch., ANDRÉ, F., WIEDERMANN, G. (1994): Active immunization against hepatitis A. *Tropical Medicine and Parasitology* 45, 145.
5. AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G., ANDRÉ, F. E., DELEM, A., GREGOR, H., HOFMANN, H., d'HONDT, E., KUNDI, M., WYNEN, J., KUNZ, Ch. (1994): Clinical and immunological investigation of a new combined hepatitis A and hepatitis B vaccine. *J. Med. Vir.* 44, 452-456.
6. ANDRÉ, F. E. (1991): Development of a vaccine against hepatitis A. In: *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, p. 85-88. Eds.: Hollinger, B., Lemon, S. M., Margolis, H. S., Williams and Wilkins, Baltimore.
7. BINN, L. N., MacARTHUR, P. O., MARCHWICKI, R. H., SJOGREN, M. H., HOKE, Jr., C. H., BURGE, J. R., d'HONDT, E. (1992): Laboratory tests and reference reagents employed in studies of inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine*, Vol. 10, Supp. 1, 102-105.
8. Center of Disease Control (CDC) (1995): Licensure of inactivated hepatitis A vaccine and recommendations for use among international travelers. *MMWR* Vol. 44, No. 29, 559-560.
9. FRÖSNER, G. G., DATHE, O., ALTHAUS, B., GLÜCK, R., ERHARDT, F., EISENBURG, J., PHILLIP, J., HEUN, M., FRÖHLICH, C. (1994): Hohe Immunogenität und geringe Nebenwirkungen eines neuartigen Liposomenimpfstoffes gegen Hepatitis A. In: *Virushepatitis A bis E – Diagnose, Therapie, Prophylaxe*, p. 222-224. Hrg.: Maas, G., & Stück, B., Kongressbericht des Deutschen Grünen Kreuzes, Kilian Verlag, Marburg.
10. GLÜCK, R., ALTHAUS, B., BERGER, R., JUST, M., CRYZ, S. J., Jr. (1992): Development, safety and immunogenicity of new inactivated hepatitis A vaccines: effects of adjuvants. *Travel Medicine 2 (Proc. 2nd Int. Conf. Travel Med. Atlanta 1991)*, p. 135-136. *Int. Soc. Travel Med., Atlanta.*
11. GLÜCK, R. (1992): Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV's) and other adjuvants for improved presentation of small antigens. *Vaccine* 10, 915-919.
12. GLÜCK, R., MISCHLER, R., BRANTSCHEN, S., JUST, M., ALTHAUS, B., CRYZ, S. J. Jr. (1992): Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *J. Clin. Invest.* 90, 2491-2495.
13. GLÜCK, R. (1995): Liposomal presentation of antigens for human vaccines. In: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, p. 325-345. Eds.: Powell, M. F., Newman, M. J., Plenum Press, New York.
14. JONAS, Susanna, AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G. (1992): Hepatitis A-Impfung: Untersuchungsergebnisse und Einsatzmöglichkeiten. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 14, 211-222.
15. JONAS, Susanna, AMBROSCH, F., SAFARY, F., DELEM, A., ANDRÉ, F., WIEDERMANN, G. (1993): Impfung gegen Hepatitis A und B: Vergleich zwischen singulärer, simultaner und kombinierter Anwendung. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 15, 83-87.
16. JUST, M., BERGER, R., DRECHSLER, H., BRANTSCHEN, S., GLÜCK, R. (1992): A single vaccination with an inactivated hepatitis A liposome vaccine induces protective antibodies after only two weeks. *Vaccine* 10, 737-739.

17. LOUTAN, L., BOVIER, P., ALTHAUS, B., GLÜCK, R. (1994):
Inactivated virosome hepatitis A vaccine.
Lancet 343, 322-324.
18. PIERER, Karen, MARTH, E., KESSLER, H. H., SANTNER, Brigitte, PSCHAID, Andrea, SAFARY, A.,
STÜNZNER, Doris (1993):
Erfahrungen mit dem Hepatitis A-Impfstoff.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 79-82.
19. VIDOR, E., XUEREF, C., BAJARD, A., FANGET, B. (1994):
Analysis of the immune response of volunteers after vaccination with Pasteur Merieux inactivated hepatitis A
vaccine.
Am. J. Trop. Med. Hyg., Vol. 51, Nr. 3, Suppl. 153.
20. WEGMANN, A., ZELLMAYER, M., GLÜCK, R., FINKEL, B., FLÜCKIGER, A., BERGER, R., JUST, M. (1994):
Immunogenität und Stabilität eines aluminiumfreien liposomalen Hepatitis A-Impfstoffes (Epaxal Berna®).
Schweiz. Med. Wschr. 124, 2053-2056.
21. WIEDERMANN, G., AMBROSCH, F., KOLLARITSCH, H., HOFMANN, H., KUNZ, Ch., d'HONDT, E., DELEM, A.,
ANDRÉ, F. E., SAFARY, A., STEPHENNE, J. (1990):
Safety and immunogenicity of an inactivated hepatitis A candidate vaccine in healthy adult volunteers.
Vaccine, Vol. 8, 581-584.
22. WIEDERMANN, G., AMBROSCH, F., ANDRÉ, F. E., d'HONDT, E., DELEM, A., SAFARY, A. (1992):
Persistence of vaccine-induced anti-HAV antibodies.
Vaccine 10, Suppl. 1, 142-145.
23. WIEDERMANN, G., AMBROSCH, F. (1994):
Immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine after exposure at 37° C for 1 week.
Vaccine 12, no. 5, 401-402.

Korrespondenzadresse: Univ. Prof. Dr. Franz Ambrosch
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: [17](#)

Autor(en)/Author(s): Ambrosch Franz, Althaus B., Glück R., Herzog Ch., Jonas Susanna, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Immunogenität und Protetivität eines inaktivierten Hepatitis A-Impfstoffes auf Liposomenbasis. 201-208](#)