

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Immunogenität und Wirksamkeit attenuierter, rekombinanter modifizierter Vakziniavirus Ankara-Impfstoffpräparationen (rMVA), in die *gag/pol*-, *env*-, *nef*-, *rev*- oder *tat*-Gene des Affenimmundefizienzvirus (SIV) inseriert wurden, im SIV-Makakenmodell untersucht. Die Studie ordnet sich damit in die aktuellen Forschungsanstrengungen um die Entwicklung einer AIDS-Vakzine auf Basis rekombinanter, lebender viraler Vektoren zur Induktion einer protektiven Immunantwort gegen HIV-Infektionen des Menschen ein.

Im Rahmen eines Verbundprojektes der European Concerted Action „Genetic Strategies for an HIV-Vaccine“ wurden in einer ersten Versuchsreihe vier adulte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Wochen nach Basisimmunisierung mit jeweils 1×10^6 PFU aller fünf verschiedener rMVA-Konstrukte intramuskulär immunisiert. Einer Kontrollgruppe aus vier weiteren Versuchstieren wurden zeitgleich zur Abgrenzung vektorbedingter Effekte MVAwt-Präparationen verabreicht. Alle acht Rhesusaffen wurden in der 32. Woche nach Erstimmunisierung einer Belastungsinfektion durch tonsilläre Applikation von 2000 TCID₅₀ pathogenem SIVmac251 ausgesetzt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden drei weitere Rhesusaffen einmalig mit rMVA-Konstrukten immunisiert, die SIV-Env-, -Nef oder -Gag/Pol exprimierten, um weitere Erkenntnisse über eine SIV-spezifische zelluläre Immunantwort nach Impfstoffverabreichung zu erhalten.

Während der Immunisierungsphase wurden alle Versuchstiere auf Induktion einer SIV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort untersucht. Nach der SIV-Belastungsinfektion wurden als Marker für eine Krankheitsprogression und den Infektionsverlauf zusätzlich die Virusbelastung im Blut, Veränderungen der zahlenmäßigen Anteile der T-Lymphozytenpopulationen und die Neopterinkonzentration in Urinproben der Tiere bestimmt.

Virusspezifische T-Helferzellen konnten in sechs von sieben Rhesusaffen nach der ersten Immunisierung mit SIV exprimierenden rMVA-Präparationen nachgewiesen werden. Obwohl eine derartige Aktivität nach den beiden Wiederholungsimpfungen nicht mehr nachweisbar war, fanden sich bei allen immunisierten Tieren spätestens nach der zweiten Immunisierung temporär SIV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten gegen eines oder mehrere SIV-Proteine. Die CTL-Analyse beschränkte sich dabei im Rahmen dieser

Versuchsreihen auf eine Spezifität gegen SIV-Env, -Nef und -Gag/Pol. Serumantikörper waren bei den SIV-rMVA-Impfungen der ersten Versuchsreihe nur deutlich gegen SIV-Env nachweisbar. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion konnten sekretorische IgA-Immunglobuline mit einer Spezifität gegen SIV-Env lediglich in Speichel- und Rektaltupferproben des Versuchstieres mit der längsten symptomfreien Überlebenszeit nach SIV-Inokulation nachgewiesen werden.

Nach tonsillärer SIV-Verabreichung konnte aus dem Blut aller Tiere der ersten Versuchsreihe Virus isoliert werden und es entwickelte sich eine anamnestiche bzw. primäre humorale Immunantwort. Dennoch war bei einem der spezifisch SIV-immunisierten Rhesusaffen eine partielle Schutzwirkung zu beobachten. In diesem Tier konnten ab der 12. Woche nach Belastungsinfektion keine infektiösen Zellen im Blut mehr nachgewiesen werden. Die Anzahl viraler RNA-Kopien im Blutplasma war bei diesem Rhesusaffen bereits in der Initialphase der Infektion deutlich niedriger als bei den übrigen Versuchstieren und blieb auch im weiteren Beobachtungszeitraum auf dem niedrigsten Niveau. Virales p27-Antigen war nur zwei Wochen nach der Belastungsinfektion und in etwa 25-fach niedrigerer Konzentration als bei den übrigen Tieren im Blutplasma nachweisbar. Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigte dieser Affe darüberhinaus eine gleichbleibende Anzahl von CD4⁺-T-Lymphozyten und eine hohe SIV-spezifische CTL-Aktivität.

Diese Ergebnisse bestätigen die potentielle Wirksamkeit von SIV-rMVA-Vakzinepräparationen. Trotz des Fehlens einer sterilen Immunität nach einer SIV-Infektion scheinen diese Impfstoffkonstrukte das Immunsystem offensichtlich in die Lage zu versetzen, die virusspezifische zelluläre Immunantwort zu aktivieren und damit entweder Krankheitssymptome zu verhindern oder den Krankheitsverlauf zumindest zu verlangsamen. Zukünftig könnten SIV-rMVA-Konstrukte in sogenannten „Prime-Boost“-Vakzinierungsstrategien in Kombination mit DNA-Präparationen, rekombinanten Proteinen oder Impfstoffen auf Basis anderer lebender Virusvektoren eine Grundlage für die Entwicklung von HIV-Impfstoffen bilden.

7. SUMMARY

Anja Vollmers:

Immunogenicity and efficacy of modified vaccinia virus Ankara (MVA) recombinant for simian immunodeficiency virus (SIV)*gag/pol*, SIV*env*, SIV*nef*, SIV*rev* or SIV*tat* in rhesus macaques

In the present study the immunogenicity and efficacy of highly attenuated modified vaccinia virus Ankara vectors recombinant for the SIV genes *gag/pol*, *env*, *nef*, *rev* or *tat* were investigated using the macaque model. This experiment fits in the current efforts to develop an AIDS-vaccine based on recombinant viral vectors that can induce a protective immunity against human HIV-infection

Within the framework of the European Concerted Action „Genetic Strategies for an HIV-Vaccine“ in the first approach four adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*) were immunized intramuscularly with 1×10^8 PFU each of rMVA constructs expressing SIV-Gag/Pol, -Env, -Nef, -Rev or -Tat at week 0, 12 and 24. In order to exclude vector specific immune effects, a control group of four animals was mock-immunized with MVA wild type at the same timepoints. At week 32 post first immunization all eight monkeys were challenged with 2000 TCID₅₀ pathogenic SIVmac251 via the tonsillar route. In a second round of experiments further three rhesus macaques were immunized once with MVA recombinant for SIV-*gag/pol*, *-env* or *-nef* to extend the data on SIV-specific cell-mediated immune responses induced by the vaccine.

During vaccination all animals were examined for an SIV-specific cellular and humoral immune response. Following challenge the viral load in blood, the T-cell subsets and the urinary neopterin concentration were determined as markers of infection and disease progression.

In six out of the seven immunized rhesus macaques virus-specific T-helper cells responses were detectable after the first immunization. These effects could not be maintained by the booster immunization, but disappeared. However, after the second immunization at the latest all immunized monkeys showed transient SIV-specific cytotoxic T-lymphocytes against one or several SIV proteins. The CTL-analysis within these series of experiments was confined to a specificity against SIV-Gag/Pol, -Env, and -Nef. The first group of

vaccinees mounted serum antibodies only against SIV-Env. At the time of the challenge secretory IgA with a specificity against SIV env could only be detected in saliva and rectal swabs of the one monkey who survived longest without any clinical symptoms after SIV-inoculation.

After tonsillar challenge all rhesus macaques from the first experiment became infected as indicated by virus recovery from blood and development of an anamnestic or primary humoral immune response. However, one of the immunized monkeys was partially protected. By 12 weeks post challenge no virus could be isolated in the blood of this animal. Viral RNA copy numbers in the plasma were initially lowest in this monkey compared to the other test animals and further also remained on the lowest level. Viral p27 core antigen in plasma was measurable only two weeks post challenge at a concentration approximately 25 times lower than that determined in the other animals. Moreover, during the whole observation period CD4⁺ lymphocyte counts remained normal and CD8⁺ T-cells showed a high SIV-specific cytotoxic activity.

These findings confirm the potential efficacy of SIV expressing rMVA vaccines. Despite the lack of a sterile immunity, immunological priming with such constructs seems to be able to activate a virus-specific cellular immune response after SIV infection thus preventing clinical symptoms or at least delaying the disease course. This means that rMVA constructs can form a basis for future HIV-vaccines like in prime-boost-vaccination strategies in which they are combined with DNA-, subunit vaccines or other recombinant live virus vectors.