

Immuntherapie der allergischen Rhinitis ohne Allergene?

Neue Möglichkeiten einer Immunmodulation durch Vakzinierung mittels „virus-like particles“ und CpG-Motiven

Allergische Erkrankungen der oberen Atemwege haben in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zugenommen und gehören in Europa zu den häufigsten chronischen Erkrankungen überhaupt [1, 2]. Die allergische Rhinitis ist nach der WHO-Initiative ARIA („allergic rhinitis and its impact on asthma“) definiert als IgE-vermittelte Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut mit entsprechender Symptomatik nach Allergenexposition [2]. Neben der Allergenkarrenz ist die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) als einzig kausaler Therapieansatz für die allergische Rhinitis akzeptiert [1, 2, 18, 19]. Auch andere allergische Erkrankungen spielen in der HNO-Heilkunde eine wichtige Rolle [3, 4, 5, 6].

Allgemein wird für die Durchführung der SIT die serielle Applikation von Allergenextrakten auf sublingualen oder subkutanen Applikationsweg mit initial ansteigender Allergendosis und ggf. nachfolgender Erhaltungsdosis empfohlen [2, 7, 8]. Dies führt zu einer Reduktion von Symptomen und des Verbrauchs symptomatischer Medikation, zur Verbesserung der Lebensqualität und zu vielfältigen weiteren Verbesserungen der Situation des Patienten [2]. Zudem zeigten sich in klinischen Studien über die Therapiephase hinausgehende Langzeiteffekte [9]. Für die subkutane Immunthe-

rapie konnte nachgewiesen werden, dass sie der Entwicklung von Neusensibilisierungen und der Progression in ein Asthma bronchiale vorbeugen kann [2]. Offene Fragen und häufig diskutierte Punkte der SIT sind u. a. immer noch die weitere Reduktion von therapiebedingten unerwünschten Ereignissen [9], die nicht unerhebliche Therapiedauer mit der Folge einer verbesserungsbedürftigen Therapieadhärenz der Patienten und fehlende Daten zur Effektivität bei polysensibilisierten Patienten [9]. Verschiedene neue Ansätze wurden vorgeschlagen und diskutiert, die schnellere, sicherere Therapie regime mit geringerem Aufwand und weniger Nebenwirkungen ermöglichen sollen [4, 7, 8, 9, 10]. Relativ weit entwickelt sind in dieser Hinsicht Therapien mit unveränderten rekombinanten Majorallergenen und hypoallergenen Allergenvarianten [10], die Peptidimmuntherapie [12] und die intralymphatische Immuntherapie [13].

» Bisher wird die serielle Applikation von Allergenextrakten empfohlen

Alle diese Therapien basieren jedoch weiterhin auf dem Dogma der allergenspezifischen Immuntherapie, nämlich dass zu-

mindest Allergenkomponenten für eine wirksame Therapie notwendig sind. Dieses Dogma könnte jedoch durch aktuelle Ergebnisse von effektiven Immuntherapien ohne Allergen ins Wanken kommen [14, 15].

„Virus-like particles“ (VLP) sind Viruspartikel, die keine Nukleinsäure enthalten, also weder DNA noch RNA, und deshalb nicht replikationsfähig sind. Sie entsprechen dem Kapsid von Viren oder Bakteriophagen und stellen eine neue interessante Impflatform für eine Immuntherapie bei Inhalationsallergien dar [16]. Pathogenspezifische VLP-Vakzine erweisen sich als gut verträglich, immunogen und effektiv für die prophylaktische Impfung gegen Papillomavirusinfektionen dargestellt [14]. Zudem wurden VLP des Bakteriophagen Q β auch als Träger für verschiedene andere Impfstoffe gegen tumoröse und infektiöse Erkrankungen untersucht.

In ihrer Funktion als Viruskapsid können Bakteriophagen-VLP mit Nuklein-

Einige Inhalte dieses Artikels wurden von den Autoren und ihren Arbeitsgruppen in anderen Artikeln, auch in Übersichten zu speziellen Aspekten der spezifischen Immuntherapie bereits publiziert. Diese werden hier teilweise wiederholt, da die genannten Arbeiten nicht allen Lesern der Zeitschrift *HNO* ohne Weiteres zugänglich sind.

Hier steht eine Anzeige.



säuren gefüllt werden. Sie stabilisieren diese Nukleinsäuren und schützen diese zudem vor dem Abbau durch Enzyme. So können Bakteriophagen-VLP, z. B. mit Oligodeoxynukleotiden, die CpG-Motive enthalten, befüllt werden. CpG-Motive enthalten Cytosin, Phosphat und Guanin, die als Sequenzmotiv vom humanen Immunsystem über den „Toll-like receptor 9“ (TLR9) erkannt werden. Tumorantigene können auf die Oberfläche solcher VLP gekoppelt werden und führten klinisch zu einer Induktion von spezifischen T-Zellen bei Patienten mit Melanom [16]. Gleichartige CpG-Motive wurden erfolgreich als Adjuvantien im Rahmen von prophylaktischen Vakzinierungen eingesetzt [14]. Die VLP-Technologie in Kombination mit der Anwendung von CpG-Motiven könnte dazu beitragen, komplexe Krankheiten wie maligne Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Allergien ursächlich zu behandeln [16].

Im Folgenden werden nach einer Einführung in die Immunologie allergischer Reaktionen die aktuell vorhandenen klinischen Erfahrungen mit Bakteriophagen-VLP gefüllt mit CpG-Motiven für die Behandlung der allergischen Rhinitis aufgezeigt.

Immunologie allergischer Reaktionen

Allergische Krankheiten entstehen durch Fehlregulation der immunologischen Antwort auf Umweltantigene. Allgemein wird die Immunantwort gegen Allergene durch T-Lymphozyten gesteuert und die Fehlregulation betrifft die übermäßige Entwicklung eines von Interleukin(IL)-4, IL-5 und IL-13 dominierten Zytokinmusters von T-Helfer-Lymphozyten Typ 2 (TH2-Zellen; [17]). Diese immunologischen Mechanismen sind notwendig auch für das Verständnis der Wirkweise von VLP und CpG-Motiven bei allergischen Erkrankungen. Sie sind zudem die Grundlage für die Wirkung zahlreicher Medikamente, u. a. topischer Glukokortikosteroide [18, 19].

Allergien können durch Langzeitapplikation möglichst großer Mengen des betreffenden Allergens gebessert werden, indem die fehlgeleitete Immunantwort in

Richtung normale Immunität verändert werden soll [17].

Die allergische Immunantwort entsteht durch Aktivierung spezifischer TH2-Lymphozyten durch hohe Mengen von IL-4, IL-5 und IL-13. Durch IL-4 werden B-Lymphozyten dazu gebracht, IgE zu produzieren, und IL-5 fördert, dass die an Eosinophilen reiche allergischen Entzündungsreaktionen generiert und aktiviert werden [17]. Mit zunehmender Dauer der allergischen Erkrankung sind auch TH1-Zellen mit Produktion von Interferon(IFN)- γ und Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- α , - β beteiligt. Die TH1-Zellen wirken direkt an der Zerstörung des Gewebes im entzündeten Organ mit [20]. Auch IL-17 produzierende TH17-Zellen haben wesentlichen Anteil an der chronischen Entzündungsreaktion [17]. Sie entstehen bei chronischer Aktivierung von Epithelzellen mittels „transforming growth factor- β “ (TGF- β) und IL-6 und sind in der Lage, allergische Effektor-T-Zellen zu aktivieren. TH17-Zellen produzieren neben IL-17 auch große Mengen IL-21 und IL-22.

» Die allergische Immunantwort weist eine hohe Zahl von T_{reg}-Zellen auf

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass sowohl bei der SIT als auch bei der normalen Immunantwort gegen Allergene T-Zellen entstehen, die große Mengen an IL-10 und/oder TGF- β produzieren [21]. Durch diese beiden regulatorische Zytokine werden die Proliferation und Zytokinproduktion der Effektor-T-Zellen unterdrückt. Diese T-Zellen entwickeln sich, wie die anderen Subpopulationen auch, aus naiven Vorläufern zu einer eigenständigen, regulatorischen T-Zell-Population [17]. Sie werden deshalb als regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bezeichnet. Dabei handelt es sich um allergenspezifische T-Zellen, die durch die Produktion immunregulatorischer Zytokine und eine schwache Proliferation gekennzeichnet sind und für ihre regulatorische Wirkung ständige Aktivierung über dendritische-, antigenpräsentierende Zellen (APZ) und Kontakt mit dem Antigen benötigen [17]. Entsprechend exprimieren sie in hohem Maße verschiedene Ak-

tivierungsmarker, wie den IL-2-Rezeptor CD25 [17]. Im frühen Entwicklungsstadium sind sie zudem typischerweise durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 („Forkhead box protein 3“) charakterisiert [21]. T_{reg}-Zellen und Foxp3 benötigen zu ihrer Entwicklung aus naiven Vorläufern hohe Mengen Antigen sowie TGF- β . Bei der Bestimmung der Anzahl peripherer T_{reg}-Zellen nach Antigenstimulation von Blutlymphozyten von Allergikern und Gesunden zeigte sich, dass sich die gesunde von der allergischen Immunantwort vorwiegend durch die hohe Menge allergenspezifischer T_{reg}-Zellen – im Verhältnis zu den TH1- und TH2-Zellen – und durch die Bildung einer spezifischen Toleranz unterscheiden [20]. Die Generierung einer hohen Anzahl peripherer T_{reg}-Zellen und somit die Induktion von immunologischer Toleranz gegen ein Allergen ist deshalb das eigentliche Ziel der SIT. Die T_{reg}-Zellen sind allerdings nur durch ihre Funktion definiert und stellen daher keine einheitliche Population dar [17].

» Eine erfolgreiche SIT beruht auf der Entwicklung von T_{reg}-Zellen und Toleranzinduktion

Die Aktivierung naiver T-Zellen in Verbindung mit dendritischen Zellen (DC) kann zur Bildung sowohl von TH1- und TH2- als auch von TH17- oder T_{reg}-Zellen führen. Eine genügend hohe Anzahl von T_{reg}-Zellen im Verhältnis zu den Effektor-T-Zellen ist notwendig, um die Immunantwort im Gleichgewicht zu halten [17]. Alle funktionellen T-Zell-Subpopulationen – auch die T_{reg} – entstehen aus denselben naiven Vorläufern unter Einwirkung verschiedener Zytokine und entwickeln sich in voneinander unabhängige Subpopulationen [21]. Die Entwicklung der verschiedenen funktionellen T-Zell-Typen wird durch Zytokine und den daraus hervorgehenden Transkriptionsfaktoren gesteuert. Mittels IL-12 werden die TH1-Zellen mit dem Transkriptionsfaktor T-bet gebildet. Durch IL-4 entstehen TH2-Zellen mit dem Transkriptionsfaktor GATA-3, die Entwicklung des Transkriptionsfaktors Foxp3 in T_{reg}-Zellen benötigt TGF- β zur Entstehung von TH17-Zellen und für den Transkriptionsfaktor ROR γ t

sind IL-6 und TGF- β zusammen notwendig [20]. Die entsprechenden Transkriptionsfaktoren sind sichere Marker der einzelnen T-Zell-Subpopulationen [17].

Bislang wird davon ausgegangen, dass bei der subkutanen wie auch der sublingualen Immuntherapie nur durch die Verwendung hoher Antigenmengen spezifische T_{reg}-Zellen induziert werden, wie sie zur Entwicklung spezifischer Immuntoleranz notwendig sind [17]. Zur Induktion von Toleranz und spezifischer T_{reg}-Zellen ist prinzipiell vom Antigen nur die Bindungsstelle für MHC-II-Moleküle und den T-Zell-Rezeptor notwendig. Deshalb kann immunologische Aktivierung und Toleranz durch eine SIT auch allein nur mit einer Peptidmischung von immunogenen T-Zell-Epitopen erzeugt werden [20]. Identisch zur gesunden Immunabwehr wird bei der erfolgreichen SIT die fehlgeleitete, allergische Immunantwort in eine normale, durch T_{reg}-Zellen ausgewogene Immunantwort zurückgeführt. Dies resultiert in einer allergenspezifischen Toleranz und einer hohen Zahl von IL-10-sezierender T_{reg}-Zellen [21]. Im Verlauf der SIT wird IL-10 ebenfalls durch B-Zellen und dendritische Zellen sowie Monozyten/Makrophagen produziert, womit diese Zellen an der Aufrechterhaltung des toleranten Zustands beteiligt werden [17].

» Allergenmenge und Bindungsstärke bestimmen das Zytokinmuster der T-Zellen

Lösliches Antigen/Allergen muss durch die APZ aufgenommen, verarbeitet und als Peptid an die MHC-Moleküle der Klasse II (HLA-DR, DQ, DP) gebunden und den spezifischen T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor dargereicht werden. Zusätzliche Bindungsmoleküle und Rezeptoren („accessory molecules“) helfen bei schwacher Antigenbindung oder kleinen Antigenmengen, die wirksame Bindungskraft zwischen APZ und T-Zelle zu verstärken [17]. Eine hohe Anzahl von Interaktionen zwischen den antigenspezifischen T-Zellen und den APZ über das an MHC-II-Moleküle gebundene Antigenpeptid und den T-Zell-Rezeptor ist notwendig, um eine T-Zelle vollständig zu

HNO 2013 · 61:826–833 DOI 10.1007/s00106-013-2761-9
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

L. Klimek · J. Willers · P. Schendzielorz · T.M. Kündig · G. Senti

Immuntherapie der allergischen Rhinitis ohne Allergene? Neue Möglichkeiten einer Immunmodulation durch Vakzinierung mittels „virus-like particles“ und CpG-Motiven

Zusammenfassung

Hintergrund. Die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) wird allgemein als einziger kausaler Therapieansatz für die allergische Rhinitis akzeptiert. Bislang besteht als ein Dogma der Immuntherapie bei Inhalationsallergien, dass zumindest Allergenkomponenten für eine wirksame Therapie notwendig sind. Dieses Dogma könnte jedoch durch aktuelle Ergebnisse von effektiven Immuntherapien ohne Allergen ins Wanken kommen. „Virus-like particles“ (VLP) stellen einen neuen interessanten Aspekt für eine Immuntherapie bei Inhalationsallergien dar.

Ziel der Arbeit. Erste Erfahrungen zu erfolgreichen Immuntherapien ohne Allergenextrakte liegen vor. Im vorliegenden Beitrag werden die aktuell vorhandenen klinischen Erfahrungen mit Bakteriophagen-VLP, gefüllt mit CpG-Motiven, für die Behandlung der allergischen Rhinitis aufgezeigt.

Ergebnisse. VLP-Vakzine wurden als gut verträglich, immunogen und effektiv für die pro-

phylaktische Impfung verschiedener Infektionen dargestellt. Bakteriophagen-VLP, gefüllt mit Oligonukleotiden, die CpG-Motive mit Tumorantigenen auf ihrer Oberfläche enthalten, führten klinisch zu einer Induktion von spezifischen T-Zellen bei Tumorpatienten und wurden erfolgreich als Adjuvantien im Rahmen von prophylaktischen Vakzinierungen eingesetzt.

Schlussfolgerung. Die VLP-Technologie in Kombination mit der Anwendung von CpG-Motiven könnte dazu beitragen, komplexe Krankheiten wie maligne Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Allergien ursächlich zu behandeln.

Schlüsselwörter

„Virus-like particles“ · CpG-Motive · Vakzinierung · Allergische Rhinitis · Immuntherapie

Immunotherapy of allergic rhinitis without allergens? New options for immunomodulation by vaccination with virus-like particles and CpG motifs

Abstract

Background. Allergen-specific immunotherapy is generally accepted as the only causal therapy for allergic rhinitis. Up to now there has been a dogma in immunotherapy for inhalation allergies that at least allergen components are necessary for effective therapy. This dogma could, however, be swayed by current results of effective immunotherapy without allergens. Virus-like particles (VLP) represent a novel and interesting aspect for immunotherapy for inhalation allergies.

Aim. Initial experiences with successful immunotherapy without allergens are available. This article describes the currently available clinical experiences with bacteriophage VLPs filled with oligonucleotides which contain CpG motifs with tumor antigens on the surface for the treatment of allergic rhinitis.

Results. Vaccination with VLPs was found to be well tolerated, immunogenic and effective for prophylactic treatment of various infections. Bacteriophage VLPs filled with CpG motifs with tumor antigens on the surface led clinically to an induction of specific T-cells in tumor patients and were successfully implemented as adjuvants during prophylactic vaccinations.

Conclusion. The VLP technique in combination with the use of CpG motifs could contribute to the causal treatment of complex diseases, such as malignancies, autoimmune diseases and allergies.

Keywords

Virus-like particles · CpG-motifs · Vaccine therapy · Allergic rhinitis · Immunotherapy

aktivieren. Eine suboptimale Interaktion zwischen APZ und T-Zelle durch zu geringe Antigenmengen führt zu einer nur teilweisen T-Zell-Aktivierung und Entwicklung eines IL-4/IL-5-dominierten TH2-Zytokin-Musters. Offensichtlich

werden zur Entwicklung eines TH1-Zytokin-Musters und auch von IL-10-produzierenden T_{reg}-Zellen wesentlich höhere Allergenkonzentrationen benötigt. Dabei spielt die Stärke der individuellen Antigenerkennung durch MHC-II-Moleküle

mit den T-Zell-Rezeptoren eine bedeutende Rolle. Tatsächlich scheint es, dass die Bindung von allergenen T-Zell-Peptiden bei Allergikern wesentlich geringer ist als bei Nichtallergikern. Nach dem chemischen Massenwirkungsgesetz, das grundsätzlich auch für biologische und biochemische Reaktionen gilt, kann dies durch höhere Antigenmengen aufgewogen werden. Insgesamt ergibt sich daraus zwangsläufig, dass hohe Allergenmengen, wie sie bei der SIT über längere Zeit verabreicht werden, bevorzugt eine normale Immunität mit IL-10/TGF- β - und IgG4/IgA-Antikörperbildung induzieren [20]. Allergiker und Nichtallergiker erkennen grundsätzlich dieselben immunogenen Determinanten (Epitope) in einem Allergen [21].

Auch bei Impfungen besteht ein wesentlicher Aspekt der Wirkung in einer möglichst starken und lang anhaltenden Induktion von T-Helferzellen, immunologischen Gedächtniszellen und einer starken B-Zell-Antwort.

Immunantworten durch VLP und CpG-Motive

VLP

Zu Beginn einer VLP-induzierten Immunantwort werden die Antigene von APZ aufgenommen. Hierbei können die optimale Größe, Form, Oberflächenstruktur, hydrophobe bzw. hydrophile Eigenschaften und Rezeptorinteraktionen die Aufnahme begünstigen [16]. Der Größe von Nanopartikeln wie VLP kommt eine besondere Bedeutung beim Eintritt in das lymphatische System zu [14]. In den APZ wird das Antigen prozessiert, die Proteine werden degradiert und Peptide in Verbindung mit MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche der APZ zur Stimulation von CD4-T-Zellen präsentiert. Durch die geringe Größe der VLP kann alternativ auch eine Präsentation der antigenen Peptide über MHC-I-Moleküle und Induktion einer CD8-T-Zell-Antwort eingeleitet werden [16].

Dendritische Zellen können in verschiedene Populationen unterteilt werden: myeloische DC (mDC) sezernieren überwiegend IL-12, CD8-lymphoide DC können zytotoxische T-Lymphozyten induzieren und plasmazytoide DC (pDC)

IFN- α produzieren [16]. Liganden des TLR, wie CpG-Motive, können die Aktivierung von antigenpräsentierenden DC durch Bindung an den TLR der pDC massiv stimulieren [16].

CpG-Motive

Das menschliche Immunsystem kann durch verschiedene pathogenassoziierte molekulare Strukturen von Viren und andere Mikroorganismen aktiviert werden. Hierzu gehören unmethylierte CG-reiche Deoxynukleotidmotive, die in bakteriellen Genomen regelmäßig repräsentiert sind, im Genom von Vertebraten jedoch nicht oder ggf. nur in methylierter Form. Unmethylierte CpG-Motive innerhalb von Oligonukleotiden oder längeren DNA-Molekülen binden an den TLR9 und aktivieren hierdurch intrazelluläre Signalwege, die für die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und die Heraufregulation von Oberflächenrezeptoren verantwortlich sind [22]. Die CpG-Oligodeoxynukleotid-induzierte Immunantwort schützt vor einer Reihe von Mikroorganismen. Sogenannte immunstimulatorische Sequenzen (ISS), zu denen die CpG-Oligonukleotide gehören, können auch erworbene Immunantworten gegen maligne Zellen induzieren und Entzündungsprozesse wie bei Allergien und Asthma steuern [22].

Bislang wurden drei verschiedene Typen von CpG-Oligonukleotiden beschrieben: Typ A, B und C. CpG-Oligonukleotide des Typs A enthalten CpG-Motive in einer palindromischen Sequenz, umgeben von Guanosinen. Die Nukleotide sind typischerweise über Phosphodiesterbrücken verbunden und werden daher in vivo rasch von DNAsen degradiert. Typ B enthält ausschließlich Phosphorothioatbrücken, Typ-C sowohl Phosphorothioatbrücken als auch CpG-Motive und Palindromen. Die Aktivitätsprofile der verschiedenen CpG-Oligonukleotid-Typen sind unterschiedlich: Typ A induziert vor allem IFN- α , während Typ B ein starker Aktivator von B-Lymphozyten ist und nahezu kein IFN- α induziert; Typ C hat beide Eigenschaften.

TLR9-Liganden als Adjuvantien

Beim Menschen wird TLR9 in DC und in B-Lymphozyten exprimiert und stimuliert Zytokine von TH1-Lymphozyten, Chemokine und den IgG-Klassen-Wechsel [22], des Weiteren findet sich TLR9 im Rahmen nasaler Biopsien in Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen und in Keratinozyten [22]. Als Folge einer Verabreichung von CpG-Motiven kann das Immunsystem eines Patienten auf verschiedenen Wegen reagieren [14]:

1. mit einer lokalen TH1-getragenen Immunantwort mit Suppression der TH2-medierten allergischen Reaktion,
2. mit einer IFN- α -Produktion mit ebenfalls potenzieller Umkehrung einer TH2-Antwort in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in vitro [14],
3. mit einer Herabregulation der IgE-Synthese oder
4. mit einem Ansprechen von Effektor-T-Zellen, wie Mastzellen, Basophile, Eosinophile, als Folge einer TLR9-Stimulation im Humanmodell [22].

Rationale für VLP und CpG-Motive als Immuntherapeutika

Das menschliche Immunsystem hat im Laufe der Evolution sehr wirksame Mechanismen zur Reaktion auf hochrepetitive Strukturen entwickelt, wie sie sich in pathogenen Mikroorganismen finden. Zudem kann die repetitive Anordnung von Antigenepitopen auch die Antikörperproduktion in B-Zellen stimulieren, ohne dass dazu T-Helferzellen notwendig sind. Die VLP stellen also sog. von T-Hilfe unabhängige Antigene dar [23]. Daher sind Viren und virale Proteine starke Aktivatoren des humanen Immunsystems. Die repetitiven Charakteristika von Virus-hüllen werden von den VLP nachgeahmt. Sie bilden sich spontan während der Expression bestimmter Hüllproteine der Viren. Im Gegensatz zu vollständigen Viren tragen VLP nicht das komplette Genom der Viren und sind daher nicht infektiös. Typischerweise werden sie gut vertragen und sind hochgradig immunogen.

Tab. 1 Aktuelle klinische Erfahrungen mit der Anwendung von „virus-like particles“ (VLP) und CpG-Motiven für die Behandlung der allergischen Rhinitis. (Nach [14])

Vakzintyp	Behandlungsgruppen	Patienten	Studiendesign	Literatur
Qβ-VLP gekoppelt an eine synthetische Der-p-1-Sequenz (Qβ-Der p1)	i.m. 50 μ g Q β -Der p1 (n=6) s.c. 50 μ g Q β -Der p1 (n=6) i.m. 10 μ g Q β -Der p1 (n=6) s.c. 10 μ g Q β -Der p1 (n=6)	24 gesunde Probanden	Randomisiert	Kündig et al. [25]
Amb a 1 konjugiert an CpG-ODN (AIC)	AIC (n=14) Placebo (n=11)	25 Patienten mit Allergie gegen Ragweed (Ambrosia)	Randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert	Creticos et al. [24]
Typ-A-CpG-ODN verpackt in Qβ-VLP (QβG10) + Hausstaubmilbenallergenextrakt	Q β G10 + Hausstaubmilbenallergen (n=20)	20 Patienten mit Hausstaubmilbenallergie	Monozentrisch, offen	Senti et al. [26]
Qβ-VLP gefüllt mit Typ-A-CpG-ODN (CYT003-QβG10)	0,5 mg Q β G10 (n=99) 1 mg Q β G10 (n=103) Placebo (n=97)	299 Patienten mit Hausstaubmilbenallergie	Randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert	Klimek et al. [15]

ODN Oligonukleotide, i.m. intramuskulär, s.c. subkutan.

» VLP werden gut vertragen und sind hochgradig immunogen

Die antigenen Determinanten der VLP werden von B-Zell-Rezeptoren erkannt. Die Partikel werden effizient von APZ aufgenommen, die Epitope der VLP an MHC-Moleküle als T-Helferzell-Epitope präsentieren.

VLP sind supramolekulare Partikel mit einem Durchmesser zwischen 25 und 100 nm [14]. Eine Schlüsseleigenschaft von VLP ist, sich spontan zu virusförmigen Partikeln zusammenzufügen. Einige VLP, wie Bakteriophage-Q β -VLP, tun dies sofort bei Anwesenheit negativ geladener Makromoleküle wie RNA- oder DNA-Fragmente. Hierdurch lassen sich Nukleinsäuren in die VLP verpacken. Dies konnte für Q β G10 gezeigt werden, ein Q β -VLP, das Oligonukleotide mit CpG-Motiv enthält [16].

VLP haben die immunologischen Schlüsseleigenschaften von Vakzinen und sind immunstimulatorisch wie Viren. Hierdurch bieten VLP mehrere Vorteile:

- Das Fehlen der genetischen Informationen für Virusreplikation oder -integration erhöht die Sicherheit.
- Sie können ökonomisch mit Standard-GMP („good manufacturing procedures“) hergestellt werden.
- Ihre Form und Größe ermöglichen schnelle und starke humorale Immunantworten.
- Sie können beliebige Antigene an ihrer Oberfläche transportieren. Anti-

gene können hierbei entweder durch genetische Fusion mit dem VLP-Protein (Chimären) oder durch chemische Bindung an die Oberfläche der VLP (gekoppelte Epitope) gebunden werden.

- Immunstimulatoren können in die VLP verpackt werden.
- Adjuvanzen mit Depoteigenschaften können die Kinetik von Virusinfektionen nachahmen [16].

In den vergangenen Jahren wurden CpG-Oligodeoxynukleotide bei verschiedenen klinischen Indikationen erfolgreich eingesetzt [22]. Typ-B-CpG-Oligonukleotide wurden erfolgreich als Adjuvanzen bei Impfungen gegen Hepatitis B und Influenza angewendet [22]. Ebenso fanden sie als Adjuvanzen zur Verstärkung der T-Zell-Antwort bei einer Reihe von Tumoren Anwendung, u. a. bei malignen Lymphomen [22], Melanomen [22], Basalzellkarzinomen [22] und Glioblastomen [22]. CpG-Oligonukleotide des Typs C wurden zur Behandlung der Hepatitis C eingesetzt [22].

Klinische Erfahrungen zur Behandlung der allergischen Rhinitis

Daten einer frühen Studie mit CpG-Oligonukleotiden mit einem Ragweed-Allergenkonjugat waren zunächst vielversprechend [24]. Daraufhin wurden Erfahrungen aus 4 klinischen Studien bei allergischer Rhinitis publiziert (■ Tab. 1, [14]).

Studien

Kündig et al. [25] führten eine randomisierte Phase-I-Studie mit Q β -VLP gekoppelt an eine synthetische 16-Aminosäuresequenz des Hausstaubmilbenallergens Der p 1 (Q β -Der p1) durch. Die Substanz wurde 3-mal an 24 gesunde Probanden verabreicht. Antikörpertiter wurden über einen Zeitraum von 18 Monaten gemessen. An Nebenwirkungen zeigten sich nur leichte Lokalreaktionen. Eine schnelle spezifische IgM- und IgG-Antwort (insbesondere IgG₁ und IgG₃) auf Der-p-1-Peptide und VLP konnte induziert werden. Die IgE-Antikörper waren nicht messbar erhöht. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der intramuskulären und der subkutanen Applikation [25]. Die Studie belegte, dass die verabreichte Vakzine sicher war und gut toleriert wurde. Des Weiteren waren die VLP in der Lage, eine signifikante humorale Immunantwort zu induzieren.

In einer weiteren Studie testeten Creticos et al. [24] ein Amb-a-1-Antigen, konjugiert an CpG-ODN, an 25 gegen Ragweed (Ambrosia) allergischen Patienten. In dieser randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Phase-II-Studie wurden die erwachsenen Patienten 6-mal in wöchentlichen Intervallen therapiert. Allerdings konnte der primäre Endpunkt (vaskuläre Permeabilität der Nasenschleimhaut, gemessen anhand des Albumins in der nasalen Lavage) nicht signifikant beeinflusst werden. Die Symptome der allergischen Rhinitis wurden allerdings verbessert, wie auch die Lebens-

qualitätsscores („quality of life“, QoL) bereits in der ersten Ragweed-Pollen-Saison nach der Behandlung deutlich gesteigert wurden. Diese Verbesserung blieb auch während der nächsten Pollensaison (2 Jahre nach der Vakzinierung) bestehen. In Zusammenhang mit der Therapie traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Die gemessenen allergenspezifischen Antikörper vom Typ IgE waren in der Ragweed-Pollen-Saison vermindert.

Senti et al. [26] untersuchten die Sicherheit, Tolerabilität und klinische Effektivität einer Therapie mit Typ-A-CpG-Motiven, die in Q β -erzeugten VLP (QbG10) verabreicht wurden. Die Vakzine wurden gemeinsam mit einem Standardextrakt von Hausstaubmilben verabreicht. Hierfür wurden 20 gegen Hausstaubmilben allergische Patienten in eine offene monozentrische Studie eingeschlossen. Die Immuntherapie begann mit Injektionen von reinem Hausstaubmilbenextrakt gemäß einem Standarddosissteigerungsprotokoll nach einem Cluster-Schema. Hierauf folgten Injektionen mit einer Mischung aus Allergen und QbG10, die 6-mal in Abständen von jeweils 1–2 Wochen verabreicht wurden. Klinische Endpunkte dieser Studie beinhalteten eine konjunktivale Provokationstestung, die Erfassung klinischer Symptome verursacht durch Asthma und allergische Rhinitis, QoL-Bestimmungen, Prick-Tests und die Bestimmung von Antikörpertitern. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sicherheit und gute Verträglichkeit für die Kombination aus Hausstaubmilbenallergen und QbG10. Es traten keine unerwünschten Wirkungen auf, die auf die Medikation zurückgeführt werden konnten. Die Symptome der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas wurden signifikant reduziert und die allergenspezifischen IgG-Antikörper stiegen an. Die IgE-Antikörper fielen nach einem leichten initialen Anstieg ab. Die Autoren vermuteten, dass CpG-Motive allein die allergischen Symptome durch Aktivierung einer TH1-Immunantwort vermindert haben [26]. Diese Hypothese würde mit der „Hygienehypothese“ gut übereinstimmen, die vereinfacht dargestellt aussagt, dass ein Grund für die zunehmende Inzidenz allergischer Erkrankungen eine reduzierte Expositi-

on gegenüber Umweltpathogenen ist. Basierend auf dieser Theorie sollte es möglich sein, mittels CpG-Motive enthaltenen VLP ein infektiöses Mikroklima zu schaffen, in dem das Immunsystem im Sinne einer TH1-Immunantwort aktiviert wird [14].

Klimek et al. [15] publizierten eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase-II-Multicenterstudie, in der sie die identischen VLP gefüllt mit Typ-A-CpG-Motiven benutzten (CYT003-QbG10). Im Gegensatz zur vorherigen Studie wurden jedoch kein Allergen und keine Allergenkomponenten mit der Vakzine verabreicht. Insgesamt 299 Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie wurden eingeschlossen und erhielten 6 wöchentliche Injektionen mit der Studienmedikation oder Placebo. Die Kernstudie dauerte 9 Wochen für jeden Patienten. Klinische Endpunkte waren der Symptom- und Medikationsscore, Lebensqualitätsscores und ein konjunktivaler Provokationstest. Die Behandlung wurde als gut verträglich und sicher eingestuft. Symptom- und Medikationsscores verbesserten sich signifikant in der hochdosiert behandelten Verumgruppe. Die Autoren folgerten, dass eine Monotherapie mit VLP gefüllt mit CpG-Motiven die Symptome der allergischen Rhinitis positiv beeinflussen kann, auch wenn kein Allergen verabreicht wird.

Diskussion

Der genaue Mechanismus für die zugrunde liegende immunologische Wirkung ist allerdings bislang nicht bekannt. Ergebnisse aus verschiedenen Tierversuchen und In-vitro-Studien lassen vermuten, dass die oben beschriebene Induktion einer starken TH1-Immunantwort und Produktion von IFN- α die beim Allergiker vorhandene TH2-Immunantwort abschwächt. Weiterhin könnte eine direkte Wirkung auf Mastzellen bestehen, da diese ebenfalls TLR9 exprimieren [22]. Auch könnten CpG-Motive die allergische Immunantwort über eine Änderung der Aktivität der Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO), ein potentes Enzym im Rahmen der T-Zell-Regulation, beeinflussen [27]. Die Heraufregulation von IDO in spezifischen DC über Typ-I-Interferon-Rezeptoren nach CpG-Stimulation führte

zu einer T-Zell-Suppression [27]. Dieser Mechanismus könnte einen Teil der entzündungshemmenden Effekte der CpG-Motive bei allergischen Erkrankungen erklären. Die Anwendung von CpG-Motiven zur Behandlung von Allergien wurde durch die bereits erwähnte „Hygienehypothese“ inspiriert. Diese Hypothese wird gestützt durch epidemiologische Studien, die eine geringere Asthmainzidenz bei Kindern nachweisen, die auf einem Bauernhof aufwachsen, bei Kindern mit mehreren älteren Geschwistern oder bei Kindern, die schon im Kleinkindesalter in Kinderkrippen versorgt werden [27]. Hierbei ist der positive Effekt einer mikrobiellen Exposition wahrscheinlich durch die Induktion einer „allergieprotektiven“ TH1-Immunantwort, ggf. sogar durch einen Shift von einer TH2- hin zu einer TH1-Antwort gegeben. Des Weiteren spielen T_{reg}-Zellen hierbei wohl eine nicht unerhebliche Rolle [27]. Interessanterweise wurde für CpG-Motive beschrieben, dass sie in der Lage sind, die „inducible costimulator“ (ICOS)-Liganden auf pDC zu aktivieren; ICOS ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül für die Induktion von T_{reg}-Zellen [27, 28].

» Die Anwendung von CpG-Motiven wurde durch die „Hygienehypothese“ inspiriert

Zudem muss bedacht werden, dass CpG, die in VLP verpackt sind, dadurch nicht nur vor enzymatischem Verdau geschützt sind, sondern dass Partikel in der Größe von Viren auch von Lymphgefäßen effizient in die drainierenden Lymphknoten transportiert und dann dort auch noch effizient von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert werden. Durch die Verpackung in VLP werden die CpG also viel effizienter an die in den Phagolysosomen lokalisierten TLR9-Rezeptoren geliefert [29].

Die Bedeutung der VLP-spezifischen B-Zell-Antwort für die positiven klinischen Effekte wird bislang nicht hinreichend verstanden. Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen können VLP B-Zell-Antworten ohne Adjuvans induzieren [14]. Potente T-Zell-Antworten scheinen hingegen durch adäquate Adjuvantien verbessert zu werden [16]. Klimek

et al. [15] konnten zeigen, dass VLP gefüllt mit CpG-Motiven in der Lage sind, die allergischen Symptome auch ohne relevante Veränderungen der IgE-Werte zu verbessern, und dass eine erfolgreiche SCIT mit einem Anstieg allergenspezifischer IgG₄- und IgG₁-Antworten assoziiert ist [14]. Welche Rolle hierbei IgG₃-Antikörper spielen, ist bislang nicht ausreichend bekannt. Ferner sollte die Interaktion zwischen VLP, APZ und T_{reg}-Zellen besser untersucht werden. Dies könnte auch bei der Beantwortung der Frage helfen, ob Allergene in Kombination mit VLP die Behandlung verbessern können. Zukünftig könnten VLP ggf. auch bei der prophylaktischen Vakzinierung allergiegefährdeter Personen eine Rolle spielen.

Fazit

- „Virus-like particles“ im Allgemeinen und CpG-Motive als Adjuvantien wurden erfolgreich in der Behandlung von Infektionskrankheiten und malignen Erkrankungen angewendet.
- Durch ihre viralen immunmodulatorischen Eigenschaften wurden sie auch zur Behandlung allergischer Erkrankungen, insbesondere zur Behandlung der allergischen Rhinitis eingesetzt.
- Bislang wurden nicht alle immunologischen Mechanismen voll verstanden, aber VLP gefüllt mit CpG-Motiven scheinen die Normalisierung der Immunantwort bei allergischen Patienten zu fördern.
- Erste klinische Erfahrungen mit unterschiedlichen Kompositionen von VLP- und/oder CpG-Vakzinen zeigten eine gute klinische Verträglichkeit sowie gute immunologische und klinische Effekte (Symptomatik, Medikamentenverbrauch, Provokationstests).
- Größere kontrollierte Studien sind notwendig, um umfassendere klinische Erfahrungen über diese neue Technologie zu sammeln.
- VLP in Kombination mit CpG-Motiven haben theoretisch aber ein großes Potenzial in der therapeutischen Behandlung bereits erkrankter Patienten, aber auch in der prophylaktischen Anwendung allergiegefährdeter Personen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. L. Klimek
Zentrum für Rhinologie und Allergologie
An den Quellen 10, 65183 Wiesbaden
ludger.klimek@allergiezentrum.org

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. J. Willers ist Mitarbeiter der Fa. Cytos Biotechnology, Schlieren, Schweiz. L. Klimek, P. Schendzielorz, T. Kündig und G. Senti haben klinische Studien im Auftrag von Cytos Biotechnology durchgeführt, deren Ergebnisse im Literaturverzeichnis zitiert werden. Alle im vorliegenden Manuskript beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen beteiligten Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor.

Literatur

1. Bauchau V, Durham SR (2004) Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 24(5):758–764
2. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA et al (2008) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 63(Suppl 86):8–160
3. Klimek L, Aderhold C, Sperl A (2013) Allergies to antibiotic drugs: their importance in otorhinolaryngology. *HNO* 61(5):409–415
4. Klimek L, Bernus L von, Pfaar O (2013) Local (exclusive) IgE production in the nasal mucosa. Evidence for local allergic rhinitis. *HNO* 61(3):217–223
5. Klimek L, Goebel U, Glowania A (2012) Management of anaphylaxis. Part 2: Treatment and emergency equipment. *HNO* 60(12):1103–1113
6. Stuck BA, Bachert C, Federspil P et al; German Society of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery (2012) Rhinosinusitis guidelines – unabridged version: S2 guidelines from the German Society of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. *HNO* 60(2):141–162
7. Klimek L, Thron C, Pfaar O (2010) Specific immunotherapy with depigmented allergoids. *HNO* 58(1):51–56
8. Pfaar O, Mösges R, Hörmann K, Klimek L (2009) Cluster immunotherapy of persistent allergic rhinoconjunctivitis. Safety aspects of induction therapy with mite depot allergen preparations. *HNO* 57(11):1099–1105
9. Calderon MA, Alves B, Jacobson M et al (2007) Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD001936
10. Klimek L, Sperl A (2013) Evidence-based treatment options for allergic diseases in otolaryngology: an update. *HNO* 61(6):525–538
11. Valenta R, Niederberger V (2007) Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119(4):826–830
12. Larche M (2007) Update on the current status of peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119(4):906–909
13. Senti G, Prinz Vavricka BM, Erdmann I et al (2008) Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(46):17908–17912
14. Klimek L, Schendzielorz P, Mueller P et al (2013) Immunotherapy of allergic rhinitis: new therapeutic opportunities with virus-like particles filled with CpG motifs. *Am J Rhinol Allergy* 27(3):206–212
15. Klimek L, Willers J, Hammann-Haenni A et al (2011) Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: a phase IIb study. *Clin Exp Allergy* 41(9):1305–1312
16. Jennings GT, Bachmann MF (2008) The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem* 389(5):521–536
17. Blaser K (2009) Immunologische Grundlagen der allergenspezifischen Immuntherapie. *Atemw-Lungenkrh* 35:201–222
18. Klimek L, Högger P, Pfaar O (2012) Mechanism of action of nasal glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. Part 1: Pathophysiology, molecular basis. *HNO* 60(7):611–617
19. Bernus L von, Högger P, Pfaar O, Klimek L (2012) Mechanism of action of nasal glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. Part 2: Practical aspects of application. *HNO* 60(8):700–706
20. Akdis M, Blaser K, Akdis CA (2005) T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116(5):961–968 (quiz 969)
21. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA (2006) Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. *Allergy* 61(7):796–807
22. Bode C, Zhao G, Steinhagen F et al (2011) CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 10(4):499–511
23. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM et al. (1993) The influence of antigen organisation on B cell responsiveness. *Science* 262(5138):1448–1451
24. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG et al (2006) Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 355(14):1445–1455
25. Kundig TM, Senti G, Schnetzler G et al (2006) Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 117(6):1470–1476
26. Senti G, Johansen P, Haug S et al (2009) Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy* 39(4):562–570
27. Kline JN (2007) Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc Am Thorac Soc* 4(3):283–288
28. Ito T, Yang M, Wang Y-H (2007) Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204(1):105–115
29. Manolova et al (§§§bitte ergänzen§§§)