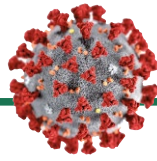


IMMUNOLOGIE



Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 – eine Übersicht

Selbst verwandte Impfstoffe können auf molekularer Ebene unterschiedlich aufgebaut sein. Anhand aktueller Beispiele soll hier das Design einiger Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 vorgestellt werden.

Eine besondere Bedeutung bei der Bekämpfung von SARS-CoV-2 haben mRNA-Impfstoffe. Dabei ähneln sich die Impfstoffe von Curevac (CVn-CoV), BioNTech/Pfizer (BNT162b2) und Moderna (mRNA-1273) sehr stark. Sie enthalten jeweils eine nicht selbst-amplifizierende mRNA, die aus verschiedenen Elementen besteht (Abbildung 1):

- Die mRNAs von Eukaryoten tragen an ihrem 5'-Ende ein 7-Methylguanosin-Triphosphat-Cap (m^7G). Manchmal, wie etwa bei Metazoen, ist zudem die Erste auf das Cap folgende Base methyliert. In diesem Fall spricht man von einer Cap-1-Struktur. Auch die mRNAs der Impfstoffe haben ein solches Cap-1 [1, 2]. Andernfalls würden die Körperzellen Abwehrreaktionen gegen die als fremd erkannte Nukleinsäure einleiten.
- Umrahmt ist die für das Spike-Protein kodierende Sequenz von je einer nicht-translatierten Region am 5'- und am 3'-Ende (5'-UTR und 3'-UTR) [1–3]. Dafür werden Sequenzen ausgewählt, die eine möglichst große Stabilität und Translationseffizienz sicherstellen sollen.
- Der für das Spike-Protein kodierende Bereich wurde von BioNTech und Moderna an den „Dialekt“ des menschlichen genetischen Codes angepasst, um eine besonders effiziente Translation zu ermöglichen [2, 4]. Zugleich führt dies auch zu besonders stabilen mRNAs, die erst spät abgebaut und damit lange translatiert werden. Die Uridinreste der mRNA wurden durch N^1 -Methylpseudouridin ($m^1\Psi$)

ersetzt (Nukleosid-modifizierte RNA, modRNA), da diese keine Abwehrreaktion der Zelle hervorrufen und zudem für eine effiziente Translation sorgen [1, 2, 5]. Der von Curevac entwickelte mRNA-Impfstoff ist ebenfalls Codon-optimiert, enthält aber keine chemisch modifizierten Nukleotide [6].

- Zwei Aminosäuren, ein Lysinrest an der Position 986 und ein Valinrest an der Position 987, die sich an der Grenze zwischen dem Heptadenmuster 1 (HR1) und der Zentralhelix der C-terminalen Untereinheit des Spike-Proteins befinden, wurden bei den Spike-Proteinen der Impfstoffe jeweils durch Prolinreste ersetzt (S-2P): Prolin ist die einzige proteinogene Aminosäure, die eine sekundäre, d. h. in einen heterozyklischen Fünfering eingebettete Aminogruppe besitzt. Dadurch wird die Bewegungsfreiheit der Peptidkette eingeschränkt. Sie erfährt einen obligatorischen „Knick“. In einer α -Helix können sich so für die Stabilität der Helix notwendige Wasserstoffbrücken nicht mehr ausbilden. Prolin wird daher auch als „Helixbrecher“ bezeichnet. Beim Spike-Protein führt dies zur Fixierung in der besonders

immunogenen Präfusionskonformation, da sich bei der Postfusionskonformation das Heptadenmuster und die Zentralhelix zu einer einzigen, langen α -Helix vereinen [1, 2, 6–8].

- Wie bei eukaryotischen mRNAs üblich ist das Startcodon in eine Kozak-Box eingebettet, die es dem Ribosom erlaubt, das Startcodon zu identifizieren [9b].
- Am 3'-Ende der mRNA befindet sich der bei Eukaryoten zur Stabilisierung benötigte PolyA-Schwanz [2, 10].

Nach der Aufnahme in die Zelle wird die mRNA translatiert. Die Spike-Proteine werden dann ebenso wie bei einer Virusinfektion posttranslational mit Zuckerketten modifiziert. Nach einem Verdau durch das Proteasom präsentieren MHC-I-Proteine auf der Oberfläche der Wirtszelle dem Immunsystem Bruchstücke der Spike-Proteine. Dadurch wird die T-Zell-vermittelte Immunreaktion angeregt. Da die Proteine jeweils virale Signalpeptide besitzen, gelangen sie zudem direkt an die Oberfläche der Zelle. Phagozytieren Zellen des Immunsystems Spike-Proteine, so verdauen sie diese durch Proteasen und präsentieren die Bruchstücke anschließend mit MHC-II-Proteinen auf ihrer Oberfläche. Dadurch wird die Antikörperbildung angeregt.

Herstellung der mRNA-Impfstoffe

Die Herstellung der mRNAs erfolgt durch *in vitro*-Transkription von einer cDNA in Gegenwart von N^1 -Methylpseudouridin. Während der PolyA-Schwanz leicht in der

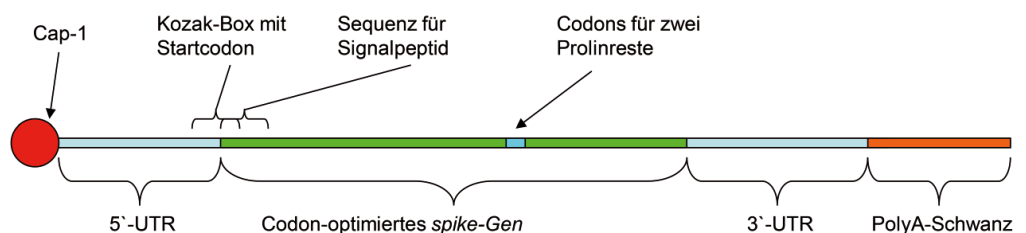


ABB. 1 Schematische Darstellung der für die Impfung eingesetzten mRNA des Spike-Proteins. Die Länge der einzelnen Abschnitte ist nicht maßstabsgetreu.

cDNA kodiert werden kann, muss das 7-Methylguanotin-Triphosphat-Cap separat hinzugefügt werden. Dies geschieht entweder kotranskriptionell unter Verwendung eines Cap-Analogons wie (m₂^{7,3'-O})-Gppp(m^{2'-O})ApG bei BNT162b2 [1] oder posttranskriptionell durch *Capping*-Enzyme wie bei mRNA-1273 [2]. Abschließend erfolgt die Verpackung der fertigen mRNAs in Lipidnanopartikel, um sie vor Ribonukleasen und phagozytierenden Immunzellen zu schützen und ihnen den Zelleintritt zu erleichtern [11].

Die selbstassemblierenden Lipidnanopartikel (LNPs) bestehen aus vier Lipiden, zwei Strukturlipiden zur Stabilisierung (Cholesterin + ein weiteres zwitterionisches Helferlipid, das die Lipide der Zellmembran nachahmt) und zwei funktionellen Lipiden (ein Polyethylenglykolderivat und ein kationisches Lipid). Die kationischen Lipide binden die aufgrund der Phosphatreste negativ geladene RNA und stabilisieren sie so [12]. Das Polyethylenglykol ist entweder direkt oder über ein Linkermolekül an ein mit zwei Fettsäuren verestertes Glycerin (Diglycerid) gebunden. Die Fettsäuren zeigen in das Innere der Partikel und interagieren mit den hydrophoben Schwänzen der kationischen Lipide



ABB. 2 Schematische Darstellung eines Lipidnanopartikels der mRNA-Impfstoffe. Die mRNA (rot) befindet sich im Inneren der Lipidnanopartikel.

(Abbildung 2). Das Polyethylenglykol, das mit möglichen allergischen Reaktionen in Zusammenhang gebracht wurde, ragt nach außen und ermöglicht so die Bildung einer Hydrathülle, die die Löslichkeit der LNPs erhöht [10]. Lipidnanopartikel neigen bei längerer Lagerung zur Instabilität. Die Impfstoffe müssen daher stark gekühlt werden [13]. Unterschiede in der genauen Zusammensetzung der Partikel können Unterschiede bei der Kühltemperatur bedingen.

Adenovirus-basierte Vektorimpfstoffe

Adenoviren sind – im Gegensatz zu den behüllten Coronaviren mit RNA-Genom – unbehüllte DNA-Viren. Während behüllte Viren ihre Rezeptorbindeproteine, mit denen sie Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Wirtszellen erkennen (bei den Coronaviren sind dies die Spike-Proteine), in der Regel leicht verändern oder austauschen können, tun sich unbehüllte Viren damit schwer, da ihre Rezeptorbindeproteine meist auch Capsidproteine sind. Eine Veränderung dieser Proteine würde das Capsid destabilisieren. Adenoviren umgehen dieses Problem, indem sie Antennen-artig abstehende Fiberproteine auf der Oberfläche ihrer Capside tragen, die ebenfalls leicht ausgetauscht werden können. Damit steht ihnen ein breites Spektrum von Wirtszellen offen, was sie als Vektoren geeignet macht [14]. Die „Antennen“ verleihen den Viren zugleich ein Satelliten-artiges Aussehen, ein Umstand, der zur Benennung des russischen Adenovirus-basierten Impfstoffs Sputnik-V beigetragen haben dürfte.

Bei Vektorimpfstoffen besteht die Möglichkeit, dass der Körper nicht in erster Linie wie gewünscht gegen das Spike-Protein, sondern gegen den Vektor eine Immunreaktion ausbildet. Um zu vermeiden, dass der Körper den Impfstoff sofort bekämpft, werden Schimpansenadenoviren eingesetzt, mit denen unser Immunsystem noch nicht in Kontakt

gekommen ist. Bei der zweiten Impfung (Boosterung) kann es dann aber zu einer Immunreaktion gegen den Vektor kommen. Möglicherweise erklärt dies, warum bei dem Impfstoff von AstraZeneca eine Erstimmunisierung mit einer halben Dosis, gefolgt von einer Boosterung mit einer vollen Dosis bessere Ergebnisse erzielt, als zwei volle Dosen. Der russische Impfstoff Sputnik-V umgeht dieses Problem, indem er zwei verschiedene Adenoviren (rAd26 und rAd5) für Priming und Boosterung verwendet [15].

Bei dem Impfstoff AZD1222 von AstraZeneca handelt es sich um einen Schimpansenadenovirus mit der Stammbezeichnung ChAdOx1, dem ein Codon-optimiertes Spike-Gen eingefügt wurde. Dieses Adenovirus ist durch den Verlust der E1-Gene nicht mehr zur Replikation befähigt. Durch den Verlust der E3-Transkriptionseinheit wurde zudem Platz geschaffen für Fremdgene [16]. Vor das Spike-Gen wurde die *leader*-Sequenz des Gewebespezifischen Plasminogenaktivators (*t-PA-Leader*) geschaltet. Dieser *t-PA-Leader* sorgt für einen besonders effektiven Transport des Spike-Proteins über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche und damit für eine effektive Immunantwort [17, 18].

Subunit-Impfstoff von Novavax

Bei dem Impfstoff von Novavax (NVX-CoV2373) handelt es sich um einen Subunit-Impfstoff, d. h. dem Immunsystem werden fertige Spike-Proteine präsentiert [19]. Zunächst wurde ein für Insektenzellen Codon-optimiertes *spike*-Gen erzeugt, das über Baculoviren in Sf9-Zellen des Heerwurmes (*Spodoptera frugiperda*) aus der Familie der Eulenfalter (Noctuidae) eingeschleust wurde. Das Protein wird dann aus diesen Zellen aufgereinigt und assoziiert mit Lipidnanopartikeln gemeinsam mit dem Adjuvans Saponin (Matrix-M) als Impfstoff verabreicht. Das fertige Protein trägt die bereits von den mRNA-Impfstoffen bekannte S-2P-

Mutation. Zusätzlich wurden drei Argininreste (R) an den Positionen 682 bis 685 gegen Glutaminreste (Q) ausgetauscht, so dass sich die Aminosäuresequenz von RRAR zu QQAQ (A = Alanin) verändert. Dies dient dazu, den Verdau des Proteins durch Proteasen zu erschweren, denn an dieser Stelle befindet sich die Schnittstelle für die Protease Furin, die das Spike-Protein durch ihre Aktivität voraktiviert.

Literatur

- [1] U. Sahin et al., medRxiv, 2020, doi.org/10.1101/2020.12.09.20245175
- [2] K. S. Corbett et al., Nature, 2020, 586, 567–571.
- [3] <https://www.gov.uk/government/publications/regulatory-approval-of-pfizer-biontech-vaccine-for-covid-19-summary-public-assessment-report-for-pfizerbiontech-covid-19-vaccine>
- [4] <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-share-positive-early-data-lead-mrna>
- [5] Y. V. Svitkin et al., Nucleic Acids Res., 2017, 45, 6023–6036.
- [6] S. Rauch et al., BioRxiv, 2020, doi.org/10.1101/2020.10.23.351775
- [7] E. E. Walsh et al. medRxiv, 2020, doi.org/10.1101/2020.08.17.20176651
- [8] L. A. Jackson et al., N. Eng J. Med., 2020, 383, 1920–1931.
- [9] S. Xu et al., Int. J. Mol. Sci., 2020, 21, 6582.
- [10] https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/944544/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UKPAR_PFIZER_BIONTECH__15Dec2020.pdf
- [11] V. Zyka-Menhorn, Deutsches Ärzteblatt, 2020, <https://cdn.aerzteblatt.de/pdf/118/1/a20.pdf?ts=21%2E12%2E2020+12%3A49%3A41>
- [12] Editorial, Nature Nanotechnol., 2020, 15, 963.
- [13] R. L. Ball et al., Int. J. Nanomedicine, 2016, 12, 305–315.
- [14] A. Sharma et al., Virus Res., 2009, 143, 184–194.
- [15] <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/118731/Impfstoffe-Warum-Sputnik-V-eine-hoehere-Effektivitaet-gegen-SARS-CoV-2-erzielen-koennte-als-AZD1222>
- [16] R. D. Antrobus et al., Molecular Therapy, 2014, 22, 668–674.
- [17] Y. Kou et al., Immunology Letters, 2017, 190, 51–57.
- [18] N. K. Alharbi et al., Vaccine, 2017, 35, 3780–3788.
- [19] C. Keech et al., New Eng. J. Med., 2020, 383, 24.

Johannes Sander, Halver