

Vergleich kommerziell erhältlicher Adjuvantien bei BALB/c-Mäusen mit einem schwach immunogenen Peptid als Antigen

Christine Zwerger, Roland Plesker, Kyriakos Papadopoulos, Klaus Cußler und Joachim Hartinger
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

Zusammenfassung

Kommerziell erhältliche Adjuvantien wurden mit dem immun-suppressiven Peptid (ISU-Peptid) von HIV I als Antigen auf hervorgerufene Nebeneffekte und auf ihre antikörperinduzierenden Eigenschaften in BALB/c-Mäusen getestet. Die Belastung und Schmerzen der Tiere wurden mit klinischen, pathologisch-histologischen Parametern sowie mit dem Verhalten der Tiere beurteilt. Komplettes Freundesches Adjuvans (FAk) diente als Positiv- und PBS (Phosphat buffered saline) als Negativkontrolle. Die ölhaltigen Adjuvantien Montanide ISA 51® (M 51), Specol® und Hunters TiterMax Gold® (HTMG) wurden mit dem ISU-Peptid-Napfschneckenhä-mozyanin-Konjugat verwendet, das wasserlösliche Gerbu Adjuvans® wurde zudem noch mit ISU-Peptid-Cholera-toxin B-Konjugat (ChTxB) eingesetzt. Bei allen Immunisierungen wurde der holländische „Code of Practice“ als Richtschnur verwendet. In keiner Gruppe wurden Veränderungen der Aktivität oder des Verhaltens der Tiere beobachtet. Alle Öl-Adjuvantien produzierten Schwellungen und Abkapselungen, die in der HTMG-Gruppe am dramatischsten waren. Nach jeder Booster-Immunisierung stagnierte das Körpergewicht kurzzeitig in allen Adjuvans-Gruppen, bei HTMG trat dieser Einbruch schon bei der 1. Immunisierung auf. FAk induzierte nach der 1. Immunisierung leichtes Fieber. FAk, Specol und M 51 und außerdem Gerbu-ChTxB induzierten für den ELISA brauchbare Antikörpertiter. Die wasserlöslichen Adjuvantien und HTMG induzierten mit ISU-Peptid-KLH-Konjugat keine meßbaren Antikörpertiter.

Summary: A comparison of commercially available adjuvants in BALB/c-mice immunised with a weekly immunogenic peptide

The antibody-stimulating activities and side effects of commercially available adjuvants were compared in BALB/c mice immunised with the immunosuppressive (ISU) peptide of HIV I. Clinical and pathological-histological parameters as well as behavioural changes, were used to assess the distress and pain caused to the animals. Complete Freund's Adjuvant (FAk) was used as the positive control and PBS as the negative control. The oil-based adjuvants Montanide ISA 51® (M 51), Specol®, and Hunter's TiterMax Gold® (HTMG) were used with the ISU-peptide conjugated to KLH. The water-soluble Gerbu Adjuvant® was administered together with the antigen KLH conjugate and also with the ISU-peptide conjugated to cholera toxin B subunit (ChTxB). The Dutch „Code of Practice“ was used as a guideline for all immunisations. No changes in animal activity or behaviour was observed in any of the groups. All the oil-based adjuvants gave rise to swellings and encapsulations, which were most pronounced in the HTMG-group. Although body weight increased throughout the study, no increase was seen in any adjuvant group for a short period after each booster immunisation, nor after the first immunisation in the HTMG group. FAk induced a light fever after all immunisations. FAk, Specol and M 51 as well as Gerbu-ChTxB induced antibody titres which were detectable in the ELISA, but no detectable antibody the water-soluble adjuvants or following administration of HTMG applied with the ISU-peptide-KLH conjugate.

Keywords: adjuvant, animal welfare, antibody titer, Cholera toxin B subunit, ELISA, mice, monoclonal antibody

1 Einleitung

Im Rahmen der biomedizinischen Forschung werden zur Herstellung polyklonaler Antisera oder monoklonaler Antikörper in großem Umfang Tiere immunisiert. Beim Einsatz schwach immunogener Antigene wie Peptiden ist der Zusatz von Adjuvantien zur Immunisierungslösung notwendige Praxis. Bei mykobakterienhaltigen Öl-Adjuvantien (FAk) sind an den Injektionsstellen Granulome und sterile Abszesse, aber auch schwerwiegen-

dere Nebenwirkungen wie z.B. Nekrosen, Peritonitis, Lähmungserscheinungen oder reduziertes Fress- und Trinkverhalten beobachtet worden. In den letzten Jahren wurde deshalb - auch in der Impfstoffentwicklung - sehr intensiv an besser verträglichen Adjuvantien geforscht.

Für die meisten Adjuvantien, die als Alternativen zur Verfügung stehen, wurde neben Studien zur Antikörperstimulation nur wenig über lokale oder systemische Nebenwirkungen gearbeitet. Verhaltensuntersuchungen, um die Schmerzhaft-

igkeit lokaler Veränderungen zu überprüfen, wie sie beispielsweise von Gärtner und Militzer (1993) und Morton und Griffiths (1985) beschrieben wurden, sind noch seltener. Daher fehlt dem Anwender, trotz der mittlerweile unüberschaubaren Literaturfülle zu dem Thema, meist die Möglichkeit, sich für eine tierschonende, aber effiziente Alternative zu entscheiden.

Wir haben deshalb ein bekanntermaßen schwach immunogenes Peptid an Trägermoleküle gekoppelt und mit verschiedenen Öl-Adjuvantien und mit dem wasser-

löslichen Gerbu Adjuvans® im Vergleich getestet. Als Trägermolcküle wurden KLH (*keyhole limpet haemocyanin*) und die (nichttoxische) B-Untereinheit von Cholera-toxin verwendet. Komplettes Freund-sches Adjuvans (FAk) diente als Positiv- und PBS ohne Zusatz von Adjuvantien als Negativkontrolle.

Da sich gezeigt hat, daß das Ausmaß der Lokalreaktionen nicht nur zu Lasten der Antigen/Adjuvans-Kombination, sondern auch durch die Anwendungspraxis bedingt wird, wurden alle Immunisierungen nach dem niederländischen „Code of Practise“ (Veterinary Public Health Inspectorate, 1993) durchgeführt.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere

Für jedes zu testende Adjuvans wurden dreimal je zehn weibliche BALB/c-Mäuse mit einem Anfangsgewicht von 15 bis 18 Gramm (Charles River, Sulzfeld) konventionell bei 23° C, Futter und Wasser *ad libitum* und einem 12 stündigen Hell-Dunkelrhythmus in Makrolon Typ III Käfigen, angereichert mit Zellulosestreifen und Papphäuschen gehalten. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von einer Woche gegeben. Die Tiere wurden täglich um 7:00 Uhr durch denselben Tierarzt untersucht. Die Aktivität der Tiere wurde über die 24-stündige Aufzeichnung der Signale eines passiven Infrarot-Sensors (ArguMens, Duisburg) im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt.

2.2 Peptid-Kopplung

Das immunsuppressive Peptid 583-599 des gp41/160 von HIV I (Sequenz: LQQDKLY-REVALIRAQLQK) wurde freundlicherweise von Dr. J. Denner, Paul-Ehrlich-Institut zur Verfügung gestellt und, wie bei Schneider et al. (1983) beschrieben, über m-Maleimidobenzoesäure-N-Hydroxysuccinimidester an ChTxB (Sigma, Deisenhofen) bzw. an KLH (Calbiochem, Bad Soden) gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde nach SDS-Disc-PAGE (Laemmli, 1970) mittels Westernblot (Khyse-Andersen, 1984) überprüft.

2.3 Immunisierungen

Die Antigen-Adjuvanslösung wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbe-

reitet und jedem Tier 10 µg Peptid in 100 µl Lösung subkutan im Nackenbereich appliziert. In der FAk-Gruppe wurde für Booster-Immunisierungen inkomplettes Freund-sches Adjuvans verwendet. Booster-Immunisierungen und Blutentnahmen erfolgten im vierwöchigen Abstand, nach 83 Tagen wurden die Tiere in Narkose entblutet. Die Seren der Tiere eines Käfigs wurden gepoolt und in Dreifachbestimmungen mittels ELISA auf spezifische Antikörper getestet.

2.4 ELISA

Zur Bestimmung des IgG-Titers wurde ein ELISA, modifiziert nach Denner et al. (1994), durchgeführt. 1 µg Peptid gelöst in 50 µl H₂O wurde über Nacht bei 37° C an jede Kavität einer MaxiSorp 96-Loch-Mikrotiter-Platte mit Flachboden (Nunc, Wiesbaden) gebunden und überschüssiges Peptid mit 250 µl PBS+0,05 % Tween 20 (PBS-Tween) gewaschen. Die Kavitäten wurden für 1 h in PBS-Tween/5% Trockenmilch blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden die Seren 1 h in PBS-Tween/5% Trockenmilch verdünnt inkubiert, dreimal mit 250 µl PBS-Tween gewaschen und 1 h mit Ziege-anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Cappel, Eppelheim) 1:3000 in 50 µl PBS/5% Trockenmilch verdünnt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 250 µl PBS-Tween 20 und PBS wurde die Substratfärbung (50 µl 5 mM ortho-Phenylendiamin (Sigma, Deisenhofen), 0,3% H₂O₂ in PBS, pH 6,0) nach 6-minütiger Inkubation mit 25 µl 5 N H₂SO₄ beendet und in einem Zwei-Wellenlängenphotometer bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Alle anderen Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck, Darmstadt bezogen.

2.5 Statistik

Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde der Zusammenhang zwischen den Adjuvantien und den lokalen Veränderungen an der Injektionsstelle untersucht. Der Einfluß der Adjuvantien auf Gewichtsentwicklung, Temperaturverlauf und die Ausbildung eines spezifischen Antikörpertiters wurde mit dem Programm S-Plus 4.0, Seattle über die *Generalised estimating equation* untersucht. Zur Bestimmung signifikan-

ter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde ein Signifikanzniveau α von 0,05 gewählt.

3 Ergebnisse

In allen Gruppen wurde das Aktivitätsprofil im Vergleich zu unbehandelten Mäusen aufgezeichnet. In keiner Adjuvansgruppe traten Auffälligkeiten auf; bei allen Tieren wurde nachts Aktivität beobachtet, die wahrscheinlich altersbedingt über den Beobachtungszeitraum deutlich abnahm. Keines der Tiere fiel in seiner Gruppe als isoliert oder mit gesträubtem Fell auf, es wurden keine Veränderungen des Spontanverhaltens (Greif- und Klammerreaktionen, Neugier-, Putz- oder Spielverhalten), des Antwortverhaltens auf äußere Reize (Fangverhalten, Reaktionen auf Lufthauch) oder des Muskeltonus beobachtet. Auch zeigte kein Tier bei Berührungen an den Injektionsstellen Lautgebung oder Ausweichreaktionen.

Über den gesamten Versuchszeitraum wurde eine stetige Zunahme des Körpergewichts beobachtet. Diese Gewichtszunahme stagnierte allerdings nach den Booster-Immunisierungen für wenige Tage. In der Gruppe mit HTMG behandelter Mäuse trat dieser Effekt bereits nach der ersten Immunisierung auf und war nach den Folgeimmunisierungen ausgeprägter und länger anhaltend als in den anderen Gruppen. Dieser Effekt wurde auch bei den ohne Adjuvantien behandelten Mäusen beobachtet, während die unbehandelten Tiere stetig und ohne Unterbrechungen an Gewicht zunahmen.

Die mit FAk immunisierten Tiere reagierten statistisch signifikant bereits auf die erste Immunisierung mit einem deutlichen Fieberanstieg auf über 39° C. Bei den Mäusen, die mit den anderen ölhaltigen Adjuvantien oder mit Gerbu-Adjuvans + Peptid-ChTxB behandelt worden waren, stieg die Körpertemperatur nach den Booster-Immunisierungen um ca. 1/2 Grad. Bei den mit Gerbu-Adjuvans und Peptid-KLH immunisierten Mäusen schwankte die Rektaltemperatur über den gesamten Versuchszeitraum zwischen 36 und 38,5° C.

Die lokalen Reaktionen an den Injektionsstellen und die Abszeßbildung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Alle Gruppen, die mit ölhaltigen Adjuvantien behandelt wurden, zeigten an den Impfstellen verschiebbare Anschwellungen, die nur in der

Tabelle 1: Lokalreaktionen im Bereich der Injektionsstellen

	Ausbreitung	Größe [mm]	Konsistenz	Besonderheiten	Tiere mit Lr. [%]*	Befunde nach Pathologie	Tierzahl [%]
FAk	Kopfregion Nackenregion	B: 1 - 5 L: 5 - 13 H: 1 - 4	z.T. weich eindrückbar verschiebbar z.T. derb nicht verschiebbar	bei 1/3 der Tiere Haarausfall an der Injektionsstelle	83,3	Zahlreiche, deutlich entzündliche, stecknadelspitz- bis kirsch kerngroße Abszesse in der Haut und Unterhaut des Nackens Umgebendes Gewebe teils gerötet, teils sulzig durchtränkt	100
M 51	Kopfregion (bei 1 Tier) Nackenregion	B: 1 - 5 L: 4 - 10 H: 1 - 4	weich verschiebbar	—	60	Zahlreiche glasstecknadelkopf- bis linsengroße (bei einem Tier kirsch kerngroße) Abszesse in der Haut und Unterhaut der Nackenregion	100
Specol	Nackenregion	B: 1 - 3 L: 1 - 4 H: 0 - 1	weich	—	26,7	Mäßig entzündliche, schlecht abgegrenzte, bis linsengroße Anschwellung von rötlich-beiger Farbe in der Unterhaut des Nackens	80
HTMG	Kopfregion Nackenregion Rücken/Hüfte Flanke	B: 1 - 6 L: 4 - 15 H: 2 - 5	weich verschiebbar	bei 1/3 der Tiere Haarausfall an der Injektionsstelle	90	Zahlreiche, ausgeprägt entzündliche, stecknadelkopf- bis kirsch kerngroße Abszesse in der Haut und Unterhaut. Die Veränderungen ziehen von der Injektionsstelle über die Rücken- und Flankenregion zur Hüfte	100
Gerb- KLH	—	—	—	—	0	—	0
Gerb- ChTxB	(Nacken- region)	(nicht meßbar)	(weich eindrückbar)	bei 1/3 der Tiere reversible Schwellung mit Hautrötung an der Injektionsstelle	0	Entzündliche, sulzig-braune Durchtränkung des Unterhautgewebes im Nacken	60
PBS	—	—	—	—	0	—	0

*Tiere mit Lokalreaktionen

FAk-Gruppe teilweise derb und nicht verschiebbar waren. In der HTMG-Gruppe zogen sie vom Kopf den ganzen Rückenbereich bis zur Hüfte entlang. Sie stellten sich - außer bei den mit Specol behandelten Tieren - im histologischen Schnitt als entzündliche Abszesse dar. In den FAK- und HTMG-Gruppen zeigten ca. 1/3 der Tiere Haarausfall an der Injektionsstelle. In den Gruppen, die mit FAK oder mit Gerbu-Adjuvans / Peptid-ChTxB behandelt wurden, war das Unterhautgewebe sulzig durchtränkt. Histologisch fielen vor

allem bei den mit FAK, aber vereinzelt auch bei den mit Specol behandelten Tieren eingewanderte Riesenzellen auf, während in der HTMG-Gruppe in den Vakuolen-Zwischenräumen kaum Entzündungszellen sichtbar waren. Die ölgefüllten Vakuolen waren in dieser Gruppe am größten und bei den mit Specol immunisierten Tieren nur mikroskopisch sichtbar und fein verteilt.

Der Verlauf der Antikörpertiter über den Versuchszeitraum ist in Abbildung 1 gezeigt. In den mit FAK und mit Specol be-

handelten Mäusen ist bereits acht Wochen nach der ersten Immunisierung ein meßbarer Antikörpertiter vorhanden und ist nach drei Monaten auch bei den Tieren, die mit M 51 und mit Gerbu-Adjuvans / Peptid-ChTxB behandelt wurden, ausreichend für die Herstellung monoklonaler Antikörper. Für diese Gruppen ergibt sich eine statistisch signifikante Korrelation von Gruppenzugehörigkeit und Antikörpertiter. Die Mäuse, die mit HTMG als Adjuvans immunisiert wurden, zeigten ebenso wenig meßbare Antikörpertiter, wie die mit Gerbu-Adjuvans / Peptid-KLH oder ohne den Zusatz von Adjuvantien immunisiert waren

4 Diskussion

Verschiedene Adjuvantien wurden auf ihre Eignung zur Herstellung monoklonaler Antikörper untersucht. Während mit Ausnahme von HTMG alle Öl-Adjuvantien brauchbare Titer für die Herstellung monoklonaler Antikörper lieferten (in der Montanide-Gruppe allerdings die niedrigsten), zeigten alle damit behandelten Tiere Lokalreaktionen, die in den FAK- und HTMG-Gruppen in großen Vakuolen abgekapselt waren und bei FAK und Specol durch eingewanderte Riesenzellen begleitet wurden. In keinem Fall zeigten die Tiere deutliche Hinweise darauf, daß ihnen die durch die Adjuvantien hervorgerufenen Prozesse Schmerzen bereitet hätten.

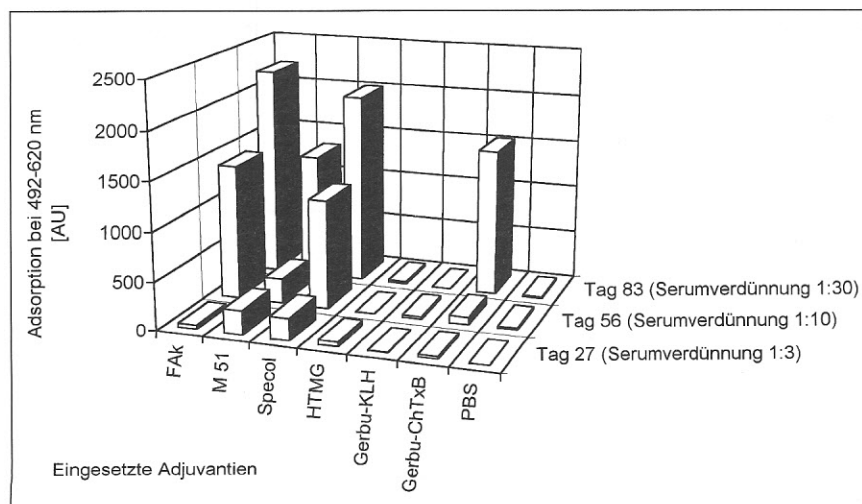


Abbildung 1: Dargestellt sind die Mittelwerte der Seren von drei Käfigen der Adjuvansgruppen (Dreifachbestimmungen, korrigiert auf Prä-Immunsrum). Gemessen wurde - bei 492 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm - die Adsorption eines ELISA von Seren, gewonnen an drei Blutentnahmetagen; die Verdünnungsstufe der Seren ist angegeben.

Einzig die mit FAK behandelten Tiere reagierten mit Fieber auf die Immunisierung, aber alle ölhaltigen Adjuvantien induzierten nach den Boosterimmunisierungen eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur. Auffällig ist der in allen behandelten Gruppen aufgetretene, kurzzeitige Rückgang in der Zunahme des Körpergewichtes; dieser war in der HTMG-Gruppe am augenfälligsten.

Von allen Adjuvantien traten in der Gruppe Gerbu-Adjuvans / Peptid-ChTxB die unauffälligsten Lokalreaktionen auf, die sich auch nach wenigen Tagen zurückbildeten. Anzeichen für Entzündungen traten kurzzeitig und für Abszesse gar nicht auf. Der jeweilige Einfluß von Adjuvans oder Antigen-transporter auf das Immunisierungsergebnis bleibt noch festzustellen. Auch ist davon auszugehen, daß der Zeitplan der Immunisierungen für wasserlösliche Adjuvantien nicht optimal gewählt war.

In dieser Untersuchung ging die Ausbildung adjuvansbedingter Nebenwirkungen und die Antikörperinduktion nicht notwendig parallel. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß auch mit einem sehr schwach immunogenen Peptid, ohne Verwendung des kompletten Freundschens Adjuvans, brauchbare Antikörpertiter hergestellt werden können. Adjuvantien, die als Alternative zum Freundschens Adjuvans empfohlen werden, induzieren nicht notwendigerweise nebenwirkungsfrei Antikörper. HTMG ist mit Abstand das teuerste der hier verwendeten Adjuvantien, produzierte starke Nebenwirkungen und induzierte keine Antikörper. Im Paul-Ehrlich-Institut wird derzeit Specol als Adjuvans für Routine-Immunisierungen verwendet.

Literatur

- Denner, J., Norley, S. and Kurth, R. (1994). The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune responses in AIDS patients. *AIDS* 8, 1063-1072.
- Khyse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic blotting of multiple gels. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.
- Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Gärtner, K. und Militzer, K. (1993). Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren. In: Schriftenreihe Versuchstierkunde, Heft 14. Berlin: Verlag Paul Parey.
- Morton, D. B. and Griffiths, P. H. M. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record* 116, 431-436.
- Schneider, W. J., Slaughter, C. D., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., Capra, J. D. and Brown, M. S. (1983). Use of antipeptide antibodies to demonstrate external orientation of the NH₂-terminus of the low density lipoprotein receptor in the plasma membrane of fibroblasts. *J. Cell Biol.* 97, 1635-1640.
- Veterinary Public Health Inspectorate (1993). *Code of Practice for the immunisation of Laboratory Animals*. Rijswijk, The Netherlands.

Korrespondenzadresse

Dr. Joachim Hartinger
Paul-Ehrlich-Institut
Abt. Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen
Tel +49-6103-77-8004
Fax +49-6103-77-1234
E-Mail: harjo@pei.de

Abkürzungsverzeichnis – Abbreviations

ChTxB	Choleratoxin B-Untereinheit	Cholera toxin B-subunit
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	Enzyme linked immunosorbent assay
HTMG	Hunter's TiterMax Gold	Hunter's TiterMax Gold
FAK	Komplettes Freundsches Adjuvans	Complete Freund's adjuvant
KLH	Napfschnecken-Hämozyanin	Keyhole limpet hemocyanin
ISU-Peptid	Immunsuppressives Peptid	immunosuppressive-peptide
M 51	Montanide ISA 51	Montanide ISA 51
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	phosphate buffered saline

