

Fugleinfluenza og perspektiverne for vaccination mod pandemisk influenza

Adjunkt Peter Johannes Holst, lektor Jan Pravsgaard Christensen & professor Allan Randrup Thomsen

Københavns Universitet, Panum Institutet,
Institut for International Sundhed, Immunologi og Mikrobiologi

En pandemi forårsaget af zoonotisk transmission og efterfølgende adaptation af H5N1 Influenza A virus er af WHO blevet betegnet som verdens i øjeblikket mest prominente sundhedsrisiko. Influenzapandemier har i et historisk perspektiv opnået infektionsrater på omkring en tredjedel til halvdelen af verdens befolkningen inden for det første år, og de teoretisk mulige tab af menneskeliv samt de økonomiske konsekvenser ved en sådan pandemi er derfor uoverskuelige.

Evolutionære strategier i relation til en fremtidig influenzapandemi

Det 20. århundredes tre influenzapandemier har været forårsaget af influenza A-typerne H1N1 (1918), H2N2 (1957) og H3N2 (1968). H- og N-typerne refererer til serologisk definerede varianter af to molekyler på overfladen af viruspartiklerne kaldet hæmagglutinin og neuraminidase. Hæmagglutinin er det molekyle, der sørger for binding af virus til værtscellen, mens neuraminidase sørger for frigørelse af de modne, infektiøse viruspartikler, når infektionen har ført til opformering af disse i den modtagelige værtscelle. Pandemier udløses, når humant overførbart virus opstår med H-typer, som ikke tidligere har cirkuleret i den humane befolkning (antigene skift), mens normal sæsoninfluenza opstår, når en tidligere cirkulerende human influenzastamme opnår tilstrækkeligt med punktmutationer i H- (og N-) generne til at undvige neutraliserende antistoffer, der er rejst under infektion med varianter af samme H- (og N-) type, der tidligere har cirkuleret (*antigen drift*) (Figur 1). Udskiftning af H-generne kan ske ved såkaldt reassortering mellem forskellige virusstammer. Dette forudsætter samtidig infektion af en modtagelig værtscelle med to forskellige influenza A-virus-varianter. Fordi influenzavirus har et segmenteret genom, kan dette resultere i nye genetiske varianter, der kombinerer egenskaber fra de oprindelige virus (Figur 1). Reassortering var basis for de mindre alvorlige pandemier i 1957 (H2N2) og 1968 (H3N2), mens den skræmmende pandemi i 1918 menes at være forårsaget af en mere eller mindre direkte adaptation af et H1N1-fugleinfluenza til mennesker. Den molekylærbiologiske basis for føromtalt skrækscenarie er således, at et fugleinfluenzavirus som H5N1 (eller et andet influenzavirus, der

findes i fugle) gradvist opsamler de mutationer, der muliggør overføring af virus fra et menneske til et andet. Ved reassortering, som det sås i 1957 og 1968, må resultatet forventes at være mindre virulent, idet de cirkulerende humane virusstammer, som må formodes at bidrage med genmateriale, generelt er relativt mindre virulente.

En aviær influenzastamme skal akkumulere en række ændringer for at muliggøre effektiv human transmission. En afgørende faktor i denne sammenhæng er ændringerne i H-genet. Hæmagglutinin i fugleinfluenza binder til $\alpha 2,3$ -koblet sialinsyre, der findes udtrykt på cellerne i fuglens tarm-system, mens mennesker især udtrykker denne receptor i øjet og nederst i luftvejene [1]. I de øvre luftveje, i bronkierne og bronkiolerne udtrykker mennesker primært $\alpha 2,6$ -koblet sialinsyre. For at kunne smitte dråbebart til og fra de øvre luftveje må viruset altså skifte bindingsmønster fra $\alpha 2,3$ -koblet sialinsyre til $\alpha 2,6$ -koblet sialinsyre. Et sådant skifte kan finde sted i f.eks. svin, der har begge typer receptorer. Kun enkelte mutationer er nødvendige for dette skift [2]; det bør dog understreges, at evnen til at binde til de humane overfladereceptorer alene ikke er tilstrækkelig til at skabe et influenzavirus, der effektivt kan repliceres i humane celler. Adaptationen fra aviær til human influenza kræver således også andre genetiske ændringer, bl.a. har man identificeret visse kritiske regioner i de virale polymeraser.

Antistofbaseret beskyttelse mod influenza A-virus-infektion

Vaccination mod normal sæsoninfluenza indebærer immuni-

Faktaboks

Klassisk influenzavaccination inducerer et cirkulerende immunglobulin G-svar rettet mod H- og N-molekylerne på viruspartiklens overflade og beskytter mod infektion med virus, der er antigenært relaterede til det anvendte vaccineantigen.

H og N udviser stor variation dels som følge af punktmutationer dels pga. det eksisterende antal varianter, der er kendt fra influenzavarianter hos vildfugle.

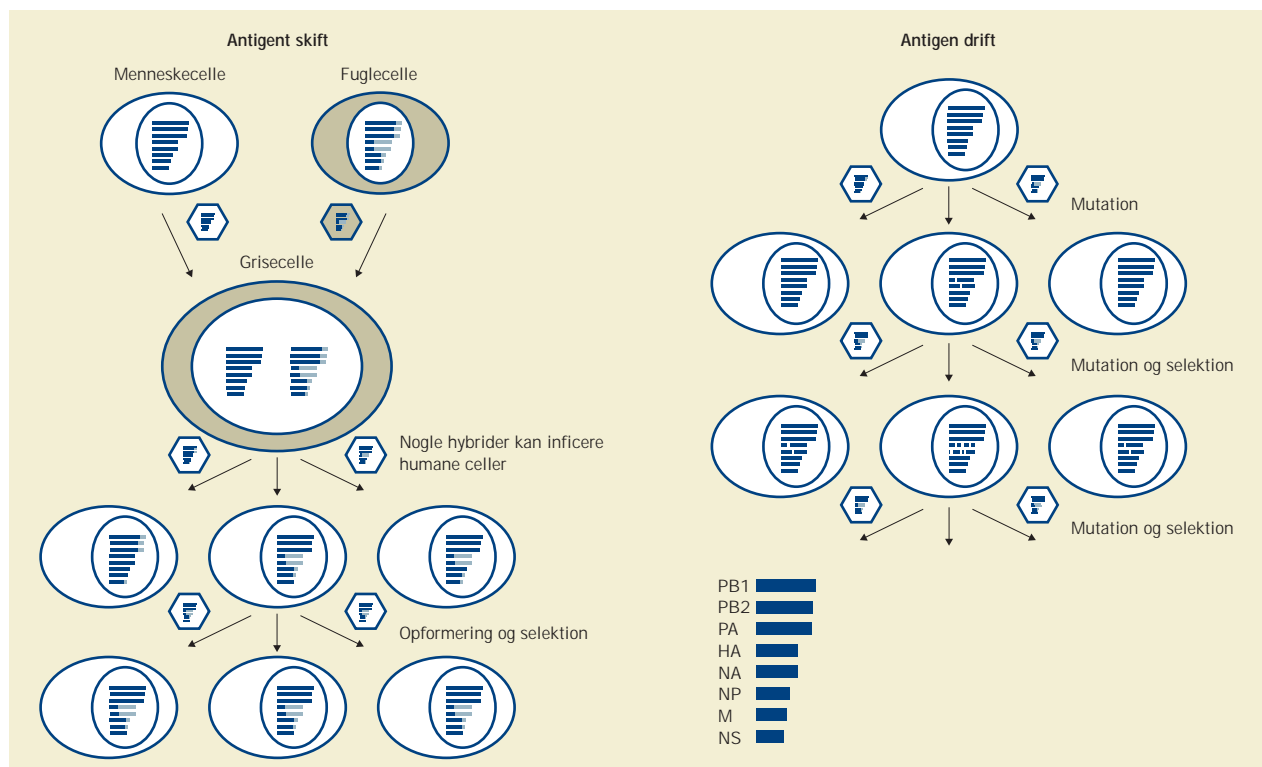
Andre antigener (M2 samt interne antigener) udviser meget mere begrænset variation.

En ny strategi for udvikling af egentlige paninfluenzavacciner udnytter dette ved at rejse antistofsvare mod M2 eller T-celle-svar mod de interne antigener.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

sering med oprensede H- og N-molekyler, som inducerer et systemisk immunglobulin G (IgG)-svar. Forudsætningen for beskyttelse ligger i en løbende overvågning af den globale influenzasituation og en årlig udvælgelse af de varianter af disse molekyler, der er relevante for den kommende sæson (jf. *antigen drift*). Hvis der er tilstrækkeligt overlap mellem de antigen, der er anvendt til årets vaccine og sæsonens influenzavarianter, opnås en beskyttelse mod sygdom på omkring 70-90% hos yngre voksne. Indtil for nyligt blev vaccination af mennesker, der var baseret på H5-gener fra cirkulerende fugleinfluenza ikke opfattet som en relevant mulighed, idet viruset nemt muterer og dermed undgår neutralisation, ganske som det ses ved sæsoninfluenza. Man ved ikke engang, hvordan en stamme, der forårsager en kommende pandemi, ser ud antigenmæssigt. Nyere forskning i de mutationer, der er nødvendige for $\alpha 2,6$ -koblet sialinsyre-receptorspecificitet, har imidlertid afsløret, at $\alpha 2,3$ -koblet sialinsyre-specifikke H-gener, der ved mutagenese kun påføres de ændringer, der er nødvendige for at ændre specificitet til $\alpha 2,6$ -koblet sialinsyre, in-

ducerer relativt høje niveauer af krydsreagerende antistoffer. Det er sandsynligvis en del af årsagen til at eksperimentelle vacciner, der går ud fra H-gener fra de minimalt adapterede humane isolater af H5N1, inducerer en immunitet, der også beskytter mod andre H5N1-isolater. Kombineret med brugen af nyere adjuvanter, der synes at fremme udviklingen af bredere reagerende antistoffer (dog stadig inden for samme serotype!), betyder dette, at man principielt kan adaptere den strategi, der normalt anvendes ved sæsoninfluenza. Om tilstrækkeligt høje titre af relevante antistoffer kan opnås til at beskytte mod primær infektion i mennesker, og især hvor hurtigt et humant adapteret influenzavirus kan mutere ud af en sådan beskyttelse, er dog endnu helt uafklaret. Sidst - og mindst ligeså relevant er det - at vi ikke ved, om den næste pandemi bliver med en H5N1-variant. Hvis det ikke bliver tilfældet, så er disse tiltag helt virkningsløse i forebyggelsen af den næste pandemi. At dette ikke er en teoretisk indvending, understreges af et nyt studie af H7-stammer, der cirkulerer i nordamerikanske fugle. I omtalte studie fandt man, at alle



Figur 1. Influenzavirus evolution. Figuren viser influenzavirus' otte gensegmenter. Farven angiver den genetiske variabilitet; områder der afviger i farve repræsenterer de afvigende sekvenser. Det fremgår, at hovedparten af genmaterialet er relativt konserveret forskellige influenzastammer imellem (~80%), mens generne for H- og N-molekylerne er særdeles variable (~30% er konserveret). Antigen skift er resultatet af reassortering af de individuelle gensegmenter i en celle, der er inficeret med to forskellige influenzavirusstammer. Da griseceller kan inficeres med både humant og aviært influenzavirus, udgør disse ofte den relevante »smeltedigel«. Infektiøst virus med forskellige kombinationer af de indgående gensegmenter vil så opstå. Visse af disse varianter er i stand til at inficere og replicere sig i humane celler. Af disse vil nogle udtrykke de nye H- og N-gener fra det indgående fuglevirus, og de vil derfor ikke hæmmes af præformerede antistoffer hos humane recipienter af infektionen; disse varianter kan initiere en pandemi. Antigen drift opstår ved akkumulering af punktmutationer i gensegmenterne for H og N. Den enkelte punktmutation vil normalt ikke sikre fortsat overlevelse af varianten i en immun human population, men efterfølgende runder af selektion og fornyet mutation vil i sidste ende føre til udviklingen af virusvarianter, der er tilstrækkeligt afvigende fra tidligere stammer, til at de præformerede antistoffer ikke længere yder effektiv beskyttelse mod infektion; herved opstår en ny sæsoninfluenza. PB1 = basisk polymerase 1; PB2 = basisk polymerase 2; PA = sur polymerase; HA = hæmagglutinin; NA = neuraminidase; NP = nukleoprotein; M = matrixprotein; NS = non-strukturelt protein.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

post-2002-isolater udviste øget binding til $\alpha 2,6$ -koblet sialinsyre og således udviste et klart pandemisk potentiale.

En alternativ strategi er at gå efter virale molekyler, der er meget mere konserverede end H og N [3]. En sådan mulighed er protonkanalen M2, der findes i få kopier i viruskappen, men i stort antal i membranen af influenzainficerede celler. Under den naturlige infektion laves der ikke antistoffer mod dette protein, og det er yderst konserveret grundet en funktionsbestemt begrænsning i mutationsmulighederne. Vaccination af mus mod M2s eksterne domæne (M2e) har givet lovende resultater, idet en større mængde virus er nødvendig for at inducere sygdom og død. Nogle lidt bekymrende resultater i en svineinfluenzamodel har peget i den modsatte retning, idet de viste en forværring af sygdom. Sammenlagt er konsensus, at vaccination mod M2-proteinet reducerer den inflammationen, der er forbundet med influenzainfektion, men at det formodentligt har en begrænset virkning. Et nyligt fase I-forsøg med en M2e-specifik vaccine har vist god immunogenicitet af denne vaccine hos mennesker.

T-celle-medieret beskyttelse mod influenza A-virusinfektion

Som det er fremgået, eksisterer der et evolutionært pres, der favoriserer en løbende variation i H- og N-generne hos de cirkulerende influenzastammer, og viruset er adapteret til at kunne variere relativt frit i disse gener som en nødvendig forudsætning for overlevelse. Imidlertid koder virusets genom for en række molekyler, der aldrig vises på overfladen af viruspartiklen, og som derfor ikke behøver at variere tilsvarende. Teoretisk set kan der rettes T-celleresponser mod disse genprodukter, som kan føre til eliminering af inficerede celler og dermed begrænsning af virusreplikationen. Faktisk er disse gener så konserverede, at de T-cellespecificiteter, der kan genkendes i de cirkulerende stammer af human influenza, også genkendes i de cirkulerende stammer af H5N1-fugleinfluenza [4]. Modsat antistofsvaret er T-celleresponsens specificitet fundamentalt forskelligt fra individ til individ, hvilket reducerer virusets muligheder for at omgå dette ved mutation. Ved sekventiel infektion med serologisk forskellige influenzastammer i mus er det vist, at den CD8+-T-celle-medierede beskyttelse mod influenzavirusinfektion kan styrkes [5]. I mennesker indikerer historiske data, at klinisk erkendt H1N1-infektion i årene op til pandemien i 1957 beskyttede mod klinisk erkendt H2N2-influenza [6].

På grund af den teoretiske mulighed for at opnå effekt mod både sæsonbetinget og kommende pandemiske influenzavarianter har der været stor interesse for at udvikle vaccinationsprincipper, der sikrer induktion af et beskyttende T-celle-svar. Længst fremme er levende, svækkede (såkaldte *cold adapted*) influenzavirus, der gives som nasalspray, idet de har været brugt i Rusland i årevis, og en type er nu godkendt af *Food and Drug Administration* (FDA). Nyere studier i mus viser, at sådanne vacciner effektivt kan inducere et T-celle-svar, der

Faktaboks

Fugleinfluenza: Infektion hos fugle samt zoonotisk infektion hos mennesker. Da mennesker kun optræder som endværter, vil de ikke fungere som smittespredere.

Sæsoninfluenza: Tilbagevendende influenzaepidemi i vintermånederne; ses 5-7 gange i løbet af en periode på ti år og skyldes antigen drift (se Figur 1).

Pandemi: Globalt udbredt influenzaepidemi, som rammer 3-4 gange på 100 år og skyldes antigen skift (se Figur 1).

beskytter mod infektion med ellers letale doser af influenzavirus af en urelateret H-type [7]. Det erkendte potentiale i T-celle-medieret beskyttelse mod influenza A har ført til stærkt øget interesse omkring vaccineformuleringer, der sikrer induktion af et stærkt CD8+-T-celle-respons; en problematik der hidtil mest har haft eksperimentel interesse i forbindelse med udvikling af vacciner mod kroniske virusinfektioner som HIV. Her skal først og fremmest nævnes DNA-vacciner og virusvektorbaserede vacciner. DNA-vacciner har leveret nyttige resultater i mus, primært fordi de er ekstremt hurtige at designe og teste. Et problem er deres begrænsede succes i større dyr, selv om nyere resultater tyder på, at dette forhold kan forbedres. Heldigvis kan de fund, der gøres med DNA-vacciner i mus, i reglen reproducere med virusvektorbaserede vacciner, der også er potente i primater og mennesker. En nylig systematisk evaluering af antigener, der var leveret som DNA vacciner, har afklaret, at både M2-vaccination (antistofbetinget) og nukleoprotein (NP)-vaccination (T-celle-betinget) giver beskyttelse, mens en kombination af de to er begge enkeltstrategier overlegen [8]. Andres samt egne observationer tyder på, at bred beskyttelse mod letal infektion i mus kan opnås med konserverede influenzagener der leveres vha. replikationsdefekt adenovirus [9], skønt det er uklart, hvor effektiv strategien er mod forskellige isolater af H5N1-virus. Det er tidligere vist, at adenovirusbaserede influenzavirusvacciner kan tolereres af og fungere immunogent i mennesker [10].

Status på influenzaviruspandemiprofylakse

Nyere forskning i virusets H-gener indikerer, at man kan adaptere kendt vaccinationsstrategi til en kommende pandemi, såfremt H-typen kan forudses korrekt! Et problem er dog produktionskapaciteten, da fremstillingen af de klassiske vacciner er baseret på brug af levende æg, hvilket i dag er en væsentlig begrænsende faktor. Man har derfor udviklet metoder til at eliminere denne flaskehals ved at fremstille vaccineantigenerne i cellekultur enten ved revers genetik eller som rekombinante proteiner. Kombineret med nye adjuvanter, der reducerer den krævede mængde antigen, vil man langt

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

hurtigere og sikrere kunne producere et stort antal vaccine-doser. Brugen af mere effektive adjuvanter synes desuden at kunne fremme udviklingen af antistoffer, der reagerer bredere – dog stadig inden for en serotype! Vaccination med M2 eller potente vektorer, der indeholder konserverede influenza-gener, har potentiale til at skabe reelt paninfluenzaeffektive vacciner, der kan beskytte mod sygdom, men ikke mod infektion. Disse vacciner er dog endnu en del år fra klinisk anvendelse. De levende, svækkede influenzavirusbaserede vacciner, der er godkendt af FDA, må formodes at yde en vis, men endnu uafklaret grad af beskyttelse mod en kommende pandemi uanset serotype.

Korrespondance: Peter Johannes Holst, Institut for International Sundhed, Immunologi og Mikrobiologi, Panum Institut, Københavns Universitet, bygning 22.5, DK-2200 København N.
E-mail: p.holst@immi.ku.dk

Antaget: 14. august 2008
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Shinya, K, Ebina M, Yamada S et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440:435-6.
2. Tumpey TM, Maines TR, van Hoven N et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 2007;315:655-9.
3. Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* 2006;312:380-2.
4. Wang M, Lamberth K, Harndahl M et al. CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 2007;25:2823-31.
5. Christensen JP, Doherty PC, Branum KC et al. Profound protection against respiratory challenge with a lethal H7N7 influenza A virus by increasing the magnitude of CD8(+) T-cell memory. *J Virol* 2000;74:11690-6.
6. Epstein SL. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J Infect Dis* 2006;193:49-53.
7. Powell TJ, Strutt T, Reome J et al. Priming with cold-adapted influenza A does not prevent infection but elicits long-lived protection against supra-lethal challenge with heterosubtypic virus. *J Immunol* 2007;178:1030-8.
8. Jimenez GS, Planchon R, Wei Q et al. Vaxfectin-formulated influenza DNA vaccines encoding NP and M2 viral proteins protect mice against lethal viral challenge. *Hum Vaccin* 2007;3:157-64.
9. Roy S, Kobinger GP, Lin J et al. Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. *Vaccine* 2007;25:6845-51.
10. van Kampen KR, Shi Z, Gao P et al. Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine* 2005;23:1029-36.

Knoglemasse og frakturrisiko hos patienter med ankyloserende spondylitis

Overlæge Ole Rintek Madsen

Gentofte Hospital, Medicinsk Afdeling C, Reumatologisk Funktion

Resume

Ankyloserende spondylitis (AS) er en inflammatorisk sygdom, der primært afficerer columna. Knoglemineraltætheden (BMD) er reduceret, især hos mandlige patienter. Syndesmofytter kan give falsk forhøjede BMD-værdier i columna. Risikoen for vertebrale kompressionsfrakturer er rapporteret at være syvfold øget i forhold til raske individer. Der er ikke beskrevet øget forekomst af perifere frakturer. De strukturelle forandringer i columna disponerer til ustabile frakturer. Der anbefales antiresorptiv behandling af den osteoporotiske patient med AS, men effekten på knoglemassen er aldrig undersøgt hos disse patienter.

Ankyloserende spondylitis (AS), der forekommer hos 1-2 promille af befolkningen, er en kronisk, systemisk inflammatorisk sygdom af ukendt ætiologi. Sygdommen afficerer først og fremmest det aksiale skelet inkl. sacroiliacaleddene. Den struktur, der primært afficeres, er entesen, som er overgangen mellem senefibre og knogle. Her findes inflammatoriske foci,

og der udvikles erosioner. De tidligste radiologiske forandringer i corpora vertebrae er erosioner ved anulusfibrenes tilhæftning (Romanuslæsionen). De reparative forandringer skyder over målet, hvorved der opstår knogleprominenser. På grund af inflammation svarende til fibertilhæftningen på spidsen af knogleprominenserne opstår nye erosive forandringer og nye reparative processer. Til sidst ses nærblygende forkalkninger svarende til anulusfibrene – syndesmofytter. Diskus omkranses efterhånden af brodannende syndesmofytter, så der opstår ankolyse. Sekundært kan der optræde ossifikation af disci. Forkalkning af de longitudinelle ligamenter og ydre anulusfibre resulterer til sidst i den klassiske *bamboo spine*. Lignende processer foregår omkring apofyseleddene og i sacroiliacaleddene. Sygdommen er forbundet med rygsmerte og tiltagende rygstivhed- og krumhed. Hyppigt er der også symptomer fra de større perifere led, fra perifere senertilhæftninger (entesopati) samt ekstraskelitale manifestationer fra især øjne og hud [1, 2].

I de senere år er man blevet opmærksom på en øget forekomst af osteoporose og osteoporotiske frakturer hos patienter med AS. Patogenesen er ikke endeligt afklaret, men den inflammatoriske aktivitet, der er helt central for udviklingen af AS, er associeret til en øget forekomst af en række cytoki-