

**Verträglichkeit und Effektivität neuer synthetischer Adjuvantien  
bei der Erzeugung von Antikörpern gegen  
Synaptobrevin 2-Fragmente in der Balb/c-Maus**



**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Daniela Külbs**





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 3-938026-61-8

Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere,  
Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Herr Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Betreuer: Herr PD Dr. A. Hoffmann

**Verträglichkeit und Effektivität neuer synthetischer  
Adjuvantien bei der Erzeugung von Antikörpern gegen  
Synaptobrevin 2-Fragmente in der Balb/c-Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Daniela Külbs**  
Tierärztin aus Jugenheim

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer  
PD Dr. A. Hoffmann

Tag der Disputation: 25.11.2005

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. J. Hartinger am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, in Langen angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Hartinger, J., Külbs, D., Volkers, P. and Cussler, K. (2003): Suitability of temperature-sensitive transponders to measure body temperature during animal experiments required for regulatory tests. *ALTEX* **20**, 65-70.

# INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....	3
1. EINLEITUNG .....	5
2. LITERATUR.....	7
2.1 Moderne Konzepte der Immunregulation .....	7
2.2 Rolle des Carrier bei der Induktion der Immunantwort .....	8
2.3 Adjuvantien .....	9
2.4 Tierschutzaspekte bei der Anwendung von Adjuvantien bei Versuchstieren ..	15
3. MATERIAL UND METHODEN .....	16
3.1 Tiere .....	16
3.2 Adjuvantien .....	16
3.3 Antigen .....	16
3.4 Antikörper .....	17
3.5 Herstellung der Adjuvans/Antigen-Mischungen .....	17
3.6 Übersicht zu den Tiergruppen und Immunisierungsschemata .....	17
3.7 Immunisierungsverlauf .....	18
3.8 Klinische Beobachtungen.....	19
3.9 Pathohistologische Untersuchung der veränderten Injektionsstellen .....	20
3.10 Immunoassay (Bestimmung der rSyb2-Antikörper).....	20
3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot (Immunoblot).....	22
3.12 Chemikalien für ELISA und Western Blot.....	24
3.13 Statistische Methoden.....	24
3.14 Beschreibung eines Boxplots anhand eines Musters.....	26
4. ERGEBNISSE .....	27
4.1 Klinische Beobachtungen.....	27
4.1.1 Entwicklung des Körpergewichts während der Versuchsreihen.....	27
4.1.2 Allgemeinbefinden und Verhalten der Tiere .....	36
4.1.3 Makroskopisch sichtbare Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle ....	36
4.1.4 Sektionsbefunde .....	41
4.1.5 Pathohistologische Befunde.....	41
4.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit der Adjuvantien .....	46
4.2.1 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Peptid rSyb2 <sub>70-76</sub> .....	46
4.2.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen das Oktamer rSyb2 <sub>70-76</sub> sowie gegen Fragmente des rekombinanten Synaptobrevin 2 (rSyb2 <sub>frag.</sub> ) .....	57
4.2.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis einer erfolgreichen Kopplung des Oktamers rSyb2 <sub>70-76</sub> (Immunisierungspeptid) an die Carrier KLH, ChTxB und BSA.....	59
4.2.4 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Carrier KLH und ChTxB ..	61
4.3 Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A in Mäuseseren.....	68
4.4 Effekte von Adjuvantien auf Akute-Phase-Proteine, histologische Befunde und Allgemeinzustand.....	68



5. DISKUSSION .....	70
5.1 Klinische Beobachtungen.....	70
5.2 Wirksamkeit der Adjuvantien.....	72
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	78
7. SUMMARY .....	80
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	82
9. ANHANG .....	87
10. DANKSAGUNG .....	122

## Verwendete Abkürzungen

APR	Akute-Phase-Reaktion
BSA	Bovines Serum Albumin
ChTxB	Choleratoxin, Untereinheit B
DOC	Deoxycholat
ELISA	Enzym-gekoppelter immunadsorbierender Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
kFA	komplettes Freundsches Adjuvans
KLH	Napfschnecken-Hämocyanin (Keyhole Limpet Haemocyanin)
LPS	Lipopolysaccharide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Rab1-N-term.-rSyb2-AK	polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, der gegen das N-terminale Ende des rekombinanten Synaptobrevin 2 gerichtet ist
rSyb2 <sub>frag.</sub>	durch Tetanustoxin gespaltenes Synaptobrevin 2
rSyb2	rekombinantes Synaptobrevin 2
rSyb2 <sub>70-76</sub>	Immunisierungspeptid, Oktamer NH <sub>2</sub> -CLQAGASQ-COOH
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
TMB	Tetramethyl-Benzidine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Übersicht zu den Tiergruppen:

Kontrollgruppen:

Gruppe 0: unbehandelte Kontrollgruppe, keine Immunisierung

Gruppe 1: KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS

Gruppe 3: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS

Tiergruppen mit dem Carrier KLH:

Gruppe 2: KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol

Gruppe 4: KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse Adjuvant

Gruppe 5: KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™

Gruppe 6: KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans

Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB:

Gruppe 7: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol

Gruppe 8: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse Adjuvant

Gruppe 9: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™

Gruppe 10: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans

Gruppe 11: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Imject® Alum

Gruppe 12: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Diluvac forte

Oral immunisierte Tiergruppen:

Gruppe 13: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS

Gruppe 14: ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse Adjuvant

# 1. Einleitung

Das Ziel einer Immunisierung besteht darin, das Immunsystem gegenüber körperfremden Substanzen, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten oder ihren Toxinen spezifisch zu stimulieren. In der veterinärmedizinischen Praxis werden so Tiere vor Infektionskrankheiten geschützt. Immunisierungen für experimentelle Zwecke dienen entweder dazu, die Mechanismen der spezifischen humoralen (Antikörperproduktion) oder zellulären (T-Zell-Aktivierung) Immunantwort zu studieren oder einfach nur der Gewinnung von Antikörpern, die als diagnostisches oder wissenschaftliches Werkzeug benötigt werden.

Die Stärke der Immunantwort hängt unter anderem von der individuellen Konstitution des Organismus (genetische Disposition, „high“ oder „low responder“), Umweltbedingungen (Stress etc.) sowie den immunogenen Eigenschaften des Antigens ab, die von der Verabreichungsform beeinflusst werden. Die alleinige Injektion des Antigens reicht in der Regel nicht aus, um eine belastbare Immunantwort des Organismus zu erreichen. In solchen Fällen kann durch Zugabe von Adjuvantien eine stärkere Immunantwort ausgelöst werden. Als Adjuvans dienen oft Substanzen wie Aluminiumverbindungen, Mineralöle, Saponine oder inaktivierte Mycobakterien. Allerdings können Adjuvantien auch unerwünschte Reaktionen auslösen, wie z.B. Fieber, Mattigkeit oder granulomatöse Entzündungen. Diese Nebenwirkungen müssen bei der Wahl des jeweiligen Adjuvans mit bedacht werden.

Bei der Antikörperherstellung für experimentelle Zwecke war komplettes Freundesches Adjuvans (kFA) eines der am häufigsten angewandten Adjuvantien. KFA besteht aus einer nicht metabolisierbaren Mineralölkomponente, einem Emulgator und abgetöteten Mycobakterien (meist *M. tuberculosis*). Seine Applikation ist allerdings oft vom Auftreten gravierender Nebenwirkungen (sterile Abszesse oder Granulome am Injektionsort, Fieber usw.) begleitet, weshalb es am Paul-Ehrlich-Institut in der Regel nicht mehr eingesetzt wird.

Nach § 8 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TSchG) dürfen Versuche an Wirbeltieren nur durchgeführt werden, wenn die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind. Daher ist der Tierschutz beim Einsatz eines Adjuvans zu Forschungszwecken besonders wichtig. Es sollten somit nur Adjuvantien zum Einsatz kommen, die möglichst wenige Nebenwirkungen hervorrufen und dennoch eine gute Immunantwort induzieren. Neue Erkenntnisse zeigen allerdings, dass das Immunsystem zur Aktivierung Alarm-Signale aus geschädigten Geweben benötigt (Matzinger, 2002).

Aus praktischen Gründen sollte die Antigen/Adjuvans-Mischung leicht und reproduzierbar sowie kostengünstig herzustellen sein. Wesentlich ist ebenso die einfache Handhabung bei der Applikation am Tier, was bei vielen Adjuvantien in Impfstoffprodukten nicht gegeben ist (z.B. Proteo-Liposomen als Antigen-carrier oder Mikroverkapsulierung des Antigens) (Newman und Powell, 1995).

Ziel dieser Studie ist die Entwicklung eines tierschonenden Immunisierungsschemas, um mit Peptidantigenen hohe spezifische Antikörpertiter zu erzeugen. Es wird dabei

eine Auswahl an Adjuvantien bezüglich ihrer immunstimulierenden Wirkung einerseits und der durch sie verursachten Nebenwirkungen andererseits untersucht.

Als Modellantigen wird ein synthetisches Oktamer-Peptid, das von dem Vesikelprotein Synaptobrevin 2 (Syb2, oder vesikelassoziiertes Membranprotein 2, VAMP 2, Baumert et al.; Trimble et al., 1988) abgeleitet ist, verwendet. Syb2 befindet sich unter anderem in den muskelrelaxierend wirkenden Synapsen in den motorischen Vorderhornzellen des Zentralen Nervensystems. Hier ist es an der Exozytose der inhibitorischen Transmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und Glycin beteiligt. Synaptobrevin 2 ist Angriffsort des Tetanustoxins (Tetanospasmin, TTx), einem Exotoxin des Bakteriums *Clostridium tetani*. TTx ist ein Protein, das aus einer leichten (L von engl. light) und einer schweren (H von engl. heavy) Kette besteht, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Gelangt das Toxin in Wunden, wird es über die Blutbahn und das Lymphsystem zu den Endplatten der Nerven transportiert. Die schwere Kette bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche der präsynaptischen Membran, worauf das Toxin in das Innere der Nervenzelle aufgenommen wird. Von dort wandert es retrograd entlang der Motoneuron-Axone zu den inhibitorischen Neuronen des Zentralnervensystems. Die leichte Kette des Toxins erkennt nun spezifisch das Vesikelprotein Synaptobrevin 2 und spaltet es in der Nähe des Carboxy-Terminus. Durch die Funktionsunfähigkeit von Syb2 wird die Freisetzung von GABA und Glycin gehemmt, und es kommt zu starken tonischen Krampfanfällen, dem klinischen Bild des Tetanus (Montecucco, 1994; Forth et al., 1996).

In der experimentellen Immunologie gilt die Induktion von Antikörpern gegen körpereigene Proteine als besonders schwierig, da oft eine immunologische Toleranz besteht. Zur Lösung dieses Problems stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Die Verwendung von Knock-out-Mäusen: Deren Einsatz ist aber nur bei nicht lebenswichtigen Proteinen möglich.
2. Der Einsatz hoch potenter Adjuvantien, die das Antigen dem Immunsystem als „fremd“ präsentieren.

Das in der vorliegenden Adjuvanstudie verwendete Immunisierungsantigen (rSyb2<sub>70-76</sub>) leitet sich von der Tetanustoxin-Spaltstelle des Synaptobrevin 2 ab.

Es handelt sich hierbei um ein sehr kurzes Antigen (acht Aminosäuren) und ist daher allein ungeeignet, eine Immunantwort hervorzurufen. Deshalb muss es an ein Trägermaterial gekoppelt werden. Die hier verwendeten Carriermoleküle KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin) oder Cholera toxin B-Untereinheit, die selbst auch adjuvante Eigenschaften haben, werden anschließend mit verschiedenen Adjuvantien versetzt.

Die Untersuchungen werden an Balb/c-Mäusen durchgeführt, da zur Produktion monoklonaler Antikörper meist Myelom-Zelllinien aus dieser Mauslinie verwendet werden.

## 2. Literatur

### 2.1 Moderne Konzepte der Immunregulation

Die Immunantwort muss strenger Regulierung unterliegen, da die Kapazität des Immunsystems wie in jedem biologischen System begrenzt ist. Die Regulation ist erforderlich, um „Überempfindlichkeiten“, z.B. Allergien und Autoimmunreaktionen zu verhindern oder zu begrenzen. Die Mechanismen dafür beruhen auf humoralen und zellulären Regelkreisen. Von besonderem Interesse ist dabei die Danger-Hypothese, auf die im Folgenden eingegangen wird: Der Hypothese zufolge ist nicht allein die Anwesenheit eines Antigens per se wichtig für die Immunantwort, sondern die Frage, ob es für den befallenen Organismus gefährlich ist oder nicht (Matzinger, 2002). Danach stimuliert das infolge einer mikrobiellen Infektion geschädigte Gewebe das Immunsystem direkt. Rezeptoren wie die Toll-like Rezeptor-Familie oder die „nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) receptors“ erkennen bestimmte Signal-Strukturen der Mikroben und aktivieren so die Immunantwort. Nach der Danger-Hypothese sollen diese Rezeptoren auf „Alarm-Signale“ des geschädigten Gewebes reagieren. Sie können intrazellulären oder extrazellulären Ursprung haben. Beispiele für solche endogenen Alarm-Signale sind Säuger-DNA und -RNA, Hitzeschock-Proteine, Interferon  $\alpha$  und Interleukin 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ). Sie stimulieren, wie exogene Faktoren auch, die antigenpräsentierenden Zellen (z.B. dendritische Zellen) und die T-Lymphozyten.

Des Weiteren wird angenommen, dass verschiedene Organismen die gleichen oder ähnliche Alarm-Signale benutzen. Hydrophobe Anteile vieler Moleküle (z.B. Proteine) sind ins Innere der Molekülstruktur gerichtet oder in der Lipidmembran einer Zelle verborgen. Stirbt eine Zelle, könnten diese hydrophoben Anteile freigesetzt werden und als Alarm-Signal dienen.

Nebenbei liefert das Danger-Modell auch einen Erklärungsansatz, warum Feten im mütterlichen Organismus nicht als fremd erkannt und vom Immunsystem angegriffen werden: gesunde Feten senden keine Alarm-Signale aus, das Immunsystem wird nicht stimuliert.

Auch bei der Entwicklung neuer Medikamente bei Transplantationen gibt das Danger-Modell neue Denkansätze: Arzneimittel, die Alarm-Signale blockieren, könnten die lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva unnötig machen.

Auch für das Verständnis einiger Autoimmunerkrankungen hält das Danger-Modell neue Aspekte bereit. Es geht davon aus, dass einige Autoimmunerkrankungen durch Mutationen verschiedener Gene, die den physiologischen Zelltodmechanismus (Apoptose) betreffen, verursacht werden. Das würde bedeuten, dass das Immunsystem nicht versagt, sondern nur seine eigentliche Aufgabe wahrnimmt, nämlich auf Alarm-Signale zu reagieren. Wichtig ist also in diesem Zusammenhang, solche mutierten Gene zu finden, um die Empfänglichkeit des Organismus für Autoimmunerkrankungen zu reduzieren.

Shi et al. (2003) untersuchten die Alarm-Signale genauer und fanden ein neues endogenes Alarm-Signal, kristalline Harnsäure. Harnsäure kommt natürlicherweise in jedem Säugerorganismus, so beispielsweise beim Purinabbau, vor.

Wird nun eine Zelle mit einem pathogenen Agens infiziert, baut sie sehr schnell DNA und RNA ab, Harnsäure fällt im Übermaß an und kann auskristallisieren: dendritische Zellen und CD8-T-Zellen werden von kristalliner Harnsäure *in vivo* in einem Konzentrationsbereich bei 10 µg pro 100 µl stimuliert. Gelöste Harnsäure stellt dagegen kein Alarm-Signal dar.

Möglicherweise ergeben sich hieraus auch Ansätze zur Entwicklung eines neuen Adjuvans-Typs in der Impfstoffherstellung.

## **2.2 Rolle des Carrier bei der Induktion der Immunantwort**

Niedermolekulare Substanzen, z.B. kurze Peptide, können für sich alleine keine Immunantwort auslösen. Sie müssen daher an eine hochmolekulare Substanz als Träger (Carrier) gekoppelt werden, um als Vollantigen wirksam zu werden.

Die meisten Carrier, wie z.B. Bentonit, Latexpartikel, Acrylpartikel oder Liposomen, sind immunologisch inaktiv. Sind sie jedoch an ein Hapten gebunden, dann sind sie in der Lage, die Aggregation löslicher Proteine zu fördern und damit die Aufnahme in Makrophagen zu erleichtern. Liposomen spielen als Carrier eine große Rolle, da sie sehr gut mit Makrophagen interagieren können. Gleichzeitig werden ihnen auch adjuvante Eigenschaften zugesprochen (Kaeberle, 1986).

Große Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 60.000 Dalton werden bevorzugt als Carrier eingesetzt, da sie eine große Anzahl an -NH<sub>2</sub>, -SH- etc. - Gruppen besitzen, mit deren Hilfe eine ausreichende Kopplung an die antigene Determinante erzielt werden kann (Leenaars et al., 1995).

Man nimmt an, dass die meisten Proteine, die nicht aus demselben Organismus stammen, in diesem als Carrier fungieren können. Generell gilt, dass mit der genetischen Distanz die Antigenität oder die Effizienz von Carrierproteinen steigt (Leenaars et al., 1997). Beispiel für populäre Carrier ist zum einen das Napfschnecken-Hämocytein (keyhole limpet haemocyanin, KLH), das zur Immunisierung von Mäusen, Kaninchen, Schafen und Ziegen eingesetzt wird (Fischer et al., 1988; Leenaars et al., 1997).

Zum anderen wird vermehrt die B-Untereinheit von Cholera-toxin als Carrier benutzt. Cholera-toxin ist ein Enterotoxin, das von dem Bakterium *Vibrio cholerae* produziert wird. Das Cholera-toxin-Molekül besteht aus fünf ringförmig angeordneten B(binding)-Untereinheiten, in die eine toxische A-Untereinheit eingefügt ist. Die B-Untereinheiten haben eine hohe Affinität zu dem gangliosiden GM1-Rezeptor. Wenn sie daran gebunden haben, ermöglichen sie der A-Untereinheit, in die Zelle zu gelangen. Die A-Untereinheit aktiviert die Adenylcyclase in den Dünndarmzellen, was dort zu einer vermehrten Wasser- und Ionensekretion führt.

Mc Kenzie und Halsey (1984) setzten zum ersten Mal die Untereinheit B als Carrier bei der Immunisierung von Mäusen ein und konnten sowohl die mucosale als auch die systemische Wirkung der Untereinheit B belegen. Auch Suckow et al. (1996) konnten in Experimenten zur intranasalen Vakzinierung von Kaninchen mit an Cholera-toxin gekoppelte *Pasteurella multocida*-Stämme die lokale mucosale IgA-Produktion sowie die systemische IgG-Produktion bestätigen.

Obwohl der genaue Wirkmechanismus noch weitgehend unbekannt ist, konnte gezeigt werden, dass sowohl das Holotoxin als auch dessen Untereinheit B gute adjuvante Eigenschaften aufweisen (Wu und Russell, 1998). Cholera-toxin und seine Untereinheit B aktivieren sowohl T- als auch B-Zellen und Makrophagen und fördern die Freisetzung von Interleukinen (Dertzbaugh und Elson, 1991; Holmgren et al., 1993). Neue Untersuchungen zeigen, dass die Untereinheit B möglicherweise in der Lage ist, an die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 zu binden und somit immunstimulierend zu wirken. Es wird auch postuliert, dass ein Zusammenspiel von GM1 und TLR 2 und 4 in Betracht zu ziehen ist (Maeyama et al., 2002).

Des Weiteren stimuliert die Untereinheit B das immunologische Gedächtnis (Vogel und Powell, 1995; Lebens und Holmgren, 1994). Alle diese Eigenschaften versucht man bei der oralen Vakzinierung zu nutzen (z.B. Impfstoffe gegen *Cholera* und *E.coli*) (Lebens und Holmgren, 1994), wobei beim Menschen die B-Untereinheit des Cholera-toxins eine größere Rolle spielt als das Holotoxin, da die toxische Wirkung des Toxins beim Einsatz im Menschen ein großes Problem darstellt. In Tierexperimenten kommen beide Formen zum Einsatz.

Auch das hitzelabile Enterotoxin von *Escherichia coli* (LT) und das Shigatoxin (von *Shigella flexneri* produziert) haben einen ähnlichen Aufbau wie das Cholera-toxin und sind im Intestinum immunologisch aktiv.

### 2.3 Adjuvantien

Adjuvantien sind Substanzen, die bei gemeinsamer Applikation mit einem Antigen die Antwort des Immunsystems unspezifisch verstärken (z.B. erhöhte Bildung von Antikörpern und Stimulation des immunologischen Gedächtnisses) bzw. die Art der Immunantwort verändern (z.B. Aufhebung einer Immuntoleranz). Verglichen mit der Verabreichung eines Antigens ohne Adjuvans erlaubt die Mischung beider Substanzen den Einsatz geringerer Antigenmengen (Kaeberle, 1986). Der genaue Wirkmechanismus von Adjuvantien ist allerdings bis heute noch nicht vollständig verstanden (Schijns, 2000; Cox und Coulter, 1997).

Als Adjuvantien werden in Impfstoffen vor allem Aluminiumverbindungen, aber auch Mineralöle und nicht infektiöse Bestandteile von Bakterien verwendet.

Reine Adjuvantien unterscheiden sich von Trägerproteinen (Carrier) dadurch, dass sie mit dem Immunogen keine stabile Verbindung eingehen.

Bisher ist noch unklar, ob Adjuvantien direkt am Injektionsort wirken oder erst später im lymphatischen Gewebe. Als gesichert gilt, dass sie lösliche Proteinantigene an partikuläres Material binden, das die antigenpräsentierenden Zellen (wie Makrophagen) schneller aufnehmen (Janeway et al., 2002; Cox und Coulter, 1997). Dies geschieht durch Anlagern der Antigene an Aluminiumpartikel, durch Emulsion in mineralischem Öl oder durch Einbau in ISCOM-Kolloidpartikel (engl.: immune stimulatory complexes, ISCOMs). Des Weiteren veranlassen Adjuvantien dendritische Zellen und Makrophagen, zum Injektionsort zu wandern, Antigene durch Phagozytose und Pinozytose aufzunehmen, zum lymphatischen Gewebe zu transportieren und dort das Antigen wirkungsvoll den T-Zellen zu präsentieren (Janeway et al., 2002; Schijns, 2000).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Depotwirkung der Adjuvantien. Bei alleiniger Injektion des Antigens würde es in relativ kurzer Zeit im Organismus abgebaut werden. Die Antikörperbildung wäre dann viel schwächer ausgeprägt. Ist das Antigen jedoch an ein Adjuvans adsorbiert, verbleibt es länger im Gewebe und kann somit



ständig über einen längeren Zeitraum Immunzellen aktivieren. Ölhaltige Adjuvantien zeigen dabei stärkere Depotwirkung als beispielsweise Aluminiumverbindungen (Schijns, 2000; Cox und Coulter, 1997).

Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen, Mastzellen oder neutrophile Granulozyten) exprimieren Rezeptoren (pathogen-recognition receptors, PRRs), die bestimmte mikrobielle Strukturen (pathogen-associated microbial patterns, PAMPs) erkennen. Es wird vermutet, dass Adjuvantien, vor allem lösliche und solche, die mikrobielle Substanzen enthalten, in der Lage sind, die Erreger-Strukturen nachzuahmen und somit die Zellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren. Dies gilt jedoch höchstwahrscheinlich nicht für Aluminiumverbindungen, ölhaltige Adjuvantien oder Saponine.

Eine weitere Wirkung von Adjuvantien ist die Induktion einer Entzündung am Injektionsort. Dadurch werden Makrophagen und andere Zellen der angeborenen Immunität stimuliert, Zytokine zu produzieren. Dieser Effekt scheint die Immunreaktion zu verstärken. Wie dies im Einzelnen von statten geht, ist noch unklar (Schijns, 2000; Janeway et al., 2002; Cox und Coulter, 1997). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Aluminiumhydroxid, Muramyl-Dipeptid und Saponine die spezifische Produktion von Interleukin 1 (IL 1) aktivieren. IL 1 ist ein wichtiger Costimulator für die Proliferation von CD4+ TH2-Zellen, die dann Antikörper produzieren. Da Interleukine in der Lage sind, Entzündungsreaktionen hervorzurufen und somit das Immunsystem zu aktivieren, kann man sie als natürliche Adjuvantien bezeichnen (Schijns, 2000). In jedem Fall sollten immunisierte Tiere täglich von qualifiziertem Personal überwacht werden, um Entzündungsreaktionen rechtzeitig erkennen zu können (Hanly et al., 1995).

Ein weiterer Ansatz in der Impfstoffherstellung ist die Überlegung, Zytokine zusammen mit dem Antigen zu applizieren. Beim Einsatz von Zytokinen als Adjuvantien ist jedoch zu beachten, dass jedes Zytokin mehrere Effekte hervorrufen kann. So können sie z.B. gleichzeitig stimulierende und hemmende Eigenschaften aufweisen. Auch der unerwünschte Nebeneffekt, starke Entzündungen hervorzurufen, kann als problematisch angesehen werden. Die Spezies-Spezifität von Zytokinen schränkt ihre Verwendung als Adjuvans weiter ein (Newman und Powell, 1995).

Die Einteilung der Adjuvantien erfolgt gemäß Woodard (1990) in drei große Gruppen: 1. Oberflächenaktive Adjuvantien (Emulgatoren), 2. Vesikuläre Adjuvantien und 3. Wasserlösliche Adjuvantien.

Zu den oberflächenaktiven Adjuvantien gehören unter anderem Saponine, Vitamin A und E, Glycolipide, Lipopolysaccharide (LPS), ISCOM und Aluminiumsalze.

**Aluminiumhydroxid** oder **Aluminiumphosphat** haben sich als Adjuvantien in Impfstoffen sehr lange bewährt, bei schwachen Antigenen hat sich ihre Wirkung jedoch als unzureichend herausgestellt. Aluminiumverbindungen haben einen Depoteffekt, aktivieren das Komplementsystem und stimulieren die Bildung und Freisetzung von IL 1, IL 4 und TH2-Zellen mit verstärkter IgG1- und IgE-Produktion. Bei der Herstellung einer Antigen-Adjuvans-Lösung ist darauf zu achten, dass das Antigen am Aluminiumgel adsorbiert wird. Für die primäre Adsorption sind der pH-Wert der Impflösung und die isoelektrischen Punkte von Antigen und Gel entscheidend. Der isoelektrische Punkt (IP) von Aluminiumhydroxid liegt bei 11, der von Aluminiumphosphat bei 4. Für die Bindung an Aluminiumhydroxid ist BSA mit einem IP von 4,8 (relativ sauer) geeignet, während für die Bindung an Aluminiumphosphat mit Lysozym (IP:11) basische Proteine zum Einsatz kommen

(Hartinger und Mateis, 1998; Seeber et al., 1991). Die Adsorption beruht auf van der Waals Kräften und auf hydrophoben Kräften (Rajesh et al., 1995). Ein Milligramm Aluminiumhydroxid adsorbiert ca. 50-200 µg Protein (Nicklas, 1992). Boosterinjektionen sollten erst nach vorheriger Titerkontrolle und frühestens vier Wochen nach der Erstimmunisierung erfolgen. Ein bis zwei Boosterinjektionen reichen meist aus, um eine zufriedenstellende Immunantwort zu erhalten. Als Nebenwirkungen von aluminiumhaltigen Adjuvantien werden milde Reaktionen wie Erytheme und leichte Schwellungen an der Injektionsstelle beschrieben. Deshalb werden aluminiumhaltige Impfstoffe in der Humanmedizin normalerweise intramuskulär, in der Veterinärmedizin meistens subkutan appliziert. Sie können aber auch, abhängig vom Einsatzzweck, intramuskulär, intravenös (Kaninchen) oder intraperitoneal (bei Mäusen) appliziert werden (Nicklas, 1992). Werden Aluminiumgele mit anderen Adjuvantien (z.B. abgetötete Bakterien oder Liposomen) kombiniert, steigert man damit ihre immunstimulatorische Wirkung (Nicklas, 1992).

**Lipopolysaccharide (LPS)** sind Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien. Die adjuvanten Eigenschaften beruhen im Wesentlichen auf dem Lipid A-Teil des Moleküls. In der Blutbahn werden sie zunächst im Serum von dem „LPS-binding protein“ (LBP) gebunden und zu CD14-Zellen transportiert. CD14 bindet das LPS und katalysiert den Transfer von LPS aus dem Extrazellulärraum zur Zellmembran mit den Toll-like Rezeptoren 2 und 4. Diese besitzen einen intrazellulären und extrazellulären Anteil. An der extrazellulären Domäne ist das Protein MD-2 gebunden. Dieser TLR-MD-2-Komplex erkennt das an CD14 gebundene LPS, wodurch Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert werden und die Produktion von IL 1, IL 8 und TNF- $\alpha$  stimuliert wird (Triantafyllou und Triantafyllou, 2002; Martin und Wesche, 2002; Persing et al., 2002; Akashi et al., 2003; Shimazu et al., 1999; Kaisho und Akira, 2002).

LPS sind auch in der Lage, die Zytokinproduktion über einen intrazellulären Weg zu stimulieren. Dazu binden sie an das Adapter-Protein „Myeloid differentiation marker 88“ (MyD88) des TLR 4 (Akira et al., 2000).

Des Weiteren haben die LPS einen B-Zell-mitogenen Effekt und stimulieren unspezifisch die natürliche Antikörperproduktion, selbst wenn sie ohne Antigen appliziert werden (Wiedemann et al., 1991; Warren et al., 1986).

In zahlreichen Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich  **$\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)**-Gaben als Nahrungsergänzung positiv auf das Immunsystem von Mensch und Tier auswirken. Gerade bei Hochleistungskühen, in der Schweinemast, beim Transport von Tieren, bei immungeschwächten Menschen (Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus) konnte die Infektanfälligkeit deutlich reduziert werden (Tengerdy, 1989).

Genauere Untersuchungen der Wirkungsweise von Vitamin E ergaben, dass Vitamin E antioxidativ wirkt, die Synthese von Prostaglandinen, Thromboxan und Leukotrienen beeinflusst und die Zellproliferation in der Milz stimuliert (Stimulation der Antikörperbildung, vor allem IgG). Des Weiteren aktiviert es T-Helfer-Zellen, wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten. In Stresssituationen senkt Vitamin E darüber hinaus den Cortisol-Spiegel.

Diese immunstimulierenden Eigenschaften von Vitamin E haben dazu geführt, es experimentell als Adjuvans einzusetzen. Es zeigte sich, dass es stärkere Immunantworten hervorrufen kann als inkomplettes Freundsches Adjuvans und sich

deutlich geringere entzündliche Reaktionen am Injektionsort einstellten (Tengerdy, 1989).

Zurzeit wird Vitamin E als Adjuvans in Impfstoffen für Schafe eingesetzt (Tengerdy, 1990).

Zu den vesikulären Adjuvantien gehören Wasser-in-Öl-Emulsionen, Öl-in-Wasser-Emulsionen und Liposomen. Die wohl bedeutsamsten Wasser-in-Öl-Emulsionen sind das komplette und das inkomplette Freundsches Adjuvans.

**Komplettes Freundsches Adjuvans** ist eine Mischung aus Mineralöl, einer oberflächenaktiven Substanz (Arlacel A) und den hitzeinaktivierten Mycobakterien *M. tuberculosis* oder *M. butyricum*.

Komplettes Freundsches Adjuvans weist einen Depot-Effekt auf und stimuliert sowohl die zelluläre (Makrophagen) als auch die humorale Abwehr (Antikörperbildung, TH-1-Zellen) (Audibert und Lise, 1993). Außerdem schafft es in der Nähe des Antigens eine hydrophobe Umgebung und hilft dendritischen Zellen bei der Antigenaufnahme (Newman und Powell, 1995). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Immunstimulation über den Toll-like Rezeptor 2 erfolgt, der die abgetöteten Bestandteile der Mycobakterien erkennt (Lim, 2003).

Komplettes Freundsches Adjuvans löst zahlreiche schwerwiegende Nebenwirkungen aus. Es führt zu Hautreizungen, -rötungen und Zellinvasion in das behandelte Gewebe, aber auch zu Fieber, Granulombildung, sterilen Abszessen, ulzerierenden Gewebekrosen sowohl an der Injektionsstelle als auch auf hämatogenem Wege an inneren Organen wie Lunge oder Leber. Ausserdem ruft es Arthritiden hervor (Hanly et al., 1995; Hartinger, 1997). Aufgrund dieser schweren Nebenwirkungen wird komplettes Freundsches Adjuvans in der Humanmedizin nicht eingesetzt; sein Einsatz in der Veterinärmedizin wird kontrovers diskutiert (Audibert und Lise, 1993). In Deutschland ist auf Grund der Tierschutzgesetzgebung die Notwendigkeit des Einsatzes von Freundschem Adjuvans zu begründen. Komplettes Freundsches Adjuvans darf aber nur einmal beim Tier eingesetzt werden (Hartinger, 1997).

**Inkomplettes Freundsches Adjuvans** ist genauso zusammengesetzt mit dem wesentlichen Unterschied, dass hier keine inaktivierten Mycobakterien enthalten sind. Es stimuliert hauptsächlich die humorale Immunabwehr und ist somit ein potentiell schwächeres Adjuvans als das komplette Freundsches Adjuvans. Es wird häufig zur Boosterung von Versuchstieren verwendet, die vorher mit komplettem Freundschem Adjuvans immunisiert wurden. Hier macht man sich das immunologische Gedächtnis zu Nutze, denn boostert man mit inkomplettem Freundschem Adjuvans, dann wird auch hier das Immunsystem durch den Toll-like Rezeptor 2 aktiviert (Lim, 2003).

Auch inkomplettes Freundsches Adjuvans kann Granulome und Abszesse am Injektionsort hervorrufen, jedoch sind die Nebenwirkungen insgesamt schwächer einzustufen als beim kompletten Freundschem Adjuvans (Hanly et al., 1995).

Fast identisch mit inkomplettem Freundschem Adjuvans ist **Specol**. Es enthält das Mineralöl Marcol 52 (Paraffin- und Cycloparaffin-Öl, Kettenlänge: 13-22 C-Atome) sowie die Emulgatoren Span 85 (Sorbitan Trioleat) und Tween 85 (Polyoxyethylene-20-Trioleat) und bildet ebenfalls Wasser-in-Öl-Emulsionen. Specol fungiert als Vehikel, besitzt Depotwirkung, aktiviert Makrophagen (Leenaars et al., 1997) und stimuliert die humorale Immunantwort. Durch oberflächenaktive Substanzen wie Tween 80 und 85, die in manchen Adjuvantien enthalten sind, kommt es zu

Zellnekrose und Apoptose der Gewebezellen, wodurch dendritische Zellen und zytotoxische T-Zellen aktiviert werden (Yang et al., 2004). Insbesondere T-Zellen werden zur IL 2-Produktion aktiviert (Boersma et al., 1992). Specol schafft in der Nähe des Antigens eine hydrophobe Umgebung und hilft antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen, B-Zellen oder Fibroblasten bei der Antigenaufnahme (Leenaars et al., 1997; Newman und Powell, 1995). Seine Aktivität hinsichtlich der Zellen des Immunsystems bewirkt eine Freisetzung von Zytokinen (Vogel und Powell, 1995). Specol kann bei niedermolekularen bzw. schlecht immunogenen Substanzen und bei Antigenen, deren Struktur und Eigenschaften nicht gut charakterisiert sind, verwendet werden (Leenaars et al., 1997). Die Nebenwirkungen sind deutlich geringer als beim Freundschens Adjuvans; es werden in der Literatur vor allem Hautreizungen und Schwellungen am Injektionsort beschrieben (Leenaars et al., 1994). Intraperitoneale Immunisierungen von Mäusen werden nicht empfohlen, da der Antikörpertiter dadurch nicht erhöht wird, aber schwere pathologische Reaktionen ausgelöst werden können. Die intravenöse Applikation von Specol und anderen ölhaltigen Adjuvantien verbietet sich wegen des Auftretens von Embolien (Amyx, 1987; CCAC, 1991). Specol wird zurzeit nur in der Forschung als Adjuvans verwendet. Kaninchen und Mäuse werden hauptsächlich subkutan immunisiert, eine intramuskuläre Applikation ist ebenfalls möglich (Boersma et al., 1992). Für Immunisierungen einer Maus werden für Proteine und Peptide pro Injektion 50-100 µg Antigen empfohlen. Boosterinjektionen sollten erst nach vorheriger Titerkontrolle erfolgen, ein bis zwei Boosterinjektionen reichen meist aus, um einen guten Antikörpertiter zu erzielen (Leenaars et al., 1995). Weitere Vorteile von Specol sind seine einfache und kostengünstige Herstellung sowie seine niedrige Viskosität, die die Injektion enorm erleichtert (Boersma et al., 1992).

Zu den wasserlöslichen Adjuvantien zählen Muramyl-Dipeptide, Cholera-toxin, Cytokine, Algen-Glucane und CpG-Oligonukleotide.

**CpG-Oligonukleotide** sind kurze bakterielle DNA-Fragmente, wobei CpG für die unmethylierten DNA-Bausteine Cytosin (C) und Guanin (G) mit der sie verbindenden Phosphatgruppe (p) steht. Unmethylierte CpG-Oligonukleotide kommen im Säugetier- und Menschengenom nicht vor, wohl aber in Bakterien. In Versuchen mit Mäusen haben sich kurze CpG-Moleküle als wirksame Immunadjuvantien erwiesen. Abgeleitet von mikrobiellen Strukturen signalisieren sie den Immunzellen Gefahr (Weiner, 2000). CpG-Oligonukleotide binden mit Hilfe des Adapter-Proteins „Myeloid differentiation marker 88“ (MyD88) an den intrazellulären Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9), wodurch B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen aktiviert werden. Dies führt zur Produktion von Chemokinen und Zytokinen (vor allem Interferon- $\gamma$ , IL 1, IL 6, IL 12 und IL 18, TNF- $\alpha$ ) und zur Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen, MHC-I und -II sowie TH-1 und TH-2-Zellen (Schwarz et al., 2003; Bauer und Wagner, 2002; Ahmad-Nejad et al., 2002; Liu et al., 2003; Kaisho und Akira, 2002). Aufgrund der Spezies-Spezifität des TLR 9 Rezeptors werden nicht alle CpG-Oligonukleotide von jeder Tierart erkannt (Klinman et al., 2004). Appliziert man das an ImmunEasy™ gekoppelte Immunisierungspeptid rSyb2 anderen Tierarten, werden die Immunisierungsergebnisse weniger zufriedenstellend ausfallen.

Auch bei oraler oder nasaler Applikation induzieren CpG-Oligonukleotide sowohl systemische Immunantworten (vor allem IgG2a- und TH1) als auch die lokale IgA-Produktion (Klinman et al., 2004). Bei intranasaler Applikation konnten Mc Cluskie et

al. (2000) in ihren Experimenten mit Mäusen zeigen, dass CpG-Oligonukleotide eine mit Choleratoxin B vergleichbare Wirkung haben. CpG-Oligonukleotide sind aber im Gegensatz zu Choleratoxin nicht toxisch und stellen somit in der Humanmedizin eine Alternative zu Choleratoxin als Adjuvans dar. Mc Cluskie et al. (2002) schlagen vor, zur Immunisierung von Mäusen mit CpG-Oligonukleotiden ein kombiniertes Impfschema aus mucosaler und parenteraler Applikation anzuwenden, da sie auf diesem Wege sowohl eine starke mucosale (IgA) als auch eine deutliche systemische (TH1-, TH2-Zellen, B-Zellen) Immunreaktion erreichten. Wichtige Vorteile der CpG-Oligonukleotide sind die kostengünstige Herstellung und die relativ nebenwirkungsarme Anwendung. Es wird kontrovers diskutiert, ob CpG-Oligonukleotide die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen, da sie die Produktion von IL-6 stimulieren und den Apoptose-Mechanismus von aktivierten Lymphozyten blockieren (Klinman et al., 2004). Mit CpG-Oligonukleotiden als Adjuvantien eröffnen sich neue Möglichkeiten bei der Herstellung von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten, aber auch bei der Bekämpfung von Allergien und Tumorerkrankungen, da CpG-Oligonukleotide gezielt die TH-1 vermittelte Immunantwort stimulieren (Ioannou et al., 2003; Lipford et al., 1997; Weiner, 2000). Chen et al. (2001) konnten in ihrem Experiment mit Mäusen nachweisen, dass CpG-Oligonukleotide in der Lage sind, B-Lymphom-Zellen in antigenpräsentierende Zellen umzuwandeln, die dann T-Zellen aktivieren, die ihrerseits eine Immunantwort gegen die B-Lymphomzellen einleiten.

**Algen-Glucane** sind Glucopyranose-Polymere aus dem Zytoplasma der Alge *Euglena gracilis*, einem Süßwasserflagellaten. Versetzt man Antigene mit diesen Glucanen, wird sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert. Sie bewirken die Freisetzung von IL 1 und IL 6 und aktivieren dadurch T-Zellen. Makrophagen besitzen spezifische Glucan-Rezeptoren, an die die Glucane binden und die Makrophagen stimulieren. Algen-Glucane erwiesen sich - als Adjuvans bei Tieren und Menschen angewandt - als völlig nebenwirkungsarm (Vogel und Powell, 1995) und werden bei Immunisierungen gegen Protozoen-Infektionen eingesetzt.

Die in dieser Studie angewandten Adjuvantien werden in eine ölhaltige und eine wasserlösliche Gruppe eingeteilt. Zu den ölhaltigen Adjuvantien zählen Specol und Algen-LPS-Öl-Adjuvans, zu den wasserlöslichen Adjuvantien gehören Aluminiumhydroxid, Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol), Algen-Glucan und CpG-Oligonukleotide.

## **2.4 Tierschutzaspekte bei der Anwendung von Adjuvantien bei Versuchstieren**

Adjuvantien stimulieren die Immunantwort bei Immunisierungen, rufen aber auch Nebenwirkungen wie lokale Anschwellungen, Hautnekrosen, Granulome, Abszesse, Fieber und sogar Embolien hervor. Dies führt bei den Versuchstieren zu Schmerzen, Leiden und Schäden (Hartinger, 1997). Um diese zu erkennen und zu beurteilen, ist während des Versuchs eine tägliche Kontrolle der Tiere von fachkundigem Personal anhand der Konzepte von Morton und Griffiths (1985) und Gärtner und Militzer (1990) zwingend erforderlich.

Bei der Messung der Körpertemperatur, die ein wichtiger Parameter bei der Erfassung systemischer Nebenwirkungen ist, treten jedoch Probleme auf. Die rektale Temperaturmessung, vor allem in der Startphase der Experimente mit jungen Tieren, erweist sich als schwierig, da eine korrekte Messung auf Grund der Anatomie der Mäuse (Einführen des Thermometers in den Anus) nicht möglich ist. Außerdem führen die dazu nötigen Fixationsmaßnahmen zu erheblicher Belastung der Tiere. Auf die rektale Temperaturmessung wird deshalb verzichtet.

Als Alternative wird in einer Vorstudie eine nicht invasive Meßmethode mit implantierbaren, temperatursensitiven Transpondern (TST) im Vergleich zur rektalen Messung bei der Maus getestet. Dazu werden die Transponder den Tieren subkutan zwischen die Schulterblätter appliziert und möglichst gleichzeitig die rektale und die Transpondertemperatur erfasst. Es stellt sich heraus, dass die Transponderwerte bei allen untersuchten Tierarten (außer dem Kaninchen) so stark variieren, dass kein Korrekturfaktor ermittelt werden kann. Somit sind die Transponder nicht zur Temperaturmessung bei Mäusen geeignet (Hartinger et al., 2003) und werden in dieser Studie nicht eingesetzt.

Schäden und Leiden an Tieren sind schwer feststellbar, da es für Tiere überlebenswichtig ist, diese zu kompensieren. Aus diesem Grund wird zur Beurteilung von Schmerzen, Leiden und Schäden die Messung von den „Akute-Phase-Proteinen“ Haptoglobin und Serum-Amyloid-A (SAA) herangezogen. Sie entstehen im Rahmen der „Akute-Phase-Reaktion“ (APR) (Dickhöfer, 2002).

Im Zusammenhang mit Adjuvantien zeigen Schmidt et al. (1999), dass bei Mäusen, die mit CpG-enthaltenden Oligonukleotiden immunisiert werden, ein signifikanter Anstieg an Serum-Amyloid-A nachweisbar ist und die Injektion von CpG-Oligonukleotiden die Freisetzung von IL 1, IL 6 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bewirkt. Diese Zytokine wiederum induzieren die Bildung von Serum-Amyloid-A in der Leber. Somit stellt der Serum-Amyloid-A-Anstieg im Blut einen Indikator für eine außerordentliche Aktivierung entzündlicher und immunologischer Prozesse bei Mäusen dar.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Tiere**

Die Untersuchungen dieser Studie wurden an weiblichen Balb/c-Inzucht-Mäusen (Balb/cAnN-CrlBr, Charles River, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Lieferung ca. fünf Wochen alt und wogen zwischen 12 g und 18 g. Die Versuchsreihe begann nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase.

Die Mäuse wurden in Gruppen zu 10 Tieren in Makrolon-Typ-III-Käfigen (Breite: 265 mm, Höhe: 150 mm, Tiefe: 420 mm, Bodenfläche: 825 cm<sup>2</sup>) unter konventionellen Bedingungen gehalten. Die Käfige waren mit Plastikhäuschen („Mouse House“, Tecniplast), Papierrollen und Zellstoffstreifen ausgestattet.

Die Raumtemperatur des Stalles betrug 23-24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 50-80 %. Die Tiere waren einem zwölfstündigen Tag/Nacht-Zyklus bei zwölfmaligem Luftwechsel/Stunde unterworfen.

Die Mäuse wurden mit pelletiertem Mäusefutter (Altromin Haltungsfutter für Ratten und Mäuse, Charge 0826, Altromin GmbH, Lage) ad libitum gefüttert und mit Trinkwasser ad libitum aus Plastikflaschen (Nippeltränke, 750 ml) versorgt.

Die Einstreu der Käfige (Hobelspäne dreiviertel Pedding, staubfrei, Ssniff, Niederlande) wurde einmal pro Woche gewechselt.

#### **3.2 Adjuvantien**

In der vorliegenden Studie wurden die ölhaltigen Adjuvantien Specol (ID-DLO, Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Niederlande) und Algen-LPS-Öl-Adjuvantien (Biotrend, Köln) sowie die wasserlöslichen Adjuvantien Imject<sup>®</sup> Alum (Aluminiumhydroxid) (Pierce Biotechnology via Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn), ImmunEasy<sup>™</sup> Mouse Adjuvant (CpG) (Qiagen GmbH, Hilden), AdjuPrime<sup>™</sup> Immune Modulator (Algen-Glucan) (Pierce Biotechnology via Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) und Diluvac forte ( $\alpha$ -Tocopherol) (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) verwendet.

#### **3.3 Antigen**

Als Immunisierungsgagens (Modellantigen) wurde ein synthetisches Peptid, das von dem Vesikelprotein Synaptobrevin 2 abgeleitet ist, verwendet (rSyb<sub>270-76</sub>). Das Oktamer NH<sub>2</sub>-CLQAGASQ-COOH (das N-ständige Cystein wurde zu Kopplungszwecken angefügt) bildet die Spaltstelle des Synaptobrevin 2, an der das Tetanustoxin angreift. Die Synthese und Kopplung des Peptids an die Transporterproteine bzw. an BSA wurde von der Firma Biotrend, Köln durchgeführt.

### 3.4 Antikörper

Zur Durchführung der Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) und der Western Blots wurde ein Peroxidase konjugierter Anti-Maus IgG Antikörper aus Kaninchen (Dianova, Hamburg) und ein Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Ziegen (Dianova, Hamburg) angewandt.

Der gegen das rekombinante Synaptobrevin 2 gerichtete polyklonale N-terminale Antikörper vom Kaninchen (RabN-term.-rSyb2-AK) wurde freundlicherweise vom Fachgebiet 4/3, Arbeitsgruppe „Entwicklung einer *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Tetanustoxizität“ des Paul-Ehrlich-Instituts in Langen zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung wurden Kaninchen analog mit dem Septamer-Peptid NH<sub>2</sub>-CLQAGASQ-COOH, gekoppelt an das Trägerprotein KLH, immunisiert.

### 3.5 Herstellung der Adjuvans/Antigen-Mischungen

In fünf Teile **Specol** wurden vier Teile wässriger Antigenlösung (= rSyb2<sub>70-76</sub> + KLH bzw. ChTxB in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, PBS) emulgiert und anschließend jedem Tier 200 µl subkutan injiziert.

Ein Teil Aluminiumhydroxid (**Imject<sup>®</sup> Alum**) wurde mit einem Teil wässriger Antigenlösung versetzt. Jede Maus erhielt 100 µl subkutan.

Zwei Teile Algen-LPS-Öladjuvans wurden mit einem Teil wässriger Antigenlösung versetzt und pro Tier wurden 200 µl subkutan injiziert.

Zwei Teile „ImmunEasy™ Mouse Adjuvant“ wurden in einem Teil wässriger Antigenlösung gelöst, und jedem Tier wurden 150 µl subkutan oder oral appliziert.

Es wurden 100 µg rSyb2<sub>70-76</sub> mit 2 mg AdjuPrime™ in 1 ml PBS gelöst. Danach wurden jeder Maus 100 µl dieser Lösung subkutan verimpft.

Zehn Teile Diluvac forte wurden mit einem Teil wässriger Antigenlösung versetzt, und pro Tier wurden 100 µl subkutan injiziert.

### 3.6 Übersicht zu den Tiergruppen und Immunisierungsschemata

Neben einer absoluten Kontrolle (Gruppe 0, kein Antigen, kein Adjuvans) wurden weitere Kontrollgruppen (nur Antigen + Carrier, kein Adjuvans) mitgeführt, Gruppe 1 erhielt (KLH-Syb2<sub>70-76</sub>), Gruppe 3 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub>).

In den weiteren Versuchsgruppen wurden die mit dem Hapten konjugierten Carrier KLH und ChTxB mit verschiedenen Adjuvantien eingesetzt:

Tiergruppen mit dem Carrier KLH waren Gruppe 2 (KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol),

Gruppe 4 (KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse Adjuvant), Gruppe 5 (KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™) und Gruppe 6 (KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans).

Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB waren Gruppe 7 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol),

Gruppe 8 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse Adjuvant), Gruppe 9 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™), Gruppe 10 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans),

Gruppe 11 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Imject<sup>®</sup> Alum) sowie Gruppe 12 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Diluvac forte).

Zusätzlich wurden zwei Gruppen oral immunisiert:

Gruppe 13 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub>) und Gruppe 14 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™ Mouse)



### 3.7 Immunisierungsverlauf

Die Tiergruppen wurden nach folgendem Schema immunisiert:

Versuchstag	Blutentnahme	Applikation	
		subkutan	oral
0	x	x im Schulterbereich	x
14			x
28	x	x an der rechten Körperseite	x
42			x
56	x	x an der linken Körperseite	x
70			x
84	x	-	-

An den Versuchstagen 28 und 56 wurde allen Mäusen unter Inhalationsnarkose Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Pro Gruppe konnten ca. 500-800 µl Serum gesammelt werden.

Am Tag 84 wurden die Tiere durch Herzpunktion unter Inhalationsnarkose mit Isofluran schmerzlos getötet. Es konnten pro Gruppe ca. 800-1000 µl Serum gewonnen werden.

Dieses Experiment wurde dreimal hintereinander durchgeführt. Da die drei Versuchsreihen vergleichbare Ergebnisse lieferten, wurde als Datengrundlage mit den jeweiligen Mittelwerten gearbeitet.

Weitere verwendete Materialien:

Pasteur-Pipetten (Volac, 150 mm, pre-plugged), Vacuetten (5 ml, greiner bio-one), Tuberkulinspritzen, Terumo Syringe „without needle“, 1 ml, Sterican-Einmalkanülen, 0,45x25 mm, (VWR, Darmstadt)

Tränenganganküle mit Knopf, gebogen, 0,7x30 mm, (Heiland, Deutschland)  
Isofluran Curamed® (Cura MED Pharma GmbH, Karlsruhe)

### **3.8 Klinische Beobachtungen**

Die klinische Untersuchung erfolgte an den Versuchstagen: -3, -2, -1, 0, 1, 3, 7, 8, 10, 14, 15, 17, 21, 22, 24, 28, 29, 31, 35, 36, 38, 42, 43, 45, 49, 50, 52, 56, 57, 59, 63, 64, 66, 70, 71, 73, 77, 78, 80, 84 in Anlehnung an die Richtlinien von Gärtner und Militzer (1990) und Morton und Griffiths (1985).

Es wurden folgende Parameter herangezogen:

- (1) Körpergewicht: Von den 10 Tieren einer jeden Gruppe wurden fünf Tiere mit Farbe (Pikrinsäure, VWR, Darmstadt) gekennzeichnet und an den oben genannten Versuchstagen auf einer Sartorius-Waage IP 65, (Göttingen) gewogen. Aus den Einzelwerten der Tiere einer Gruppe wurde das mittlere Gruppengewicht ermittelt.
- (2) Klinische Untersuchung:  
Spontanverhalten und Verhalten während der Untersuchung, Haarkleid (Anliegen und Glanz, Haarausfall), Nasenöffnung/Augen (Aussehen und Farbe), Anal-Vaginal-Öffnung (Aussehen, Farbe, Ausfluss) und Adspektion und Palpation der Injektionsstelle wurden untersucht und beurteilt. Des Weiteren erfolgte eine Kontrolle des Kot- und Urinabsatzes einzelner Tiere, da die Mäuse häufig spontan während der Untersuchung koteten oder urinierten. Der Untersuchungsablauf begann mit dem Öffnen des Käfigs, Entfernen der Plastikhäuschen und Fangen der Einzeltiere. Hierbei wurde beurteilt, ob Einzeltiere in der Gruppe auffällig waren, sich z.B. isolierten oder aus der Gruppe gedrängt wurden. Auch das Fangverhalten konnte beobachtet werden. Danach wurden die Einzeltiere auf die Waage gesetzt und das Greifen nach „festem Untergrund“ sowie das neugierige Erkunden der fremden Umgebung beobachtet und beurteilt. Als nächstes wurden die Einzeltiere in einen einstreulosen Käfig gesetzt, bis alle Tiere untersucht waren. Auch hier wurde das Verhalten in der neuen Umgebung beobachtet. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Mäuse wieder in ihren Käfig gesetzt.

### **3.9 Pathohistologische Untersuchung der veränderten Injektionsstellen**

Bei allen Tieren, die palpatorische Veränderungen am Injektionsort aufwiesen, entnahm man Proben zur histologischen Untersuchung.

Zunächst wurden die Gewebeproben mindestens 24 Stunden in 4 %igem Formalin (VWR, Darmstadt) fixiert. Anschließend wurden sie in Tissue-Tek-III-Kassetten (Medim, Gießen) zum Entwässern in den Einbettautomaten (STP-120 Microm, Walldorf) gelegt. In diesem Automaten wurden die Proben folgendermaßen behandelt: 2,0 Std. in Formalin, 1,0 Std. in Ethanol 50 %, 1,0 Std. in Ethanol 70 %, 1,0 Std. in Ethanol 90 %, 3,0 Std. in Ethanol 100 %, 3,0 Std. in Xylol und 4,0 Std. in Paraffin. Diese Arbeitsschritte fanden im Vakuum, gerührt bei 5 rpm, statt.

Anschließend wurden die Proben dem Automaten entnommen und in der Eingießstation (TBS 88 Medite, Burgdorf) in die entsprechenden Formen eingegossen (Eingießstation mußte ca. 3 Std. vorher angeschaltet werden, damit das Paraffin (VWR, Darmstadt) heiß wurde).

Die Proben mussten gut auskühlen. Danach wurden sie in das Rotationsmikrotom (Schlittenmikrotom HM430, Microm, Walldorf) eingespannt und in 4-µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden als nächstes in ein 42 °C warmes Wasserbad (Typ WB693, Vogel, Gießen) gelegt, um ein Glätten zu erreichen und um sie anschließend auf Objektträger (Super Frost Plus, Vogel, Gießen) aufziehen zu können. Die beschichteten Objektträger kamen nun für zwei Stunden bei 60 °C in einen Wärmeschrank (Memmert, Bad Schwalbach), um das verbliebene Paraffin zu verflüssigen und aus den Gewebeschnitten zu entfernen.

Scheren, Pinzetten, Skalpell und Pinsel zum Bearbeiten der Proben wurden von der Firma Aeskulap, Tuttingen bezogen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Gewebeschnitte nach folgendem Protokoll: 3 Minuten in Xylol; 2 Minuten in Propanol; 1 Minute in Ethanol 96 %; 1 Minute in Ethanol 70 %; 1 Minute in fließendem Wasser; 1 Minute in Aqua dest.; 2 Minuten in Papanicolaou 1b (Merck 1.09254 Hämatoxylinlösung); 2 Minuten in fließendem Wasser; 1 Minute in HCL-Ethanol (576 ml ETOH + 524 ml Aqua dest. + 2,8 ml HCL 37 %), eigene Herst.; 1 Minute in fließendem Wasser; 1 Minute in Ethanol 70 %; 1 Minute in Eosin-Lösung (Stammlösung: Eosin Merck 15935 20 g ad 1000 ml Aqua dest. + 1000 ml EtOH 96 %, Gebrauchslösung: 300 ml Aqua dest. + 300 ml EtOH 96 % + 300 ml Stammlösung); 1 Minute in Ethanol 70 %; 2 Minuten in Ethanol 96 %; 2 Minuten in Propanol und 3 Minuten in Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan (VWR, Darmstadt) eingedeckt und mit Deckgläschen versehen. Unter dem Mikroskop betrachtet, stellen sich Zellkerne blau, Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rot dar.

### **3.10 Immunoassay (Bestimmung der rSyb2-Antikörper)**

Die spezifischen Serumantikörper wurden mit Hilfe eines „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) nachgewiesen. Dafür banden die gebildeten Serumantikörper an das an eine Mikrotiterplatte gebundene Antigen. Nach einer Inkubationszeit bildeten sich Immunkomplexe, die dann mit einem enzymmarkierten Anti-Antikörper detektiert wurden. Nach Zugabe eines Substrates zum

Reaktionsansatz wurden die entstandenen Immunkomplexe durch Farbumschlag messbar.

Die Durchführung des ELISA erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zuerst wurde eine rSyb2<sub>70-76</sub>-Stammlösung in einer Konzentration von 1 mg Peptid gebunden an BSA (Bovines Serum Albumin) pro ml Aqua dest. angesetzt.

Zur Beschichtung der Maxi-Sorp 96-Loch-Mikrotiter-Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden 50 µl pro Vertiefung (engl.: well) der Peptidlösung (20 µg rSyb2<sub>70-76</sub> gebunden an BSA pro ml Aqua dest) aufgetragen. Anschließend kamen die Platten über Nacht bei 37 °C in einen Inkubator (Steri-Cult 200 Incubator, Labotect, Göttingen).

Am nächsten Tag wurde das überschüssige, nicht gebundene Peptid mit einer Waschlösung (PBS, 0,05 % Tween 20 (PBS-Tween (0,05 %))) (200 µl/well) entfernt.

Zum Blockieren noch freier Bindungsstellen auf der Platte wurden 200 µl/well einer Blockierlösung aus 5 % Trockenmilch gelöst in PBS-Tween (0,05 %) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Die Platten wurden einmal mit 200 µl/well der Waschlösung abgespült.

Die Verdünnung der Mäuseseren erfolgte in 5 %iger Trockenmilch-PBS-Lösung.

Die nach der Immunisierung gewonnenen Seren wurden 1:2, 1:5, 1:10, 1:30 verdünnt. Die Seren der Gruppen 0, 2 und 4 (erste Boosterung) wurden 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000 verdünnt, alle übrigen Seren (erste Boosterung) 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300.

Das Serum der Gruppe 0 wurde nach der zweiten Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000 verdünnt, die Seren der Gruppen 2 und 4 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000 und alle übrigen Seren 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300. Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal auf die Platten aufgetragen (50 µl/well), gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler (Thermo-Star, SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim). Anschließend erfolgte eine dreimalige Reinigung der Platten mit 200 µl/well PBS-Tween 20. Zur Detektion wurde ein peroxidasekonjugierter Anti-Maus-Antikörper vom Kaninchen 50 µl/well, 1:3000 in 5 % Trockenmilch-PBS-Lösung auf die Platte aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde erneut dreimal mit 200 µl/well PBS-Tween 20 gewaschen. Zur Herstellung der Substratlösung für eine Platte wurden 83,5 µl TMB (Stammlösung: 6 mg/ml in Ethanol), 4,5 ml Aqua dest., 0,5 ml Natrium-Acetat-Puffer (90,2 g/l, pH 5,5) und 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> benötigt. Es wurden davon 50 µl/well aufgetragen und die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur in abgedunkelter Umgebung inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/well) gestoppt. Die Substratfärbung wurde mit einem ELISA-Platten-Photometer (SLT Rain Bow, SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Die ELISAs zum Nachweis von Serumantikörpern gegen die Carrier KLH und ChTxB wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei KLH in einer Konzentration von 10 µg/ml Citratpuffer und ChTxB in einer Konzentration von 0,03 µg/ml PBS als Antigen zur Beschichtung der ELISA-Platten eingesetzt wurde. Die Seren der Gruppen mit dem Carrier KLH wurden 1:1000, 1:3000 und 1:10000 verdünnt, die Seren der Gruppen mit ChTxB 1:10000 und 1:30000 verdünnt.

Der Nachweis der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A wurde mit Hilfe der Testkits und der Versuchsprotokolle der Firma Bio Repair GmbH, Sinsheim durchgeführt.

Das Prinzip des Haptoglobin-Testkit basiert auf der Erhaltung der Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins in Gegenwart von Haptoglobin. Hämoglobin besitzt eine eigene Peroxidase-Aktivität, die bei niedrigem pH-Wert gehemmt wird. Bei diesem Versuch wurde eine Hämoglobin-Lösung mit niedrigem pH auf eine Maxi-Sorp 96-Loch-Mikrotiter-Platte aufgetragen. Anschließend wurden die Seren der Mäuse hinzugefügt. Enthielten diese Haptoglobin, entstanden auf der Platte Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe. Wurden nun Substrat und Farbstoff hinzugegeben, konnte die Peroxidase-Aktivität anhand des Farbumschlags gemessen werden. Je höher die Konzentration von Haptoglobin in der Probe, desto höher war die Anzahl der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe und korrelierend dazu auch die Erhöhung der Peroxidase-Aktivität. Daher konnte der Haptoglobin-Spiegel im Serum direkt bestimmt werden, wenn man ihn mit einer bekannten Haptoglobin-Standardreihe verglich.

Bei dem Testkit zum Nachweis von Serum-Amyloid-A handelte es sich um einen Sandwich-ELISA. Die Seren der Mäuse wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte aufgetragen, die mit einem SAA-spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichtet war. War in den Seren SAA enthalten, wurde es von dem Antikörper gebunden. Anschließend fügte man einen zweiten, Peroxidase-konjugierten, monoklonalen Antikörper, der gegen SAA gerichtet war, hinzu. Sämtliches, in den Proben enthaltene SAA befand sich nun zwischen beiden Antikörpern. Wurden Substrat und Farbstoff hinzugegeben, konnte man die Peroxidase-Aktivität anhand des Farbumschlags messen. Je mehr SAA im Serum enthalten war, desto höher war die Peroxidase-Aktivität. Daher konnte die SAA-Konzentration im Serum direkt bestimmt werden, wenn man sie mit einer bekannten SAA-Standardreihe verglich.

### **3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot (Immunoblot)**

Die SDS-PAGE und der Immunoblot wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Gele für die SDS-PAGE wurden in der Gelelektrophoreseapparatur (BioRad, München) gegossen und 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trenngel (15 % Acrylamid im Gel) bestand aus 7,5 ml 30 % Acrylamid, 3,75 ml 1,5M Trispuffer (pH 8,8), 0,15 ml 10 % SDS, 3,5 ml Aqua dest., 10 µl Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS). Das Sammelgel setzte sich aus 5 ml 4 % Acrylamid, 10 µl TEMED und 30 µl 10 % APS zusammen.

Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen, die Probenkämme eingesetzt und das Gel wurde ca. 20 min polymerisiert.

Zur Vorbereitung der Proben für den Western Blot zum Nachweis von Serumantikörpern gegen das durch Tetanustoxin gespaltene rSyb2, das ungespaltene rSyb2 und gegen das an BSA gekoppelte Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> wurde ein Grundansatz, bestehend aus Tetanustoxin (1 µg) + β-Mercaptoethanol (100 mM) + PBS, für die Toxinreduktion hergestellt. Es erfolgte eine Inkubation des Ansatzes 30 min bei 37 °C auf einem Schüttler (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde rSyb2 (211 ng/µl) hinzugegeben und die Probe bei 37 °C über Nacht in einem Schüttler (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Ungespaltene Synaptobrevin wurde mit PBS versetzt und ebenfalls bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag fand das Ausfällen der Proteine aus den Proben mit Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) statt. Dazu wurden 75 µl der Proben, 925 µl PBS und je 10 µl 15 %iges Deoxycholat (DOC) zusammen pipettiert und die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 250 µl 50 %iges TCA dazugegeben, und es erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C in Eis. Es schloss sich eine einstündige Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 17860 g (Biofuge 15R, Heraeus Instruments, Osterode) an. Nach Abnehmen des Überstands wurde 1 ml Aceton/HCl (200:1, eiskalt) hinzugefügt und eine Stunde bei 4 °C und 17860 g zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand abgenommen, 200 µl 1x reduzierter Probenpuffer hinzugegeben, 5 min bei 95 °C im Schüttler (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg) inkubiert und anschließend eine Minute bei 17860 g zentrifugiert. Die Aufbewahrung der fertigen Proben erfolgte bei 4 °C.

Das Auftrennen der Proben im SDS-Gel fand in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini Protean® II, BioRad, München) mit Elektrophoresepuffer statt. Die Proben (rSyb2<sub>70-76</sub> gekoppelt an BSA 1 mg/ml PBS), BSA (1 mg/ml PBS), rekombinantes ungespaltenes rSyb2 und durch Tetanustoxin (Calbiochem, Bad Soden, 250 µg/ml) gespaltenes rekombinantes Synaptobrevin 2 (rSyb2<sub>frag.</sub>) wurden mit 10 µl pro Bahn und der Molekulargewichtsmarker (BioRad, München) wurde mit 2,5 µl pro Bahn aufgetragen.

Dann wurde die Elektrophoresekammer an das Power Supply (Power Pac 300, Firma BioRad, München) angeschlossen und pro Gel eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Farbfront lief bis ca. 0,5 cm vor Gelende (ca. 45 min). Anschließend erfolgte die Durchführung des Western Blot: Zuerst equilibrierte man die Gele ca. 5 min im Transferpuffer (Western Blot-Puffer); dann legte man drei Lagen im Transferpuffer getränkten Filterpapier (6,5 x 10 cm, Whatman) auf die Western Blot-Apparatur (LTF Labortechnik GmbH + CoKG, Wasserburg, Bodensee), fügte eine Nitrocellulosemembran (6,5 x 10 cm, Protran BA 85, 0,45 µm, Schleicher + Schuell, Dassel) hinzu, deckte das Ganze mit drei Filterpapierlagen ab und schloss die Apparatur an das Power Supply an (150 mA/Gel, Laufzeit 45 min).

Zur Absättigung der Nitrocellulosemembran (eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler) wurde Tris-Buffered-Saline-Lösung (TBS) verwendet, die 5 % Magermilchpulver enthielt. Danach erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (Mäuseserum) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler.

Das Serum der Gruppen 2 und 4 wurde 1:500, alle übrigen Mäuseseren wurden 1:250 verdünnt. Die Positiv-Kontrolle Ra-N-term.-rSyb2-AK wurde in einer Verdünnung von 1:750 eingesetzt. Die Verdünnungslösung bestand aus TBS und BSA (10 %).

Es folgte mehrmaliges Waschen der Membran mit TBS und mit TBS 0,05 % Tween 20 sowie eine einstündige Inkubation des Zweitantikörpers (Anti-Maus-AK vom Kaninchen, Peroxidase konjugiert und Anti-Kaninchen-AK von der Ziege, Peroxidase konjugiert) bei Raumtemperatur in einem Schüttler; dabei wurde der Anti-Maus-AK 1:1000 in TBS und der Anti-Kaninchen-AK 1:3000 in TBS verdünnt eingesetzt. Danach wurde die Membran mehrmals gewaschen. Im Anschluß daran wurden eine Substratlösung (45 µl Wasserstoffperoxid in 75 ml TBS) und ein Farbreagensatz (45 mg BioRad-Farbreagensatz + 15 ml eiskaltes Methanol) zum Sichtbarmachen der Enzymreaktion hinzugefügt.

### **3.12 Chemikalien für ELISA und Western Blot**

Alle verwendeten Chemikalien, die im Folgenden nicht näher beschrieben werden, wurden von der Firma VWR, Darmstadt bezogen und entsprachen dem biochemischen Standard.

Choleratoxin B-Untereinheit (ChTxB), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate (Tween 20) und 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine (TMB) wurden von der Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen bezogen.

Bovines Serum Albumin (BSA) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) und rekombinantes Synaptobrevin 2 (rSyb2) (hergestellt von der Arbeitsgruppe „Entwicklung einer *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Tetanustoxizität“ des Paul-Ehrlich-Instituts) wurden freundlicherweise vom Fachbereich 4/3, Arbeitsgruppe „Entwicklung einer *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Tetanustoxizität“ des Paul-Ehrlich-Instituts in Langen zur Verfügung gestellt.

Die Trockenmilch (Skim Milk) stammte von Difco, Detroit, USA.

Phosphate-Buffered-Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium enthielt 137,0 mM Natriumchlorid, 2,6 mM Kaliumchlorid, 1,4 mM Kaliumhydrogenphosphat, 8,1 mM di-Natriumhydrogenphosphat und der pH-Sollwert betrug 7,0-7,2.

Tris-Buffered-Saline (TBS) enthielt 50,0 mM Tris, 146,3 mM Natriumchlorid, ~ 650 ml/200 l HCl 37 % und der pH-Sollwert betrug 7,4.

10x Stammlösung Citrate-Phosphate Buffer (pH 5,0) bestand aus  $C_6H_8O_7 \times 1 H_2O$  (Riedel-de Haen 33114),  $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$  (Riedel-de Haen 30435) und Aqua dest.

N,N'-Methylenbisacrylamid Electrophoresis Purity Reagent (30 % Acrylamid/Bis Solution, 37,5:1 (2,6 % C)), 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), Molekulargewichtsmarker und HRP Color Development Reagent (Farbreagenz für Western Blot) wurden von der Firma BioRad, München bezogen.

4 % Acrylamidlösung enthielt 0,5M Tris, pH 6,8; 10 % SDS; Aqua dest. und 30 % Acrylamidlösung.

Reduzierter Probenpuffer (1x konzentriert) bestand aus 0,5 M Tris, pH 6,8; SDS; Bromphenol blue 0,1 % (w/v) in Ethanol abs.; Glycerol; Aqua dest. und 2-Merkapto-Ethanol.

10x konzentrierter Elektrophorese-Stamm-puffer setzte sich aus 30,3 g/l Tris, 144,2 g/l Glycine und 10,0 g/l SDS zusammen.

Zur Herstellung von 5x konzentriertem Transfer-Stamm-puffer für Western Blot mit einem pH-Wert von 8,3 wurden 125 mM Tris, 960 mM Glycin, 5 mM EDTA, 0,25 % SDS und 20 % Methanol benötigt.

### **3.13 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte im Sinne einer deskriptiven Datenanalyse.

Zur Beschreibung der erhobenen Werte wurden folgende statistische Kennzahlen angegeben: n (Anzahl der Beobachtungen), Mittelwert, Standardabweichung,

Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil sowie das Maximum. Sofern statistische Tests für den Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen verwendet wurden, wurden generell 2-seitige p-Werte angegeben; p-Werte < 0,05 wurden als statistisch auffällig bezeichnet. Zur Berechnung wurde SAS, Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary NC, 1999-2001 verwendet.

Die Entwicklung des Körpergewichts in den verschiedenen Impfgruppen wurde nach Tagen und Impfgruppe stratifizierter statistischer Kennzahlen beschrieben. Aus jeweils drei Einzelmessungen vor der Impfung wurde das Ausgangsgewicht der Tiere geschätzt. Für die einzelnen Gruppen wurde der Verlauf der Mittelwerte über die Zeit graphisch dargestellt. Mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests (Sachs, 2004; Hartung et al., 1985) wurde untersucht, ob sich die Körpergewichte am Ende der Behandlungsperiode zwischen den Gruppen unterscheiden. Im Falle eines statistisch auffälligen Unterschiedes wurden die einzelnen Impfgruppen jeweils in einem Wilcoxon-Test mit der Kontrolle verglichen. Zur Einhaltung eines Fehlers 1. Art von 0,05 wurden die p-Werte der Paarvergleiche nach Bonferroni-Holm adjustiert. Die Auswertung der Körpergewichtsänderung zu Tag 84 gegenüber dem Ausgangswert vor der Immunisierung erfolgte analog der Auswertung der Körpergewichte zu Tag 84. In entsprechenden Graphiken wurden sowohl das Gewicht am Tag 84 als auch die Änderung gegenüber dem Ausgangswert mit Hilfe von Boxplots dargestellt. Zur Untersuchung des akuten Einflusses der Impfung auf den Gewichtsverlauf wurde für jeden der drei Impftage (0, 28 und 56) die Änderung des Körpergewichts zum Folgetag ebenfalls mit Boxplots dargestellt. Mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Im Falle der Ablehnung der globalen Nullhypothese und wenn kein Unterschied zwischen den Impfgruppen festgestellt wurde, wurden die einzelnen Impfgruppen jeweils in einem Wilcoxon-Test mit der Kontrolle verglichen, wobei die p-Werte der Paarvergleiche nach Bonferroni-Holm adjustiert wurden.

Die Beschreibung der Antikörperproduktion erfolgte für die Zeitpunkte Immunisierung sowie 1. und 2. Boosterung zum einen durch die Angabe von nach Impfgruppe und Verdünnung stratifizierten statistischen Kennzahlen, zum anderen wurde der Verlauf der mittleren Extinktionen in Abhängigkeit von der Verdünnung dargestellt. Für die Verdünnung 1:30 wurde mittels eines gemischten linearen Modells („repeated measurement model“) untersucht, inwieweit sich die Zeitverläufe der Antikörperbildung bei den verschiedenen Adjuvantien unterschieden. Anhand eines Tests nach Dunnett wurden die mittleren Extinktionen der einzelnen Adjuvantien mit denen der Kontrolle verglichen (SAS, 1999-2001; Sachs, 2004; Hartung et al., 1985).



### 3.14 Beschreibung eines Boxplots anhand eines Musters

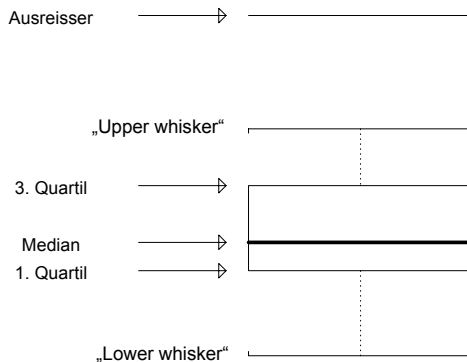


Abbildung 1: Muster einer Boxplot-Darstellung

Die etwas stärkere horizontale Linie im Inneren des Rechtecks (Box) beschreibt den Median der Daten. Die untere Begrenzung des Rechtecks ist durch den Wert des ersten Quartils, die obere Grenze durch den Wert des dritten Quartils der Daten gegeben. Die Höhe des Rechtecks entspricht damit dem Interquartilsabstand (d.h. der Differenz ‚3. Quartil – 1. Quartil‘). Die nach oben bzw. unten aus dem Rechteck herausragenden Antennen (Whisker) entsprechen oben dem Kleinsten der beiden Werte ‚Median + 1,5 x Interquartilsabstand‘ bzw. dem ‚Maximum der Daten‘, unten dem Größten der beiden Werte ‚Median – 1,5 x Interquartilsabstand‘ bzw. dem ‚Minimum der Daten‘. Werte außerhalb des Bereiches der Antennen können als Ausreißer interpretiert werden und werden durch horizontale Striche dargestellt.

## 4. Ergebnisse

Für diese Studie wurden insgesamt 450 Balb/c-Mäuse eingesetzt, 420 Tiere befanden sich im Immunisierungsexperiment, 30 Mäuse dienten als unbehandelte Kontrollgruppe. Die Studie wurde in drei aufeinander folgenden Versuchsreihen angeordnet, die unabhängig voneinander nach demselben Schema (siehe Kapitel Material und Methoden, Punkt 3.7) durchgeführt wurden. Da die drei Experimente vergleichbare Daten lieferten, wurden sie zur statistischen Auswertung zusammengefasst. Um Effekte durch Injektionen, die nicht adjuvansbedingt sind, zu erkennen, wurde neben den Kontrollen ohne Adjuvans eine weitere Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung mitgeführt.

### 4.1 *Klinische Beobachtungen*

#### 4.1.1 Entwicklung des Körpergewichts während der Versuchsreihen

In jeder Gruppe (n=10) wurden zufällig je fünf Tiere zum Verfolgen des Körpergewichts ausgewählt und mit Farbe markiert. Sie wurden an den im Kapitel Material und Methoden, Punkt 3.8 aufgelisteten Versuchstagen gewogen, um aus diesen Daten das mittlere Gruppengewicht zu ermitteln.

Der Verlauf der Mittelwerte der Körpergewichte der einzelnen Gruppen während der gesamten Versuchsreihe wurde graphisch dargestellt. Um die Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde die Darstellung nach den Carrierproteinen getrennt gezeigt. Ebenso wurden die oral immunisierten Gruppen gesondert aufgeführt. Als Kontrolle diente jeweils die unbehandelte Gruppe 0. Die statistischen Kennzahlen (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum) für das Körpergewicht (stratifiziert nach Gruppe und Versuchstag) sind dem Anhang zu entnehmen.

Im Folgenden wurde die Entwicklung des Körpergewichts der Tiere während des Versuchs beschrieben. Die Beobachtungen bezogen sich auf den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Das Körpergewicht der Mäuse lag zu Beginn der Studie bei 14-18 g.

Die Kontrollgruppe 0 zeigte während der Versuchsreihe eine gleichmäßige Zunahme um insgesamt 5,0 g.

##### a) Tiergruppen mit dem Carrier KLH (Abbildung 2a):

Bei Gruppe 1 erhöhte sich das mittlere Körpergewicht während des Versuchsablaufs kontinuierlich um 4,7 g, bei Gruppe 2 um 5,8 g.

Bei Gruppe 4 trat am Tag nach der Immunisierung ein Gewichtsverlust um 1,3 g auf, danach nahmen die Tiere gleichmäßig zu. Am Tag nach der ersten Boosterung war eine Gewichtsreduktion von 1,0 g festzustellen, anschließend erfolgte eine kontinuierliche Gewichtszunahme bis zum Tag nach der zweiten Boosterung, an dem das mittlere Körpergewicht der Gruppe erneut um 1,4 g sank. Bis zum Versuchsende

hatten die Tiere dies wieder ausgeglichen. Die Gewichtszunahme von Versuchsbeginn bis -ende betrug 4,4 g. Gruppe 5 und Gruppe 6 wiesen eine gleichmäßige Gewichtszunahme während der gesamten Versuchsreihe um 4,2 g bzw. 4,6 g auf.

b) Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB (Abbildung 2b):

Bei Gruppe 3 kam es zu einer stetigen Gewichtszunahme von Versuchsbeginn bis zum Tag nach der zweiten Boosterung, an dem ihr mittleres Körpergewicht um 0,4 g sank. Anschließend nahmen die Tiere wieder gleichmäßig zu. Während des Beobachtungszeitraums zeigte die Gruppe einen Gewichtsanstieg um insgesamt 4,5 g.

Bei Gruppe 7 war während des Versuchs eine kontinuierliche Gewichtszunahme um 3,9 g zu beobachten.

Gruppe 8 wies am Tag nach der Immunisierung einen Gewichtsverlust von 1,4 g auf, der in den folgenden Tagen wieder ausgeglichen wurde. Am Tag nach der ersten Boosterung kam es zu einer Gewichtsreduktion um 0,9 g. Im weiteren Versuchsverlauf steigerten die Tiere ihr Gewicht bis zum Tag nach der zweiten Boosterung, an dem sich das mittlere Körpergewicht um 1,2 g verringerte. Bis Versuchsende nahmen die Mäuse erneut zu.

Während des gesamten Versuchs war eine Gewichtszunahme von 4,2 g festzustellen.

Von Versuchsbeginn bis -ende betrug die Gewichtszunahme bei Gruppe 9 3,6 g, bei Gruppe 10 4,4 g, bei Gruppe 11 4,1 g und bei Gruppe 12 3,6 g.

c) Oral immunisierte Tiergruppen (Abbildung 2c):

Gruppe 13 und Gruppe 14 nahmen während des gesamten Versuchsverlaufes gleichmäßig um 3,5 g bzw. 4,0 g zu.

Die Abbildungen 2a + 2b stellen die Änderungen der Körpergewichte der subkutan immunisierten Tiergruppen im Zeitverlauf anhand der Mittelwerte über die Zeit, stratifiziert nach den Carrierproteinen dar; Abbildung 2c zeigt die Änderungen der Körpergewichte der oral immunisierten Tiergruppen. Die Impfstage sind durch Pfeile gekennzeichnet.

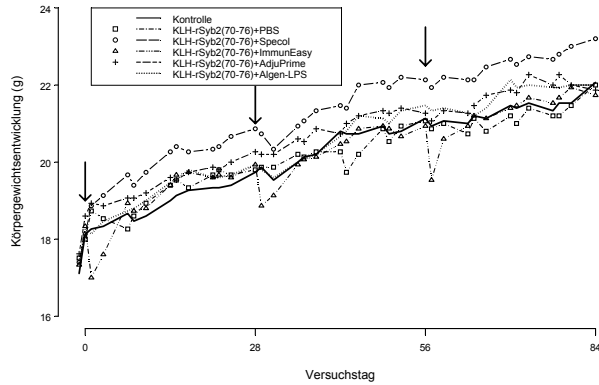


Abbildung 2a: Tiergruppen mit dem Carrier KLH

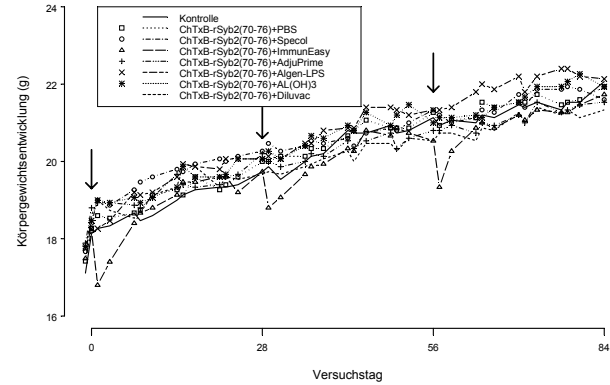


Abbildung 2b: Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB

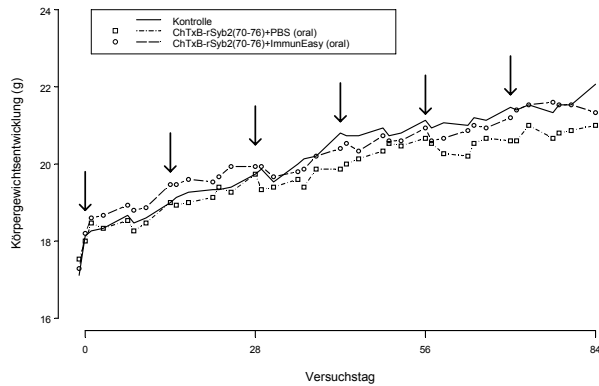


Abbildung 2c: Oral immunisierte Tiergruppe

Die Unterschiede bei der Körpergewichtszunahme der Tiergruppen vom Ausgangswert bis zum letzten Versuchstag waren statistisch unauffällig ( $p = 0,186$ , Kruskal-Wallis-Test). Obwohl Gruppe 4 und Gruppe 8 nach jeder Impfung einen statistisch signifikanten Gewichtsabfall aufzeigten, glichen die Tiere dies anschließend wieder durch gleichmäßig ansteigende Körpergewichte aus, so dass diese Gewichtsreduktionen am Ende der Versuchsreihe keine statistisch auffälligen Abweichungen hervorriefen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Erstimmunisierung und die anschließenden Boosterungen einen akuten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der einzelnen Tiergruppen hatten; als Vergleich diente die Kontrollgruppe. Dazu beurteilte man die Änderungen der Körpergewichte von Tag 0 auf Tag 1 (Immunisierung), von Tag 28 auf Tag 29 (1. Boosterung) und von Tag 56 auf Tag 57 (2. Boosterung). Ein Kruskal-Wallis-Test verdeutlichte die unterschiedlichen Einflüsse, die die verschiedenen Adjuvantien auf die akute Gewichtsentwicklung der Tiergruppen sowohl nach der Immunisierung als auch nach den Boosterungen ( $p < 0,001$ ) hatten. Bei Paarvergleichen mit der Kontrollgruppe waren diese Unterschiede allerdings nur für die Gruppen 4 und 8 statistisch auffällig ( $p_{\text{adjustiert}} < 0,05$ ). In beiden Gruppen wurde bei unterschiedlichem Carrierprotein das gleiche Adjuvans ImmunEasy™ verwendet.

Abbildung 3a-c (Boxplot-Darstellung): Änderungen der mittleren Körpergewichte der Tiergruppen nach der Immunisierung, die Gruppen werden nach Carrierproteinen getrennt betrachtet. Die oralen Gruppen werden gesondert dargestellt, da sie im Gegensatz zu den subkutan immunisierten Gruppen alle 14 Tage geboostert werden.

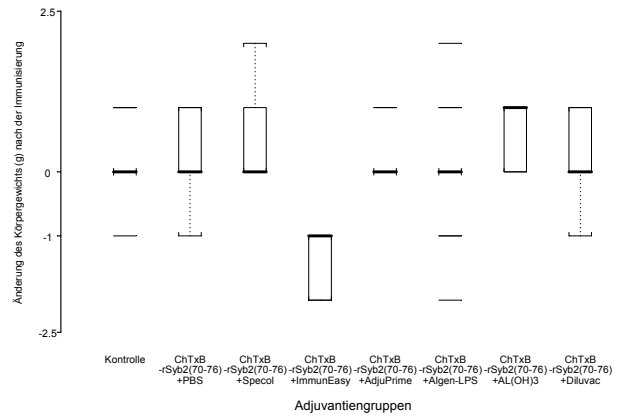
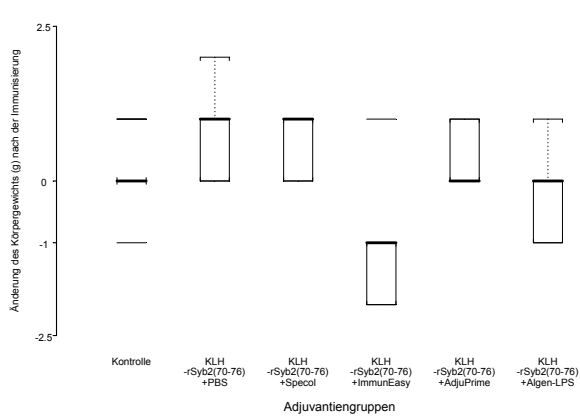


Abbildung 3a: Tiergruppen mit dem Carrier KLH nach der Immunisierung

Abbildung 3b: Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB nach der Immunisierung

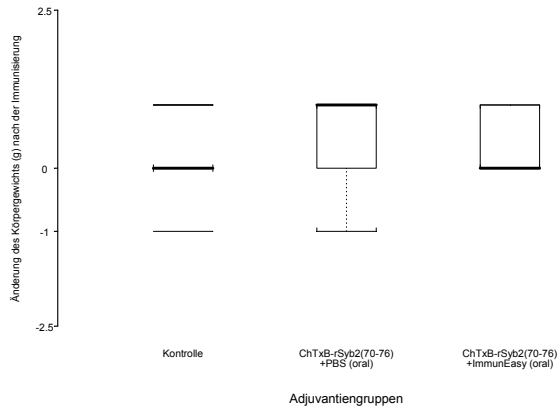


Abbildung 3c: Oral immunisierte Tiergruppen nach der Immunisierung

Abbildung 4a-c (Boxplot-Darstellung): Änderungen der mittleren Körpergewichte der Tiergruppen nach der ersten Boosterung, die Gruppen werden nach Carrierproteinen getrennt betrachtet. Die oralen Gruppen werden gesondert dargestellt, da sie im Gegensatz zu den subkutan immunisierten Gruppen alle 14 Tage geboostert werden.

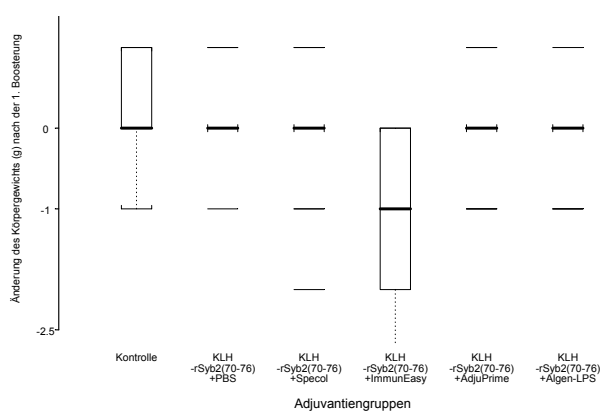


Abbildung 4a: Tiergruppen mit dem Carrier KLH nach der ersten Boosterung

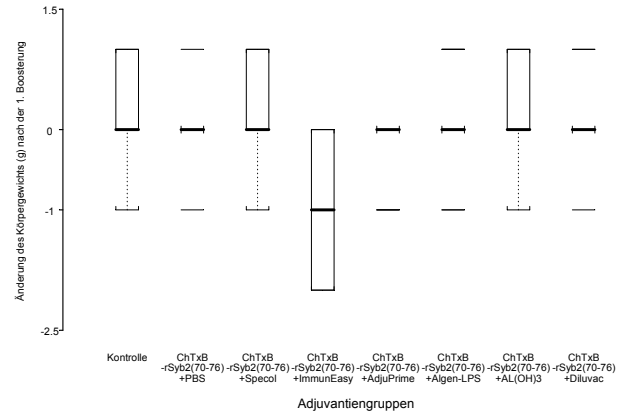


Abbildung 4b: Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB nach der ersten Boosterung

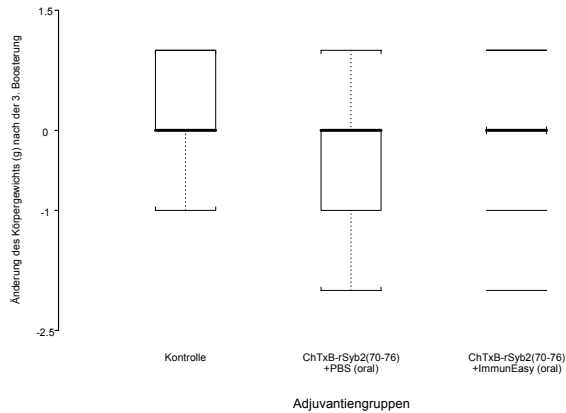


Abbildung 4c: Oral immunisierte Tiergruppen nach der dritten Boosterung

Abbildung 5a-c (Boxplot-Darstellung): Änderungen der mittleren Körpergewichte der Tiergruppen nach der zweiten Boosterung, die Gruppen werden nach Carrierproteinen getrennt betrachtet. Die oralen Gruppen werden gesondert dargestellt, da sie im Gegensatz zu den subkutan immunisierten Gruppen alle 14 Tage geboostert werden.

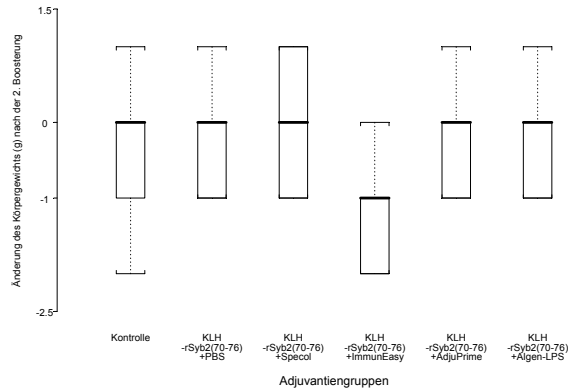


Abbildung 5a: Tiergruppen mit dem Carrier KLH nach der zweiten Boosterung

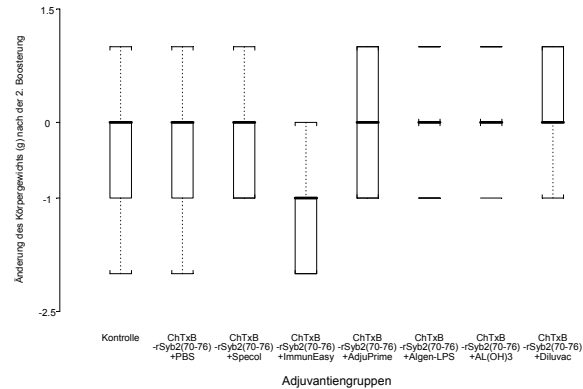


Abbildung 5b: Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB nach der zweiten Boosterung

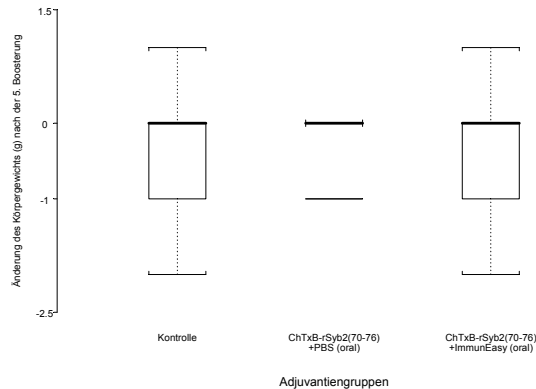
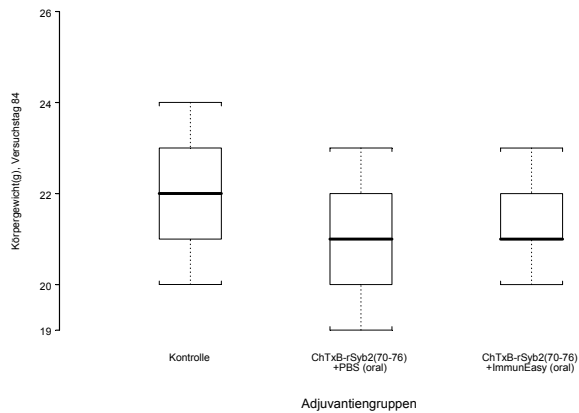
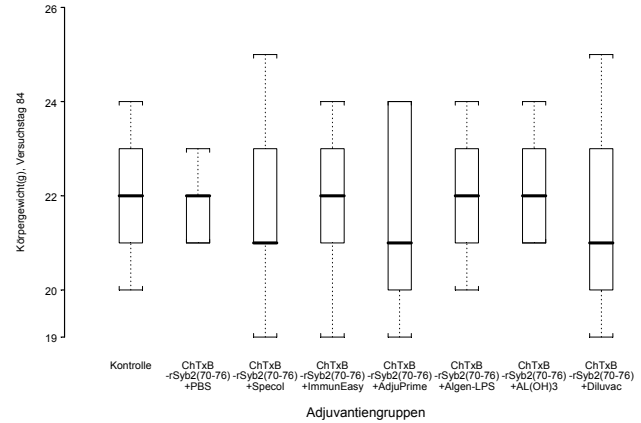
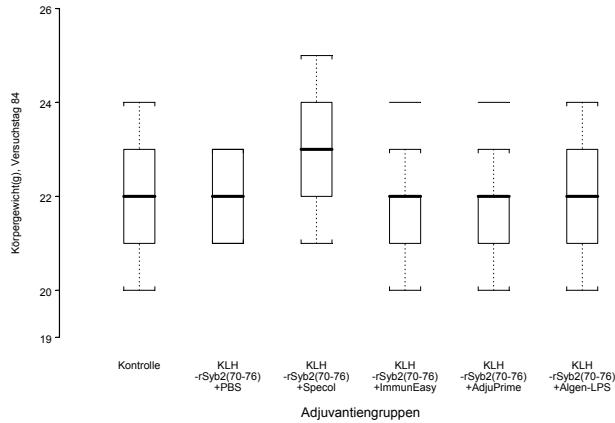


Abbildung 5c: Oral immunisierte Tiergruppen nach der fünften Boosterung



Am Ende der Versuchsreihen (Tag 84) lagen die Körpergewichte der einzelnen Tiergruppen nahe beieinander. Mit 21,0 g hatte Gruppe 13 das niedrigste Körpergewicht, das höchste Endgewicht mit 23,2 g erreichte Gruppe 2. Ein Kruskal-Wallis-Test über die Körpergewichtswerte am letzten Versuchstag wies mit  $p = 0,032$  auf Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen hin, anschließende Paarvergleiche zeigten für keine Impfgruppe statistisch signifikante Unterschiede beim Körpergewicht zur Kontrollgruppe ( $p_{\text{adjustiert}} > 0,05$  für alle 14 Paarvergleiche).

Die folgenden Box-Plot-Darstellungen (Abbildung 6a-c) zeigen das mittlere Körpergewicht der Tiergruppen am Tag 84, d.h. am Versuchsende. Um die Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden sie nach Carrierproteinen getrennt betrachtet (Abbildung 6a und 6b). Ebenso wurden die oralen Gruppen gesondert aufgeführt (Abbildung 6c).



### **4.1.2 Allgemeinbefinden und Verhalten der Tiere**

Die Untersuchung der Mäuse erfolgte nach dem im Kapitel Material und Methoden, Punkt 8 beschriebenen Schema. Als Kontrolle diente die unbehandelte Gruppe 0. Sie zeigte zu jedem Untersuchungstag ein völlig ungestörtes Allgemeinbefinden sowie ein natürliches Verhalten. Die Mäuse ruhten zusammen in den „Mouse Houses“ oder liefen im Käfig umher und nahmen Futter und Wasser auf. Öffnete man den Käfig und entfernte das „Mouse House“, so wurden sie munter und neugierig; beim Herausnehmen versuchten die Tiere zu fliehen. Setzte man sie auf die Waage und anschließend bis zum Beenden der Untersuchung aller Tiere in den leeren Käfig, so erkundeten sie interessiert die neue Umgebung, spontaner Kot- und Urinabsatz konnte beobachtet werden.

Gruppe 1, Gruppe 3, Gruppe 5, Gruppe 9, Gruppe 11, Gruppe 12, Gruppe 13 und Gruppe 14 wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten ein ähnliches Verhalten wie die Kontrollgruppe auf.

Das Verhalten der Tiere in Gruppe 2 war bis zwei Tage nach den Immunisierungen deutlich ruhiger als an den übrigen Tagen. Die Tiere lagen als Gruppe zusammengekauert in ihrem „Mouse House“, wehrten sich kaum beim Herausnehmen und blieben sowohl auf der Waage als auch im leeren Käfig regungslos sitzen. Futter- und Wasseraufnahme waren offensichtlich herabgesetzt, alle Mäuse hatten struppiges, glanzloses Fell.

Ab dem dritten Tag nach den Immunisierungen verhielten sich die Tiere normal und auch das Fell der Mäuse war wieder glatt anliegend und glänzend.

Die Tiere aus den Gruppen 4 und 7 wiesen dieses gestörte Allgemeinverhalten wie unter Gruppe 2 beschrieben an den Tagen 1-3 nach den Immunisierungen auf, die Tiere aus den Gruppen 6 und 10 an den Tagen 1 und 2. In Gruppe 8 wurde diese Verhaltensänderung an den vier Tagen nach den Immunisierungen beobachtet.

### **4.1.3 Makroskopisch sichtbare Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle**

Die Beschreibung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle erfolgt in tabellarischer Form. Die Veränderungen wurden durch Adspektion und Palpation untersucht und die Größe (Länge, Breite und Höhe) mit Hilfe eines Lineals ausgemessen (Angaben in Millimetern). Für die nicht immunisierte Kontrollgruppe 0 sowie für die oral immunisierten Gruppen 13 und 14 konnten keine abweichenden Befunde erhoben werden.

Von den subkutan immunisierten Tiergruppen waren bei den Gruppen 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 12 ebenfalls keine lokalen Veränderungen zu beobachten. Die deutlichsten Veränderungen konnten bei zwei Tieren der Gruppe 10 festgestellt werden (Tabelle 1a-d).

Bei Gruppe 2 hatten die Lokalreaktionen zwar ein geringeres Ausmaß, es waren jedoch eindeutig mehr Tiere (26,67 %) als in den anderen Gruppen betroffen. Die lokalen Veränderungen traten sowohl im Nacken- wie im Schulterbereich auf.

In Gruppe 4 kam es bei zwei Tieren zu Veränderungen im Nacken- und im Schulterbereich, in Gruppe 6 und 8 wurde jeweils nur bei einer Maus eine Lokalreaktion in der Schultergegend gefunden (Tabelle 1a-d).

Tabelle 1a

Tiergruppen	Applikation	Ausbreitung der Lokalreaktionen	Größe (mm)	Konsistenz der Lokalreaktionen	Tierzahl insgesamt	Tierzahl mit Lokalreaktionen	Tiere mit Lokalreaktionen (%)	Pathologische Befunde
<b>Kontrolle</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-
<b>KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-
<b>KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol</b>	s.c.	Schulter Nackebereich	L:3-5 B:5-10 H:3-5	teilweise weich und verschieblich, teilweise derb und nicht verschieblich	30	8	26,67	abgegrenzte stecknadelkopf- bis bohngroße Abszesse in der Haut und Unterhaut, teils im Fettgewebe
<b>ChTxB- rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-

Tabelle 1a: Zusammenfassende Darstellung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Injektionsstellen inklusive pathologischer Befunde. Untersucht wurden die Ausbreitung, Größe und Konsistenz der Lokalreaktionen. Es werden die Tierzahlen der Lokalreaktionen absolut und in Prozent angegeben, ausgehend von 30 Einzeltieren pro Gruppe. L = Länge; B = Breite; H = Höhe

Tabelle 1b

Tiergruppen	Applikation	Ausbreitung der Lokalreaktionen	Größe (mm)	Konsistenz der Lokalreaktionen	Tierzahl insgesamt	Tierzahl mit Lokalreaktionen	Tiere mit Lokalreaktionen (%)	Pathologische Befunde
<b>KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™</b>	s.c.	Schulter Nackengebireich	L:1-3 B:1-3 H:1-3	derb und nicht verschieblich	30	2	6,67	abgegrenzte stecknadelkopf- bis erbsengroße Abszesse in der Haut und Unterhaut, teils im Fettgewebe
<b>KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-
<b>KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans</b>	s.c.	Schulter	L:2-3 B:2-3 H:2-3	derb und nicht verschieblich	30	1	3,33	ein abgegrenzter stecknadelkopfgroßer Abszess in der Haut und Unterhaut
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-

Tabelle 1b: Zusammenfassende Darstellung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Injektionsstellen inklusive pathologischer Befunde. Untersucht wurden die Ausbreitung, Größe und Konsistenz der Lokalreaktionen. Es werden die Tierzahlen der Lokalreaktionen absolut und in Prozent angegeben, ausgehend von 30 Einzeltieren pro Gruppe. L = Länge; B = Breite; H = Höhe

Tabelle 1c

Tiergruppen	Applikation	Ausbreitung der Lokalreaktionen	Größe (mm)	Konsistenz der Lokalreaktionen	Tierzahl insgesamt	Tierzahl mit Lokalreaktionen	Tiere mit Lokalreaktionen (%)	Pathologische Befunde
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™</b>	s.c.	Schulter	L:1-2 B:1-2 H:1-2	derb und nicht verschieblich	30	1	3,33	ein abgegrenzter stecknadelkopfgroßer Abszess in der Haut und Unterhaut
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans</b>	s.c.	Schulter	L:10 B:10 H:10	derb und nicht verschieblich	30	2	6,67	abgegrenzte stecknadelkopf- bis erbsengroße Abszesse in der Haut und Unterhaut
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Imject® Alum</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-
<b>ChTxB-rSyb270-76 + Diluvac forte</b>	s.c.	-	-	-	30	-	-	-

Tabelle 1c: Zusammenfassende Darstellung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Injektionsstellen inklusive pathologischer Befunde. Untersucht wurden die Ausbreitung, Größe und Konsistenz der Lokalreaktionen. Es werden die Tierzahlen der Lokalreaktionen absolut und in Prozent angegeben, ausgehend von 30 Einzeltieren pro Gruppe. L = Länge; B = Breite; H = Höhe

Tabelle 1d

Tiergruppen	Applikation	Ausbreitung der Lokalreaktionen	Größe (mm)	Konsistenz der Lokalreaktionen	Tierzahl insgesamt	Tierzahl mit Lokalreaktionen	Tiere mit Lokalreaktionen (%)	Pathologische Befunde
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + PBS</b>	oral	-	-	-	30	-	-	-
<b>ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™</b>	oral	-	-	-	30	-	-	-

Tabelle 1d: Zusammenfassende Darstellung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Injektionsstellen inklusive pathologischer Befunde. Untersucht wurden die Ausbreitung, Größe und Konsistenz der Lokalreaktionen. Es werden die Tierzahlen der Lokalreaktionen absolut und in Prozent angegeben, ausgehend von 30 Einzeltieren pro Gruppe. L = Länge; B = Breite; H = Höhe

#### 4.1.4 Sektionsbefunde

Am Tag 84 wurden die Tiere nach Inhalationsnarkose mit Isofluran Curamed® durch Herzpunktion schmerzlos getötet.

Die makroskopisch sichtbar veränderten Injektionsstellen wurden photographisch dokumentiert und die Veränderungen in Tabelle 1a-d beschrieben.

Die deutlichsten Veränderungen fanden sich in den Gruppen 2 und 4. Die stecknadelkopf- bis bohnen großen und abgekapselten Umfangsvermehrungen waren von weißlicher Farbe, fluktuierten bei Palpation und beim Anschneiden entleerte sich ein gelbliches, zähes Sekret. Die Veränderungen dehnten sich über Haut und Unterhaut bis ins Fettgewebe aus (Abbildung 7). Im umliegenden Gewebe war ein geringgradiges, lokales Ödem zu beobachten. Gruppe 2 hatte mit 26,67 % betroffener Mäuse die größte Anzahl Tiere mit Lokalreaktionen zu verzeichnen.

Gruppe 6 und Gruppe 8 wiesen bei jeweils einem Tier einen abgegrenzten, stecknadelkopf großen, weißlich-gelben Abszess ohne Inhalt in Haut und Unterhaut auf. Das umliegende Gewebe war makroskopisch ohne besonderen Befund. Bei Gruppe 10 fanden sich bei zwei Tieren abgekapselte stecknadelkopf- bis erbsengroße Abszesse in Haut und Unterhaut. Sie waren weißlich, fluktuierend, und es entleerte sich beim Anschneiden ein weißlich-gelbliches Sekret. Im umliegenden Gewebe konnten makroskopisch keine besonderen Befunde erhoben werden.

Im Anschluss an die Sektion wurde das Gewebe der Injektionsstellen (einschließlich der Axillarilymphknoten) entnommen und histologisch untersucht.

#### 4.1.5 Pathohistologische Befunde

Alle makroskopisch sichtbar veränderten Injektionsstellen wurden histologisch untersucht, und es erfolgte anhand der erhobenen Befunde eine Einteilung in starke und geringgradige Entzündungsreaktionen.

##### a) Starke Entzündungsreaktionen

###### **Gruppe 2 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol):**

Im histologischen Bild zeigten sich teils abgekapselte, teils infiltrative Entzündungen in der Unterhaut, Muskulatur und im Fettgewebe. Zahlreiche, große, dickwandige Zysten (Vakuolen), die Reste des Impfmaterials und Granulozyten enthielten, waren zu erkennen. Die Zystenwand bestand aus einer inneren Granulozytenschicht und aus einer äußeren Schicht, die sich vorwiegend aus Plasmazellen, Fibroblasten und Fibrozyten zusammensetzte.

Außerhalb der Vakuolen war eine deutliche Infiltration des umliegenden Gewebes mit überwiegend neutrophilen Granulozyten, Histozyten, Myelozyten und Lymphozyten zu erkennen. Vereinzelt sah man Riesenzellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten sowie bindegewebige Reaktionen in Form von Fibroblastenansammlungen. Des Weiteren wurden Mastzellen mit mehr oder weniger stark gefüllten Granula beobachtet. Dies war das Bild einer starken Entzündungsreaktion (Abbildung 8a + b).

###### **Gruppe 4 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™):**

Diese Gruppe wies ein ähnliches histologisches Bild wie Gruppe 2 auf. Auch hier fanden sich multiple, deutlich abgekapselte Vakuolen mit ihrem typischen zellulären Aufbau.



Das Gewebe zwischen den einzelnen Zysten war gekennzeichnet durch eine starke granulozytäre Entzündung, wobei das Zellbild hier von Lymphozyten und Histozyten geprägt war. Auch in diesem Fall konnte man eine deutliche Entzündungsreaktion feststellen.

#### **b) Geringgradige Entzündungsreaktionen**

##### **Gruppe 6 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans):**

In dieser Gruppe befanden sich kleine, dünnwandige Vakuolen im Unterhautgewebe. Bei der Anwendung von Algen-LPS-Öladjuvans war eine zahlenmäßig viel geringere Vakuolenbildung festzustellen. Das umliegende Gewebe zeigte jedoch eine deutliche zelluläre Reaktion. Es war durchsetzt von zahlreichen Lymphozyten, Myelozyten und Fibroblasten. Vereinzelt konnte man Mastzellen, eosinophile Granulozyten, Plasmazellen und neutrophile Granulozyten erkennen.

Insgesamt war diese entzündliche Reaktion, verglichen mit Gruppe 2 und 4, als mäßig einzustufen.

##### **Gruppe 8 (ChTxB- rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™) und Gruppe 10 (ChTxB- rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans):**

Diese beiden Gruppen wiesen die geringsten histologischen Veränderungen auf. Es waren wenige kleine, dünnwandige Vakuolen im Unterhautgewebe zu beobachten und im umliegenden Gewebe fand nur eine schwache zelluläre Reaktion, bestehend aus neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Histozyten, statt. Hierbei handelte es sich um das histologische Bild einer geringgradigen Entzündung (Abbildung 9a + b).

Alle untersuchten Axillarlymphknoten waren histologisch unauffällig.

Die Abbildung 7 zeigt am Beispiel der Maus Nr. 5 aus der Tiergruppe 2 (Specol) die nach der Sektion erhobenen makroskopisch sichtbaren Veränderungen am Injektionsort. Es handelt sich hierbei um einen bohnen großen, abgekapselten, weißlich-gelblichen Abszess in der Unterhaut. Das umliegende Gewebe weist ein geringgradiges, lokales Ödem auf. Die Abbildung 7a zeigt das histologische Bild der makroskopisch veränderten Injektionsstelle der Maus Nr. 5 der Tiergruppe 2 (Specol). Auf dieser Abbildung ist die größte Impfvakuole, die Reste des Impfmaterials und Granulozyten enthält, zu sehen. Um die Vakuole herum befindet sich ein breiter entzündlicher Saum mit zahlreichen kleinen Vakuolen.



Abbildung 7: Maus 5 der Impfgruppe 2 (Specol):  
Subkutaner Knoten an der Impfstelle der linken  
Brustwand (mit Pfeil gekennzeichnet).

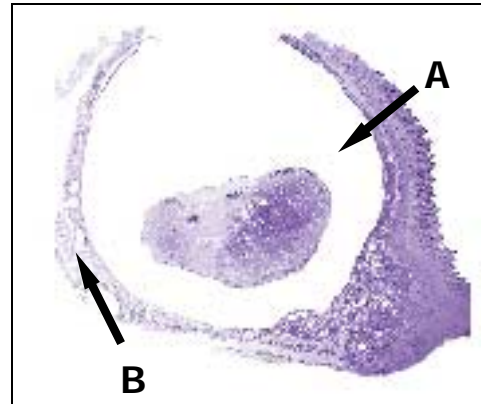


Abbildung 7a: Maus Nr. 5 der Impfgruppe 2 (Specol):  
Histologisches Bild der Impfstelle (H&E x 7,8):  
A: größte Impfvakuole mit Resten des Impfmaterials,  
B: breiter entzündlicher Saum um die Impfvakuole  
mit zahlreichen kleineren Vakuolen

Die Abbildungen 8a + b zeigen die pathologisch-histologischen Befunde der makroskopisch veränderten Injektionsstelle der Maus Nr. 5 der Tiergruppe 2 (Specol). Auf diesen Abbildungen ist eine deutliche Entzündungsreaktion des Gewebes mit zahlreichen Vakuolen, die Reste des Impfmaterials und Granulozyten enthalten, sowie eine starke Infiltration mit Lymphozyten, Epitheloidzellen und Mastzellen zu erkennen.

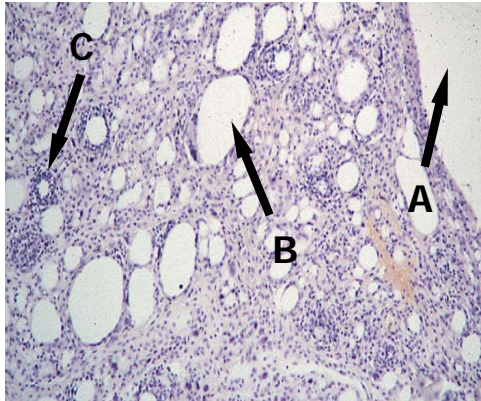


Abbildung 8a: Maus Nr. 5 der Impfgruppe 2 (Specol):  
 Histologisches Bild der Impfstelle (H&E x 62,5):  
 A: größte Impfvakuole, B: kleinere Impfvakuole,  
 C: perivaskuläre, lymphatische Infiltration

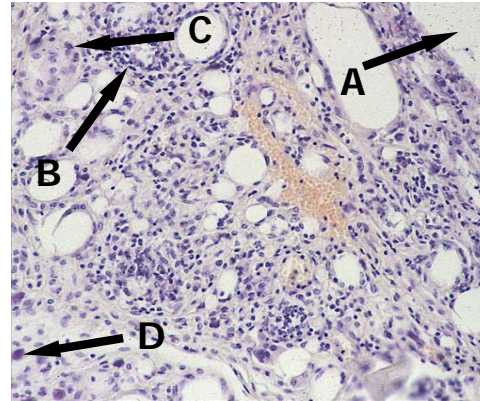


Abbildung 8b: Maus Nr. 5 der Impfgruppe 2 (Specol):  
 Histologisches Bild der Impfstelle (H&E x 125):  
 A: größte Impfvakuole, B: perivaskuläre, lymphatische Infiltration,  
 C: Epitheloidzelle, D: Mastzelle

Die Abbildungen 9a + 9b zeigen die pathologisch-histologischen Befunde der makroskopisch veränderten Injektionsstelle der Maus Nr. 2 der Tiergruppe 10 (Algen-LPS-Öladjuvans). Auf der Abbildung 9a ist eine große Impfvakuole zu sehen. Um die Vakuole herum befindet sich ein dünner Saum aus Entzündungszellen. Auf der Abbildung 9b ist eine geringe Entzündungsreaktion des Gewebes mit einer dünnwandigen Vakuole sowie eine geringe Infiltration des umliegenden Fettgewebes und der Muskulatur mit Lymphozyten und Epitheloidzellen zu erkennen.

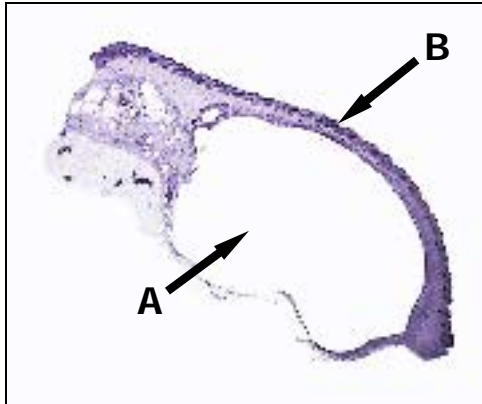


Abbildung 9a: Maus Nr. 2 der Impfgruppe 10 (Algen-LPS-Öladjuvans):  
 Histologisches Bild der Impfstelle (H&E x 7,8):  
 A: große Impfvakuole, B: dünner entzündlicher Saum um die Impfvakuole

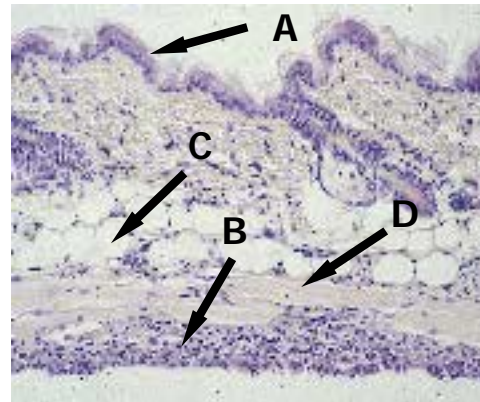


Abbildung 9b: Maus Nr. 2 der Impfgruppe 10 (Algen-LPS-Öladjuvans):  
 Histologisches Bild der Impfstelle (H&E x 62,5):  
 A: äußere Haut, B: dünner entzündlicher Saum um die Impfvakuole,  
 C: Fettgewebe, D: Muskulatur

## **4.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit der Adjuvantien**

### **4.2.1 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Peptid rSyb<sub>270-76</sub>**

Zur Bestimmung des Antikörpergehaltes (IgG) in den Mäuseseren wurde allen Gruppen unter Inhalationsnarkose an den Versuchstagen 28 und 56 Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen, am Tag 84 wurden die Tiere durch Herzpunktion entblutet.

Die Serumantikörper wurden unter Verwendung eines ELISA mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Maus IgG (IgG-spezifisch) und 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine (TMB) als Färbereagenz bestimmt. Die Verdünnung der Mäuseseren erfolgte wie im Material- und Methodenteil Punkt 3.10 beschrieben. Nach der Farbreaktion wurden die Extinktionen in einem ELISA-Platten-Photometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Aus den erhaltenen Extinktionswerten der verschiedenen Tiergruppen wurden Mittelwerte gebildet und diese graphisch dargestellt, wobei die Gruppen nach Carrierproteinen getrennt abgebildet und die oral immunisierten Tiergruppen gesondert betrachtet wurden. Die Werte mit Bezug auf die Käfiggruppen sowie die Mittelwerte mit Standardabweichungen sind dem Anhang zu entnehmen.

#### **a) Tiergruppen mit dem Carrier KLH (Abbildung 10a-c):**

Gruppe 1 (PBS) zeigte nach der Immunisierung sowie nach der ersten und zweiten Boosterung keine messbare Antikörperproduktion. Die Extinktionswerte lagen bei jeder Verdünnungsstufe nahe bei denen der Gruppe 0.

Die Immunisierung führte bei der Gruppe 2 (Specol) zu einer starken Antikörperproduktion. Nach der ersten Boosterung kam es zu einem sichtbaren Anstieg der Serumantikörper, der in Verdünnungsstufe 1:30 maximal ausgeprägt war. Der Antikörpergehalt war noch bis zur Verdünnung 1:1000 deutlich nachweisbar. Verglichen mit der ersten Boosterung führte die zweite Boosterung insgesamt zu einem leichten Abfall der Serumantikörper.

Bei Gruppe 4 (ImmunEasy™) konnte nach der ersten Immunisierung eine sehr starke Antikörperbildung in allen Verdünnungsstufen nachgewiesen werden. Die hier gemessenen Extinktionswerte lagen deutlich über denen der anderen Gruppen. Die erste Boosterung führte zu einer weiteren leichten Verstärkung der Antikörperproduktion. Nach der zweiten Boosterung kam es insgesamt zu einem leichten Abfall der Serumantikörper. Die hohen Extinktionswerte blieben bis zur Verdünnungsstufe 1:1000 nahezu konstant, erst ab 1:3000 fielen sie leicht ab.

In Gruppe 5 (AdjuPrime™) konnte nach der ersten Immunisierung keine messbare Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte lagen bei jeder Verdünnungsstufe nahe bei denen der Gruppe 0. Nach der ersten Boosterung wurde eine Antikörperbildung bis zur Verdünnungsstufe 1:100 ermittelt. Nach der zweiten Boosterung war in jeder Verdünnungsstufe eine Verstärkung der Antikörperbildung zu beobachten.

Bei Gruppe 6 (Algen-LPS-Öladjuvans) war nach der Erstimmunisierung eine sehr geringe Antikörperbildung in Verdünnung 1:5 und 1:10 festzustellen. Nach der ersten Boosterung

konnte ein Anstieg der Antikörperproduktion jedoch nur in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 gesehen werden. Nach der zweiten Boosterung kam es in jeder Verdünnungsstufe zu einer weiteren Verstärkung der Antikörperbildung.

b) Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB (Abbildung 11a-c):

Gruppe 3 (PBS) zeigte nach der ersten Immunisierung und der ersten Boosterung eine schwache Antikörperproduktion in den Verdünnungsstufen 1:2-1:10, die in der Verdünnung 1:30 stark abfiel. Nach der zweiten Boosterung fand in den Verdünnungsstufen 1:5 und 1:10 ein Abfall in der Antikörperbildung statt. Ab einer Verdünnung von 1:30 befanden sich die Extinktionswerte im Bereich der Kontrollgruppe.

Bei Gruppe 7 (Specol) war nach der Erstimmunisierung ein geringer Anstieg der Serumantikörper im ELISA festzustellen, der allerdings schon bei Verdünnung 1:10 stark absank und bei Verdünnungsstufe 1:30 im Wertebereich der Kontrollgruppe lag. Nach der ersten Boosterung war eine etwas stärkere Reaktion im ELISA zu beobachten, die sich bis zur Verdünnung 1:30 hielt. Ab Verdünnung 1:100 lagen die Extinktionen dann im Wertebereich der Kontrollgruppe. Die Extinktionswerte nach der zweiten Boosterung unterschieden sich nur unwesentlich von denen nach der ersten Boosterung.

Bei Gruppe 8 (ImmunEasy™) konnte nach der ersten Immunisierung eine mäßige Antikörperproduktion festgestellt werden. Nach der ersten Boosterung wurde ein messbarer Anstieg der Antikörperbildung beobachtet, der mit fortschreitender Verdünnungsstufe langsam sank. Nach der zweiten Boosterung kam es zu einem Abfall der Antikörpertiter in den Verdünnungen 1:5 bis 1:30. Ab Verdünnungsstufe 1:100 lagen die gemessenen Extinktionswerte im Bereich der Kontrollgruppe.

Bei Gruppe 9 (AdjuPrime™) konnte nach der ersten Immunisierung und der ersten Boosterung in den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 eine geringe Antikörperbildung gemessen werden. Die Extinktionswerte für die Verdünnung 1:30 lagen jedoch bereits wieder im Bereich der Kontrollgruppe. Nach der zweiten Boosterung konnte man in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 eine geringe Verstärkung der Antikörperbildung sehen. Die Extinktionswerte für die folgenden Verdünnungen lagen wiederum im Bereich der Kontrollgruppe.

Gruppe 10 (Algen-LPS-Öladjuvans), 11 (Imject® Alum) und 12 (Diluvac forte) zeigten nach der Erstimmunisierung in der Verdünnung 1:2 eine sehr geringe Antikörperbildung. Bei den Gruppen 10 und 11 fielen die Werte bei Verdünnung 1:10 wieder ab, bei Gruppe 12 geschah dies jedoch schon in der Verdünnungsstufe 1:5. Aus diesem Grund kann man der Gruppe 12 keine signifikante Antikörperproduktion zuschreiben. Gruppe 10, 11 und 12 wiesen nach der ersten und zweiten Boosterung in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 eine leichte Antikörperproduktion im ELISA auf, die jedoch schon ab der Verdünnungsstufe 1:30 im Wertebereich der Kontrollgruppe lag. In den Gruppen 10-12 wurde demnach keine signifikante Antikörperproduktion festgestellt.

c) Oral immunisierte Tiergruppen (Abbildung 12a-c)

Die oral immunisierten Gruppen 13 (PBS) und 14 (ImmunEasy™) ließen nach der ersten Boosterung in den Verdünnungen 1:2 und 1:5 eine geringe Antikörperproduktion im ELISA erkennen. In den folgenden Verdünnungsstufen lagen die Extinktionswerte jedoch im Bereich der Kontrollgruppe, so dass hier keine signifikante Antikörperbildung stattfand.

Nach der dritten und fünften Boosterung konnte in den Gruppen 13 und 14 keine Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte lagen bei jeder Verdünnungsstufe nahe bei denen der Gruppe 0.

Abbildung 10a-c: ELISAs zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Antikörpertiter gegen rSyb2<sub>70-76</sub> der einzelnen Gruppen mit dem Carrier KLH in Abhängigkeit vom Adjuvans für die Immunisierung, die erste und zweite Boosterung (Serenverdünnung für die Immunisierung 1:2, 1:5, 1:10 und 1:30, für die erste Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 und 1:1000 und für die zweite Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000 und 1:3000, Coating-Antigen rSyb2<sub>70-76</sub> 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Tiergruppen werden nach Carrier getrennt aufgeführt. Die oral immunisierten Gruppen werden gesondert betrachtet, da sie im Gegensatz zu den subkutan immunisierten Gruppen alle 14 Tage geboostert werden.

**Diagramme der Tiergruppen mit dem Carrier KLH:**

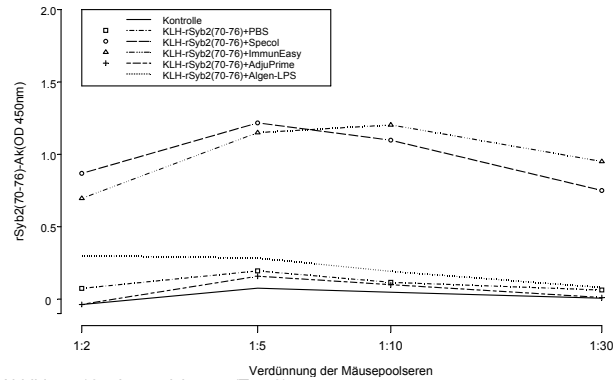


Abbildung 10a: Immunisierung (Tag 0)

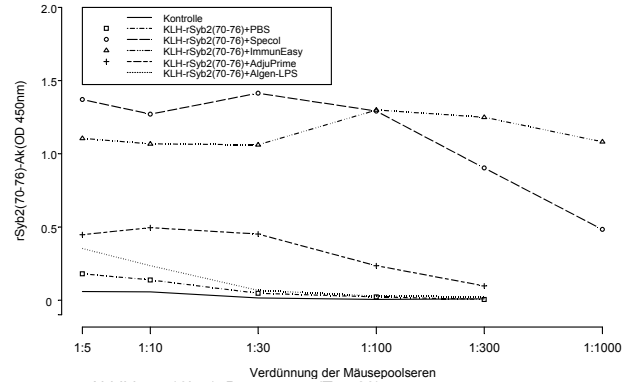


Abbildung 10b: 1. Boosterung (Tag 28)

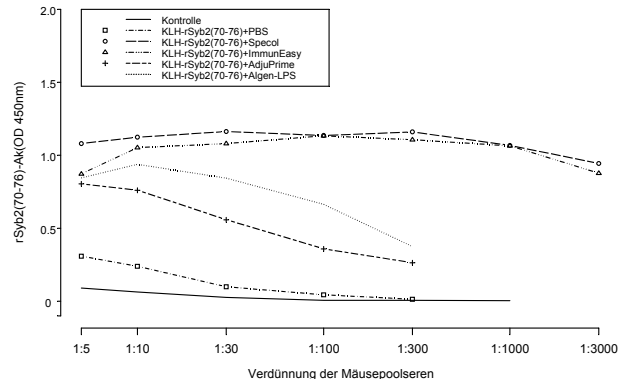


Abbildung 10c: 2. Boosterung (Tag 56)



Abbildung 11a-c: ELISAs zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Antikörpertiter gegen rSyb2<sub>70-76</sub> der einzelnen Gruppen mit dem Carrier ChTxB in Abhängigkeit vom Adjuvans für die Immunisierung, die erste und zweite Boosterung (Serendilddünnung für die Immunisierung 1:2, 1:5, 1:10 und 1:30, für die erste Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100 und 1:300 und für die zweite Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 und 1:1000, Coating-Antigen rSyb2<sub>70-76</sub> 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Tiergruppen werden nach Carrier getrennt aufgeführt. Die oral immunisierten Gruppen werden gesondert betrachtet, da sie im Gegensatz zu den subkutan immunisierten Gruppen alle 14 Tage geboostert wurden.

Diagramme der Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB:

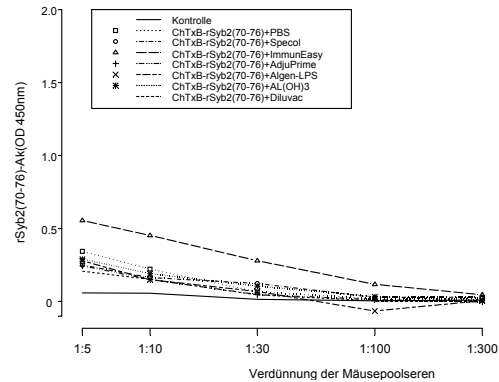
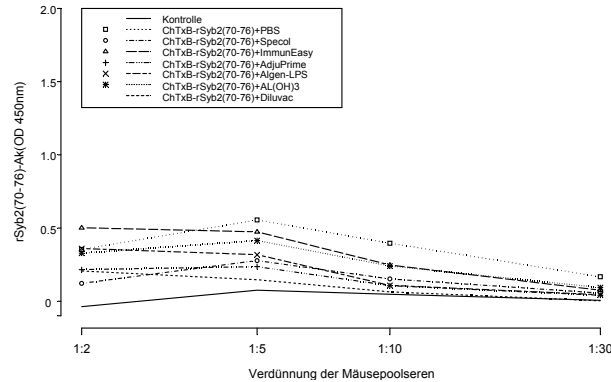


Abbildung 11a: Immunisierung (Tag 0)

Abbildung 11b: 1. Boosterung (Tag 28)

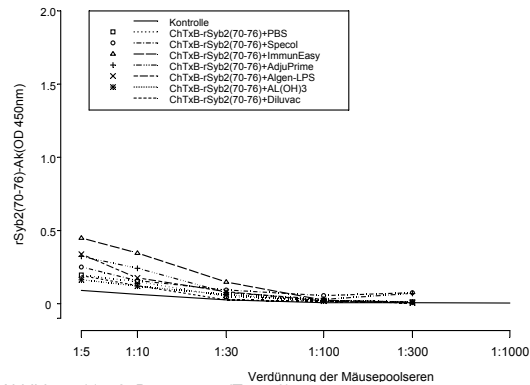


Abbildung 11c: 2. Boosterung (Tag 56)

Abbildung 12a-c: ELISAs zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Antikörpertiter gegen rSyb2<sub>70-76</sub> der oral immunisierten Gruppen in Abhängigkeit vom Adjuvans für die Immunisierung, die dritte und fünfte Boosterung (die oral immunisierten Gruppen werden alle 14 Tage geboostert), (Serendilddung für die Immunisierung 1:2, 1:5, 1:10 und 1:30, für die dritte Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100 und 1:300 und für die fünfte Boosterung 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300 und 1:1000, Coating-Antigen rSyb2<sub>70-76</sub> 0,5 µg je well in 50 µl PBS).

Diagramme der oral immunisierten Tiergruppen:

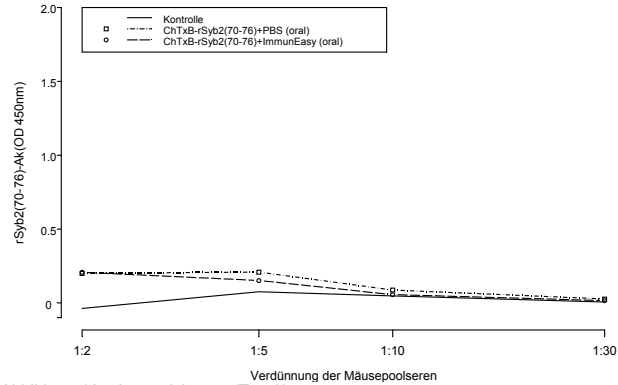


Abbildung 12a: Immunisierung (Tag 0)

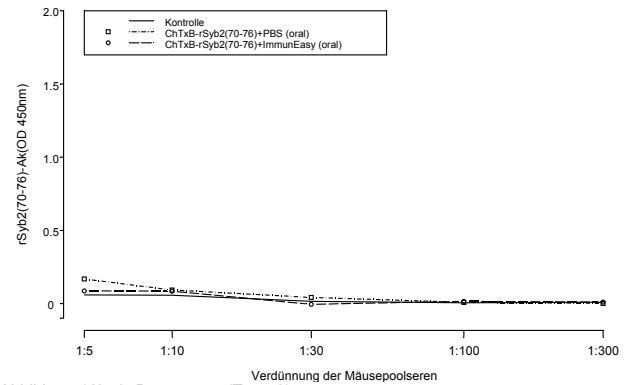


Abbildung 12b: 3. Boosterung (Tag 42)

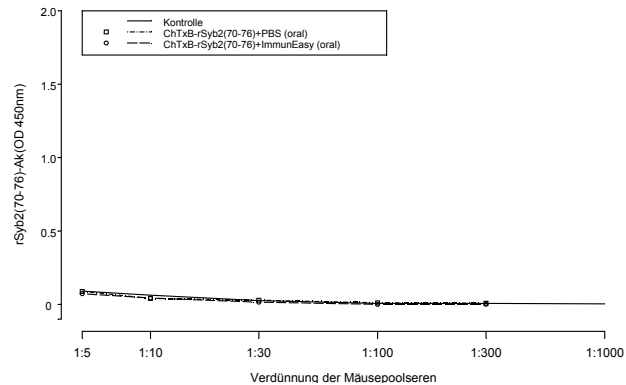


Abbildung 12c: 5. Boosterung (Tag 72)

Anhand der Abbildungen wird ersichtlich, dass sich die Messwerte für die Gruppen 2 und 4 vom Extinktionsverlauf der Kontrollgruppe deutlich unterscheiden. Im Rahmen einer statistischen Untersuchung mit einem „repeated measurement model“ wurden sowohl die unterschiedlichen Zeitprofile ( $p = 0,006$ ) als auch Unterschiede in den globalen Mittelwerten zwischen den Gruppen ( $p < 0,0001$ ) betrachtet. Vergleiche der einzelnen Adjuvantien mit der Kontrolle wiesen lediglich für die beiden oben genannten Tiergruppen auf statistisch relevante Unterschiede zur Kontrolle hin (jeweils  $p_{\text{adjustiert}} < 0,0001$ , Dunnett-Test). Alle anderen Adjuvansgruppen zeigten zwar - verglichen mit der Kontrolle - geringfügige Unterschiede im Extinktionsverlauf, diese erwiesen sich aber nicht als statistisch signifikant.

Um einen Vergleich der Antikörperproduktion der unterschiedlich immunisierten und geboosterten Gruppen durchzuführen, wurden die gemessenen Extinktionswerte in der Verdünnungsstufe 1:30 herangezogen. Die einzelnen Gruppen wurden nach den Carrierproteinen KLH und ChTxB getrennt aufgeführt. Des Weiteren wurden die wasserlöslichen und die ölhaltigen Adjuvantien miteinander verglichen. Die oral immunisierten Tiergruppen wurden von den subkutan immunisierten Gruppen separat dargestellt. Die folgenden Säulendiagramme stellten einerseits die Höhe der gebildeten Serumantikörper der unterschiedlichen Gruppen dar, andererseits waren die Veränderungen in der Antikörperproduktion nach der ersten und zweiten Boosterung im Vergleich zur Immunisierung sichtbar (Abbildung 13a-e).

a) Tiergruppen mit dem Carrier KLH (Abbildung 13a):

Die erste Boosterung bewirkte nur bei den Gruppen 2, 4 und 5 eine Verstärkung der Antikörperproduktion, die bei Gruppe 2 am stärksten war. Nach der zweiten Boosterung konnte für Gruppe 4 und 5 eine Erhöhung der Extinktionswerte gemessen werden. Bei Gruppe 2 kam es jedoch zu einem sichtbaren Abfall der Antikörperbildung.

Für die Gruppe 6 führte erst die zweite Boosterung zur Produktion messbarer Antikörpermengen, die dann ebenfalls hohe Werte erreichten.

In Gruppe 1 konnte während des Versuchs keine messbare Antikörperproduktion nachgewiesen werden.

b) Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB (Abbildung 13b):

Die erste Boosterung bewirkte nur bei Gruppe 8 eine deutliche Verstärkung der Antikörperproduktion. Die zweite Boosterinjektion führte zu einem Absinken der Extinktionswerte.

Für alle anderen Gruppen mit dem Carrier ChTxB konnte sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Boosterung keine messbare Produktion von spezifischen Antikörpern gegen rSyb2<sub>70-76</sub> nachgewiesen werden.

c) Oral immunisierte Tiergruppen (Abbildung 13c):

Bei den Gruppen 13 und 14 kam es nach keiner der Boosterungen zu einer nachweisbaren Antikörperbildung.

d) Tiergruppen, die mit wasserlöslichen Adjuvantien geimpft wurden (Abbildung 13d):

Für die Gruppen 4 und 5 konnte nach der ersten und nach der zweiten Boosterung eine deutliche Verstärkung in der Antikörperproduktion nachgewiesen werden.

Bei Gruppe 8 war nach der ersten Boosterung ein Anstieg in der Antikörperbildung festzustellen. Nach der zweiten Boosterung wurde ein Abfall der Serumantikörperproduktion beobachtet.

Für alle anderen Gruppen, die mit wasserlöslichen Adjuvantien geimpft wurden, konnte sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Boosterung keine messbare Antikörperproduktion festgestellt werden.

e) Tiergruppen, die mit ölhaltigen Adjuvantien geimpft wurden (Abbildung 13e):

Gruppe 2 zeigte nach der ersten Boosterung einen sehr starken Anstieg in der Antikörperbildung gegenüber der Immunisierung, der aber nach der zweiten Boosterung wieder abzusinken begann.

Für die Gruppe 6 führte erst die zweite Boosterung zur Produktion messbarer Antikörpermengen, die dann jedoch ebenfalls hohe Werte erreichten.

Im Folgenden wurden die Extinktionswerte aller immunisierten Gruppen in der Verdünnungsstufe 1:30 nach der Immunisierung, der ersten und zweiten Boosterung graphisch dargestellt.

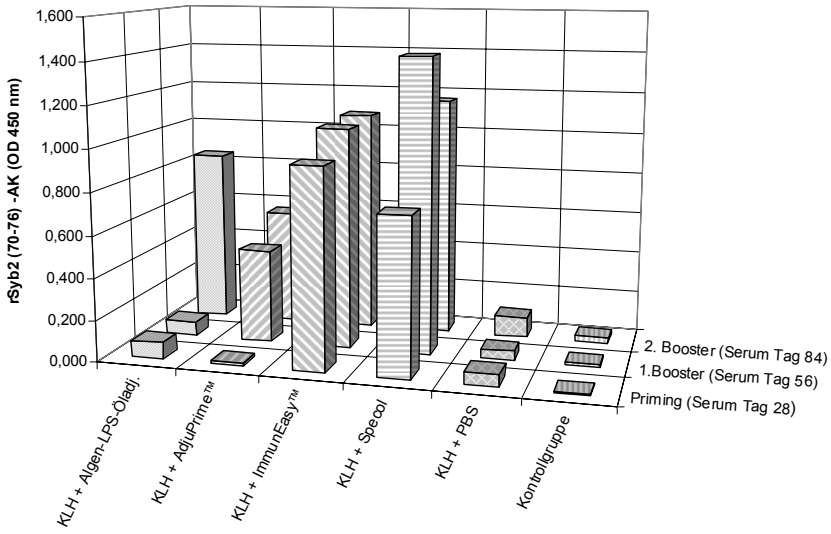


Abbildung 13a: **Tiergruppen mit dem Carrier KLH:**

ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen rSyb2<sub>70-76</sub> jeweils 28 Tage nach der ersten Immunisierung (Priming), der ersten und zweiten Boosterung in Abhängigkeit vom Adjuvans (Serumverdünnung 1:30, Coating-Antigen: rSyb2<sub>70-76</sub>: 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Kontrolle zum Tag 0 (alle Gruppen zeigen keine Antikörperbildung) ist nicht dargestellt.

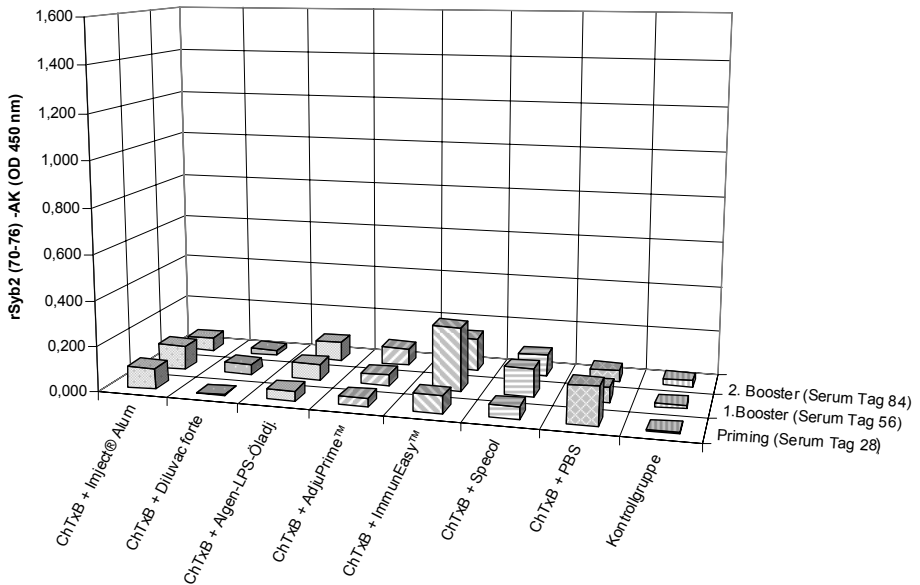


Abbildung 13b: **Tiergruppen mit dem Carrier ChTxB:**

ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen rSyb2<sub>70-76</sub> jeweils 28 Tage nach der ersten Immunisierung (Priming), der ersten und zweiten Boosterung in Abhängigkeit vom Adjuvans (Serumverdünnung 1:30, Coating-Antigen: rSyb2<sub>70-76</sub>: 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Kontrolle zum Tag 0 (alle Gruppen zeigen keine Antikörperbildung) ist nicht dargestellt.

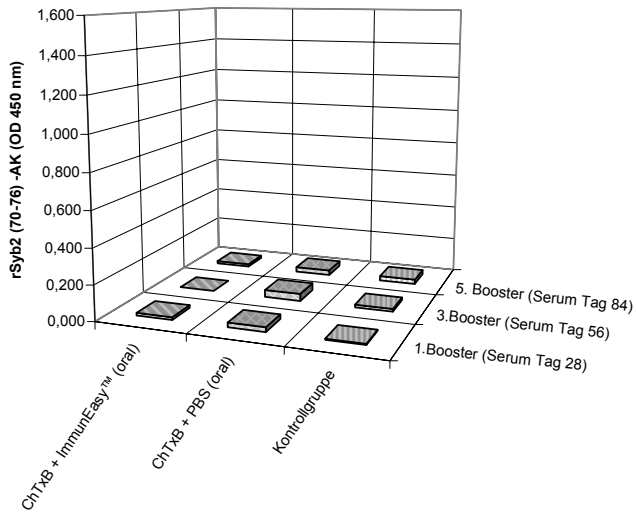
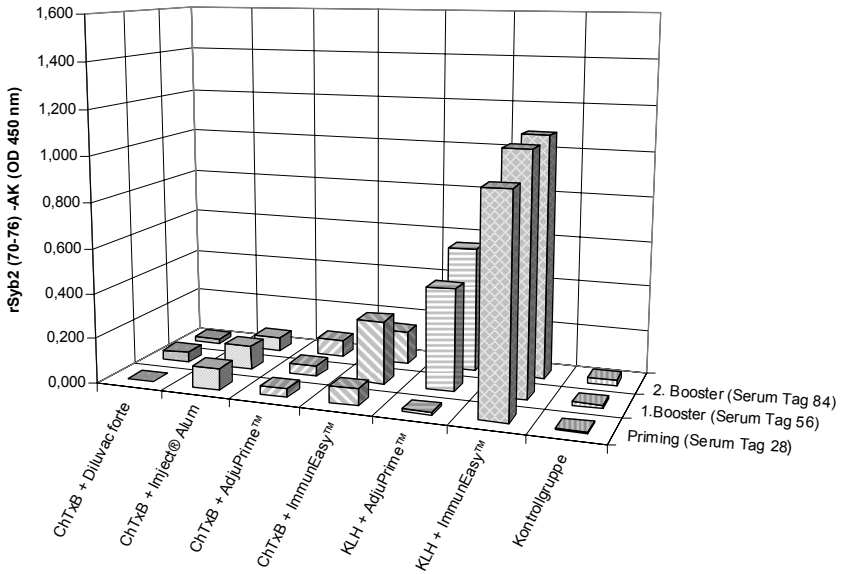


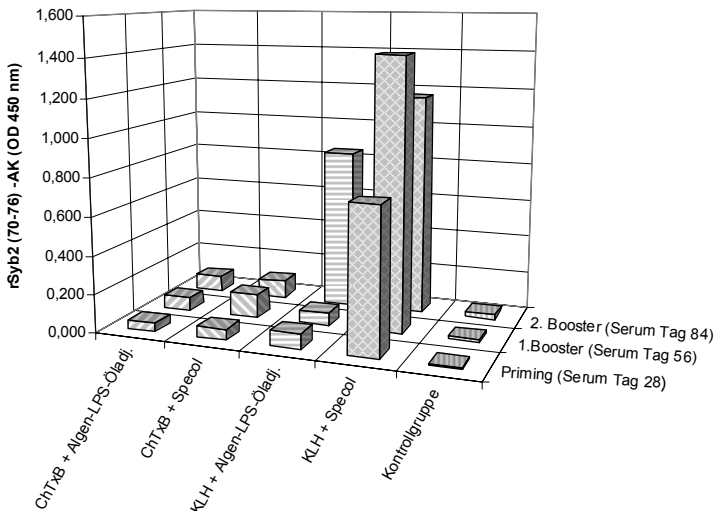
Abbildung 13c: **Oral immunisierte Tiergruppen:**

ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen rSyb2<sub>70-76</sub> jeweils 14 Tage nach der ersten, dritten und fünften Boosterung (diese Tiergruppen wurden alle 14 Tage geboostert) in Abhängigkeit vom Adjuvans (Serenverdünnung 1:30, Coating-Antigen: rSyb2<sub>70-76</sub>: 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Kontrolle zum Tag 0 (alle Gruppen zeigen keine Antikörperbildung) ist nicht dargestellt.



**Abbildung 13d: Wasserlösliche Adjuvantiengruppen:**

ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen rSyb2<sub>70-76</sub> jeweils 28 Tage nach der ersten Immunisierung (Priming), der ersten und zweiten Boosterung in Abhängigkeit vom Adjuvans (Serenverdünnung 1:30, Coating-Antigen: rSyb2<sub>70-76</sub>: 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Kontrolle zum Tag 0 (alle Gruppen zeigen keine Antikörperbildung) ist nicht dargestellt.



**Abbildung 13e: Ölhaltige Adjuvantiengruppen:**

ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen rSyb2<sub>70-76</sub> jeweils 28 Tage nach der ersten Immunisierung (Priming), der ersten und zweiten Boosterung in Abhängigkeit vom Adjuvans (Serenverdünnung 1:30, Coating-Antigen: rSyb2<sub>70-76</sub>: 0,5 µg je well in 50 µl PBS). Die Kontrolle zum Tag 0 (alle Gruppen zeigen keine Antikörperbildung) ist nicht dargestellt.

#### **4.2.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen das Oktamer rSyb2<sub>70-76</sub> sowie gegen Fragmente des rekombinanten Synaptobrevin 2 (rSyb2<sub>frag.</sub>)**

Zur genaueren Charakterisierung wurden die Mäuseseren mit Hilfe der SDS-PAGE und des Western Blots auf Antikörper gegen das Oktamer und gegen gespaltene rSyb2-Fragmente untersucht. Zur Detektion der Antikörper diente ein Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG. Zur Positiv-Kontrolle wurde ein polyklonaler N-terminaler Antikörper aus Kaninchen (RabT-N-term.-rSyb2-AK) eingesetzt, der das ungespaltene Synaptobrevin 2 (rSyb2) im Bereich des N-Terminus erkennt. Die Detektion erfolgte entsprechend mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen IgG. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge auf die Bahnen des Gels aufgetragen:

1. Molekulargewichtsmarker
2. BSA-rSyb2<sub>70-76</sub>
3. BSA
4. rSyb2
5. rSyb2<sub>frag.</sub>

Das Serum der Gruppen 2 und 4 wurde 1:500 verdünnt, alle übrigen Mäuseseren wurden 1:250 verdünnt. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert (Abbildung 14a-e).

Bei den Seren der Gruppen 2 und 4 waren im Western Blot die stärksten Banden von allen Gruppen zu beobachten. Wie im ELISA auch, konnte man hier eine hohe Antikörperproduktion gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> nachweisen. Gruppe 6 wies eine deutlich sichtbare Bande auf, wohingegen die Bande von Gruppe 5 schwach ausfiel (Abbildung 14a-d).

Der zur Positiv-Kontrolle eingesetzte N-terminale Antikörper (RabT-N-term.-rSyb2-AK) erkannte das ungespaltene Synaptobrevin 2, gegen das er gerichtet war (Abbildung 14e).

Das Serum der Kontrollgruppe sowie die Seren der Gruppen 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 und 14 zeigten keine Banden im Western Blot. Man konnte also keine Antikörperbildung gegen das Immunisierungspeptid im Western Blot nachweisen. Deshalb wurde auf die Darstellung dieser Blots verzichtet.

Bei keiner der untersuchten Gruppen war eine Bande im Bereich des fragmentierten Synaptobrevin 2 feststellbar. Man konnte also davon ausgehen, dass die Serumantikörper der Mäuse nur das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> erkennen, nicht aber das durch Tetanustoxin gespaltene Synaptobrevin 2.

Die folgenden Abbildungen 14a-e stellen die Banden der Gruppen 2, 4, 5 und 6 in der Bahn, in der BSA-rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 2) aufgetragen wurde, dar, sowie die Positiv-Kontrolle RabT-N-term.-rSyb2-AK, die die Bande in der Bahn mit ungespaltenem Synaptobrevin 2 (Bahn 4) aufweist.



Spezifitätstest der Seren:

Abbildung 14a-e: Getrennt wurden im SDS-Gel: Molekulargewichtsmarker (Bahn 1); BSA-rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 2); BSA (Bahn 3); rSyb2 (Bahn 4); rSyb2<sub>frag.</sub> (Bahn 5). Anschließender Transfer auf Nitrocellulose-Membran; Western Blot: Test mit Poolseren der Tiergruppen 2 (14a), 4 (14b), 5 (14c), 6 (14d). Positiv-Kontrolle ist der gegen das rekombinante Synaptobrevin 2 gerichtete polyklonale N-terminale Antikörper vom Kaninchen (RabN-term.-rSyb2-AK) (14e).

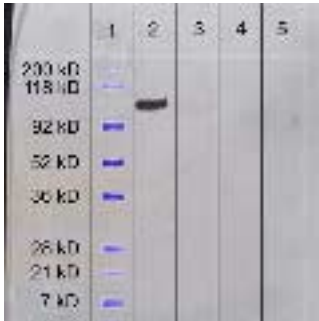


Abbildung 14a: Gruppe 2 (KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol)

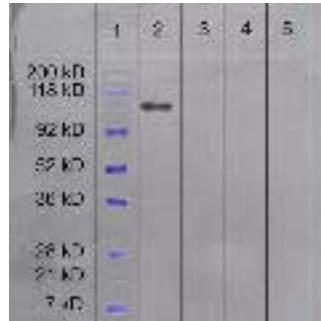


Abbildung 14b: Gruppe 4 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™)

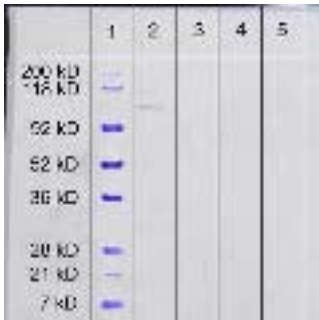


Abbildung 14c: Gruppe 5 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + AdjuPrime™)

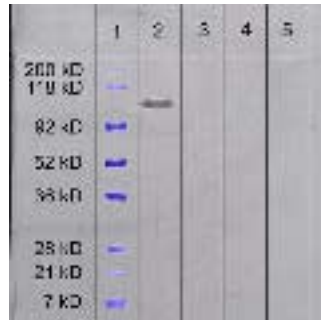


Abbildung 14d: Gruppe 6 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Algen-LPS-Öladjuvans)

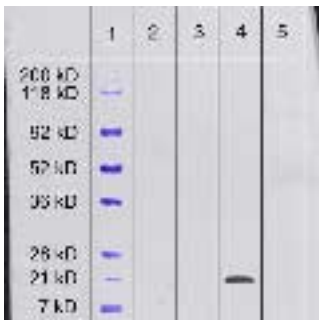


Abbildung 14e: Positiv-Kontrolle RabN-term.-rSyb2-AK

### 4.2.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis einer erfolgreichen Kopplung des Oktamers rSyb2<sub>70-76</sub> (Immunisierungspeptid) an die Carrier KLH, ChTxB und BSA

In diesem Versuch wurde das Serum der Kontrollgruppe und das Serum von Gruppe 2 verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente der Rabt-N-term.-rSyb2-AK (1:750 verdünnt). Das Serum der Gruppen 0 und 2 wurde 1:500 verdünnt. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert (Abbildung 15a + b).

Die Proben für das Kontrollserum wurden in folgender Reihenfolge auf die Bahnen aufgetragen:

1. Molekulargewichtsmarker
2. KLH- rSyb2<sub>70-76</sub>
3. ChTxB- rSyb2<sub>70-76</sub>
4. BSA- rSyb2<sub>70-76</sub>
5. rSyb2
6. rSyb2<sub>frag.</sub>

Das Serum der Kontrollgruppe zeigte keine Bande im Western Blot, daher wurde auf die Darstellung des Blots verzichtet.

Die Proben für das Serum der Gruppe 2 und das Serum der Positiv-Kontrolle Rabt-N-term.-rSyb2-AK wurden in folgender Reihenfolge auf die Bahnen aufgetragen:

1. Molekulargewichtsmarker
2. ChTxB- rSyb2<sub>70-76</sub>
3. BSA- rSyb2<sub>70-76</sub>
4. BSA
5. rSyb2
6. rSyb2<sub>frag.</sub>

Das Serum der Positiv-Kontrolle Rabt-N-term.-rSyb2-AK wies eine starke Bande im Bereich des ungespaltenen Synaptobrevin 2, gegen das er gerichtet war, auf (Abbildung 15b, Bahn 5).

Bei Gruppe 2 war eine deutlich sichtbare Bande im Bereich des BSA- rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 3) zu beobachten, jedoch nicht im Bereich des ChTxB (Abbildung 15a). Da keine Tiergruppe, die mit dem Carrier ChTxB immunisiert worden war, ausreichend Antikörper gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> gebildet hatte, war kein Serum zum Nachweis der Kopplung des Immunisierungspeptids an den Carrier KLH vorhanden.

Somit konnte man aus diesem Versuch schlussfolgern, dass die Kopplung an BSA erfolgreich stattgefunden hat, die Kopplung an ChTxB aber fraglich ist. Über die Kopplung an KLH ließ sich keine Aussage treffen.

Die folgenden Abbildungen 15a + b stellen die Bande von Serum 2 in der Bahn, in der BSA- rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 3) aufgetragen wurde, dar, sowie die Positiv-Kontrolle (der gegen das rekombinante Synaptobrevin 2 gerichtete polyklonale N-terminale Antikörper vom Kaninchen (Rabt-N-term.-rSyb2-AK)), die die Bande in der Bahn mit ungespaltenem Synaptobrevin 2 (Bahn 5) aufweist.

Spezifitätstest der Seren:

Abbildung 15a + b: Getrennt wurden im SDS-Gel: Molekulargewichtsmarker (Bahn 1), ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 2), BSA-rSyb2<sub>70-76</sub> (Bahn 3), BSA (Bahn 4), rSyb2 (Bahn 5), rSyb2 frag. (Bahn 6). Anschließend Transfer auf Nitrocellulose-Membran; Western Blot: Test mit Poolseren der Tiergruppe 2 (15a) und Positiv-Kontrolle Rabt-N-term.-rSyb2-AK (15b)

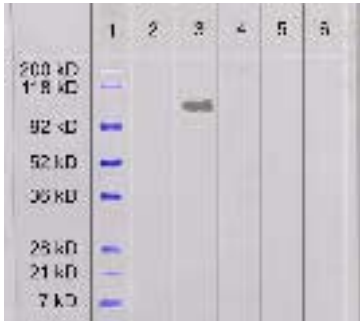


Abbildung 15a: Gruppe 2 (KLH- rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol)

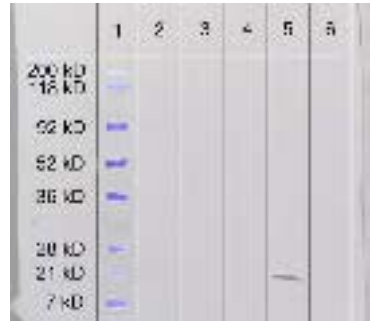


Abbildung 15b: Kontrolle Rabt-N-term.-rSyb2-AK

#### **4.2.4 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Carrier KLH und ChTxB**

Zwecks Komplettierung der Aussagen zu den immunstimulierenden Effekten der Adjuvantien wurde zusätzlich zu dem Modellantigen auch die Bildung von Antikörpern gegen die Carrier KLH und ChTxB untersucht.

Die an den Versuchstagen 28, 56 und 84 gewonnenen Seren wurden mit einem ELISA auf Antikörperbildung gegen die Carrier KLH und ChTxB untersucht. Dazu wurden in Vorversuchen die zu verwendende Konzentration der Carrier KLH und ChTxB sowie die jeweiligen Serenverdünnungen ermittelt.

##### **Vorversuche:**

###### **a) Festlegung der einzusetzenden Carrier-Konzentrationen:**

KLH und ChTxB wurden in den Konzentrationen 10 µg/ml, 1 µg/ml und 0,1 µg/ml auf die ELISA-Platten aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle diente das Serum nicht immunisierter Tiere, positives Testserum für KLH war das Serum der Gruppe 2 entsprechend für ChTxB das Serum der Gruppe 8. Die Seren wurden in den Verdünnungen 1:200 und 1:1000 eingesetzt.

Nur bei einer KLH-Konzentration von 10 µg/ml konnte eine messbare Antikörperbildung nachgewiesen werden. Deshalb wurde bei der weiteren Untersuchung KLH in dieser Konzentration verwendet.

Bei der Untersuchung der Antikörperbildung gegen ChTxB wies die Negativ-Kontrollgruppe in beiden Verdünnungsstufen bei Konzentrationen von 10 µg/ml und 1 µg/ml ähnlich hohe Extinktionswerte auf wie die Testgruppe 8. Erst bei der Konzentration von 0,1 µg/ml war ein deutlicher Unterschied zwischen der negativen Kontrollgruppe und der positiven Testgruppe feststellbar.

Die ChTxB-Konzentration wurde deshalb in einem Folgeversuch austitriert.

Dazu trug man ChTxB in den Konzentrationen von 1,0 µg/ml bis 0,001 µg/ml auf die ELISA-Platten auf und verdünnte die Seren der Kontrollgruppe und der Gruppe 8 1:1000, 1:3000 und 1:10000.

Bei ChTxB-Konzentrationen von 1,0 µg/ml und 0,3 µg/ml ergaben sich bei der Kontrollgruppe in allen Verdünnungsstufen ähnlich hohe Extinktionswerte wie bei dem Testserum der Gruppe 8. Erst bei einer ChTxB-Konzentration von 0,1 µg/ml und einer Serenverdünnung von 1:10000 war bei der Kontrollgruppe keine Antikörperbildung mehr nachweisbar, während bei Gruppe 8 in allen Verdünnungsstufen und bei den ChTxB-Konzentrationen von 1,0 µg/ml bis 0,01 µg/ml gleich bleibend hohe Extinktionswerte gemessen wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ChTxB in allen weiteren Versuchen in einer Konzentration von 0,03 µg/ml eingesetzt.

###### **b) Vorversuche zur Festlegung der einzusetzenden Serenverdünnungen:**

Bei der Bestimmung der Antikörper gegen KLH wurde ein deutlicher Abfall der Extinktionswerte von der Verdünnung 1:200 zur Verdünnung 1:1000 festgestellt. Insgesamt lagen die gemessenen Extinktionswerte erheblich niedriger als bei der Bestimmung der Antiseren gegen ChTxB. Aus diesen Gründen wurden in den folgenden Versuchen alle Seren mit dem Carrier KLH-Antigen in den Verdünnungsstufen 1:1000, 1:3000 und 1:10000 getestet.

Für ChTxB wurden bei allen Serenverdünnungsstufen der Gruppe 8 gleich bleibend hohe Extinktionswerte gemessen. Deshalb war es notwendig, in einem neuen Versuch das

Testserum weiter auszuverdünnen, um eine Differenzierung zwischen den Gruppen zu erkennen.

ChTxB wurde in einer Konzentration von 0,03 µg/ml auf die ELISA-Platten aufgetragen und die Seren der negativen Kontrollgruppe und der Gruppe 8 (ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + ImmunEasy™) wurden 1:3000 bis 1:100000 verdünnt.

Das Kontrollserum zeigte ab einer Verdünnung von 1:10000 keine messbare Antikörperbildung. Bei der Testgruppe 8 war eine deutliche Antikörperproduktion bis zur Verdünnungsstufe 1:100000 festzustellen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in den folgenden Versuchen alle Seren gegen ChTxB in den Verdünnungen 1:10000 und 1:30000 eingesetzt.

c) Untersuchung der Seren aller Tiergruppen auf Antikörper gegen die Carrier KLH und ChTxB:

Die nach der Immunisierung, der ersten und zweiten Boosterung gewonnenen Seren wurden auf Antikörperbildung gegen KLH und ChTxB untersucht. Dabei wurde KLH in einer Konzentration von 10 µg/ml und ChTxB in einer Konzentration von 0,03 µg/ml eingesetzt. Die Seren mit dem Carrier KLH wurden 1:1000, 1:3000 und 1:10000 verdünnt, die Seren mit dem Carrier ChTxB 1:10000 und 1:30000 verdünnt. Aus den Extinktionswerten der Sera der verschiedenen Tiergruppen wurden Mittelwerte gebildet und diese graphisch dargestellt (Abbildung 16a-e). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sowie die Standardabweichungen, Minimum, Median und Maximum werden im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Als Grenzwert für eine messbare Antikörperproduktion wurde der zweifache Wert des Serums der unbehandelten Gruppe 0 angesetzt.

Alle Seren von immunisierten Tieren wiesen Antikörper gegen die Carrier KLH bzw. ChTxB auf. Die Extinktionswerte der mit ChTxB geimpften Adjuvansgruppen lagen insgesamt höher als die der KLH-Tiergruppen. Die höchsten Extinktionswerte beider Carrier konnten in Kombination mit den Adjuvantien Specol und ImmunEasy™ erreicht werden (Abbildung 16a-e).

Während nach der ersten Boosterimmunisierung noch ein geringer Anstieg zu verzeichnen war, konnte die zweite Boosterung kaum eine Verstärkung erzeugen.

Bei den oral immunisierten Tiergruppen war eine deutlich messbare Antikörperproduktion gegen den Carrier ChTxB nachweisbar (Abbildung 16a + b), die Mäuse bildeten bei oraler Applikation von ChTxB systemisch Antikörper (IgG).

Die in diesem Versuch ermittelten Daten wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen angewandten Adjuvantien im Hinblick auf die beobachtete Antikörperbildung gegen KLH und ChTxB untersucht. Für beide Carrier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Adjuvansgruppen im Vergleich nach der ersten Immunisierung zur ersten Boosterung bzw. nach der ersten Boosterung zur zweiten Boosterung gefunden werden.

Da die Zahl der Beobachtungen sehr gering war, kam den beobachteten Signifikanzen kein beweisender Wert zu. Umgekehrt konnte aus einer Nichtsignifikanz das Fehlen eines Unterschiedes nicht abgeleitet werden; es konnte lediglich postuliert werden, dass kein Unterschied gefunden wurde.

Die durchgeführten statistischen Vergleiche der Adjuvansgruppen sind tabellarisch aufgeführt und dem Anhang zu entnehmen.

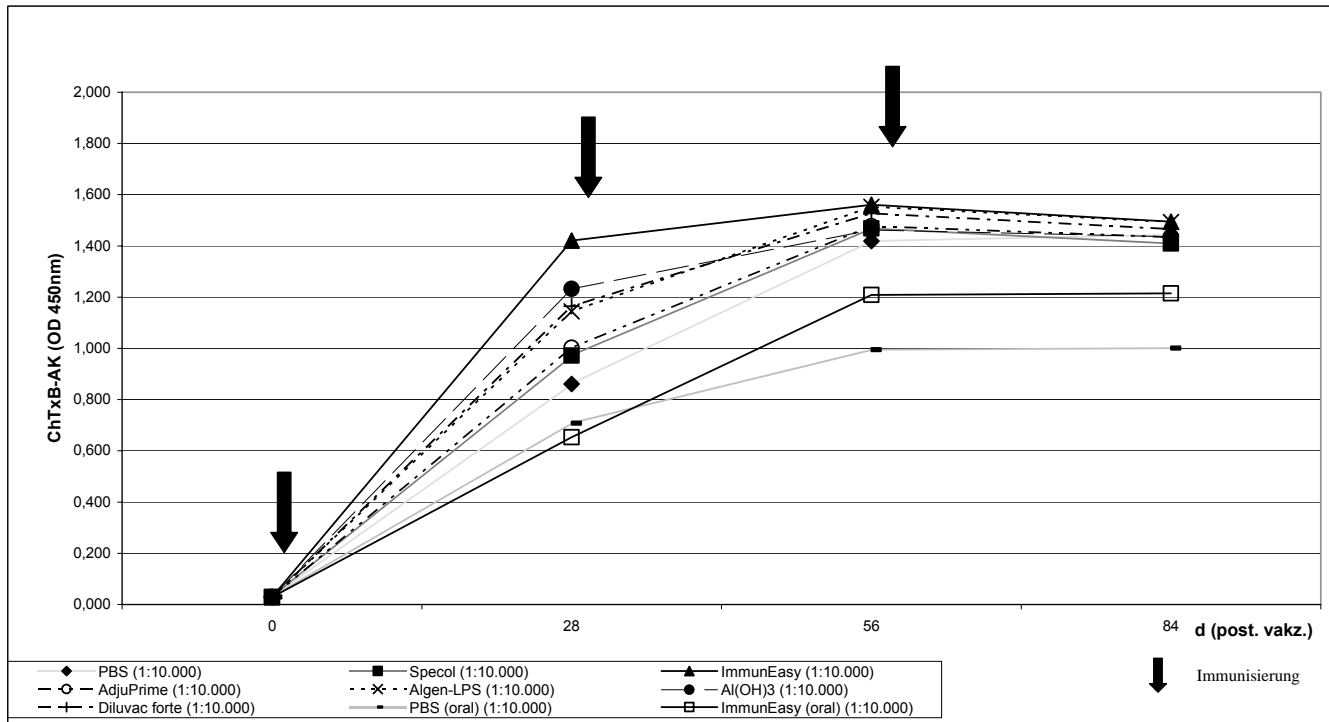


Abbildung 16a: **ELISA zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Antikörpertiters gegen ChTxB in Abhängigkeit vom Adjuvans** (Serenverdünnung 1:10000, Coating-Antigen: ChTxB: 1,5 ng je well in 50 µl PBS). Die Impftage sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

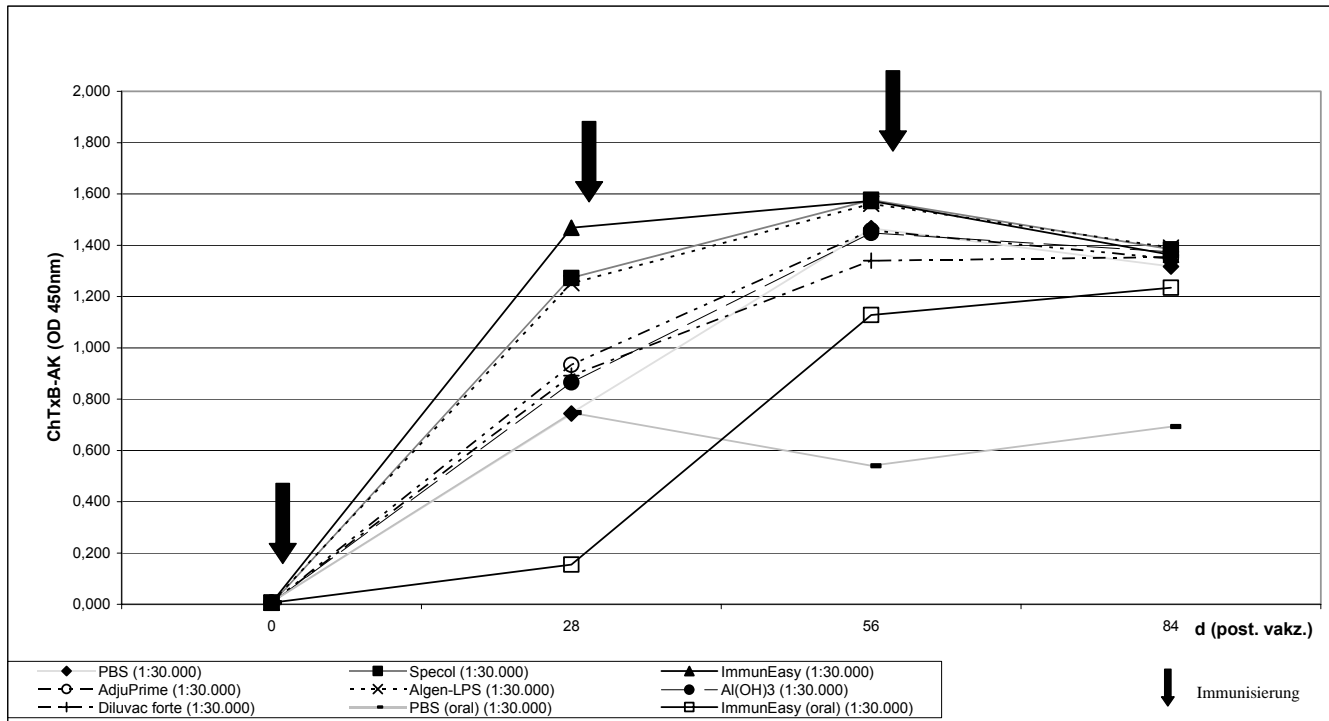


Abbildung 16b: **ELISA zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Antikörpertiters gegen ChTxB in Abhängigkeit vom Adjuvans** (Serenverdünnung 1:30000, Coating-Antigen: ChTxB: 1,5 ng je well in 50 µl PBS). Die Impftage sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

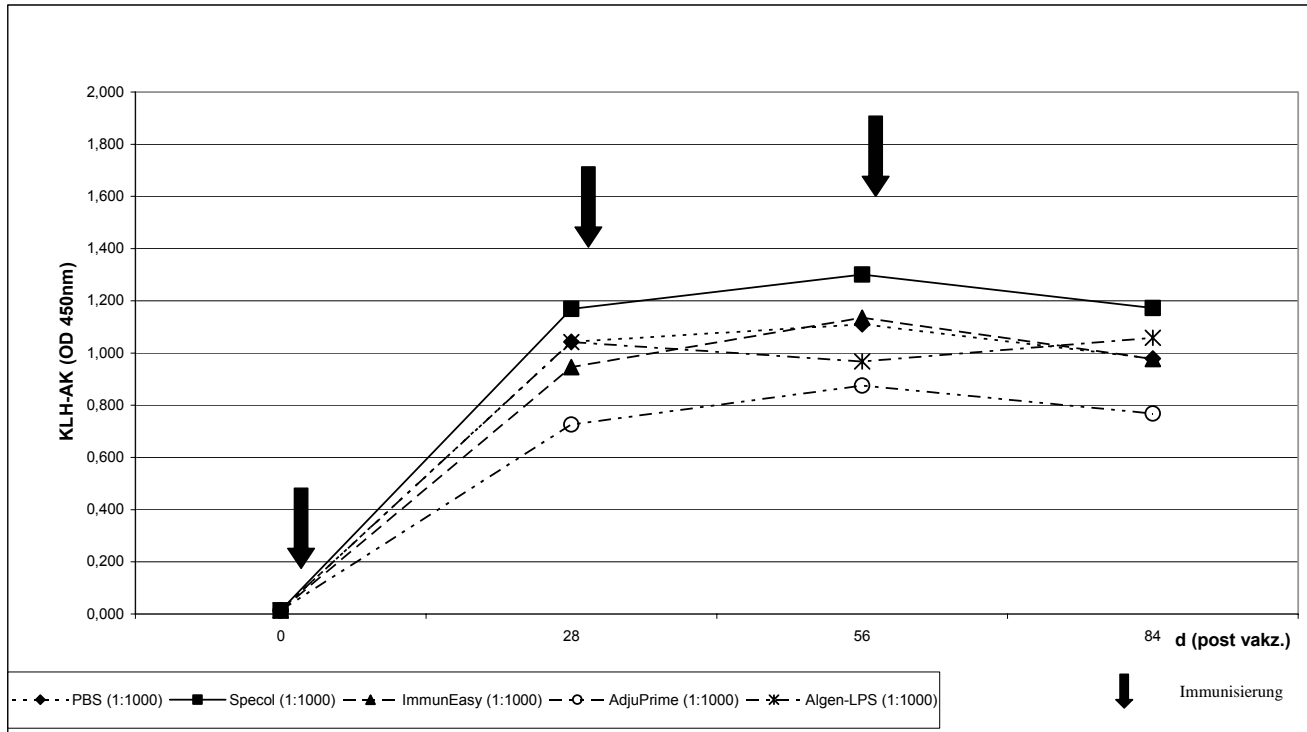


Abbildung 16c: **ELISA zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Antikörpertiters gegen KLH in Abhängigkeit vom Adjuvans** (Serenverdünnung 1:1000, Coating-Antigen: KLH: 0,5 µg je well in 50 µl Citratpuffer, pH 5,0). Die Impftage sind durch die Pfeile gekennzeichnet.



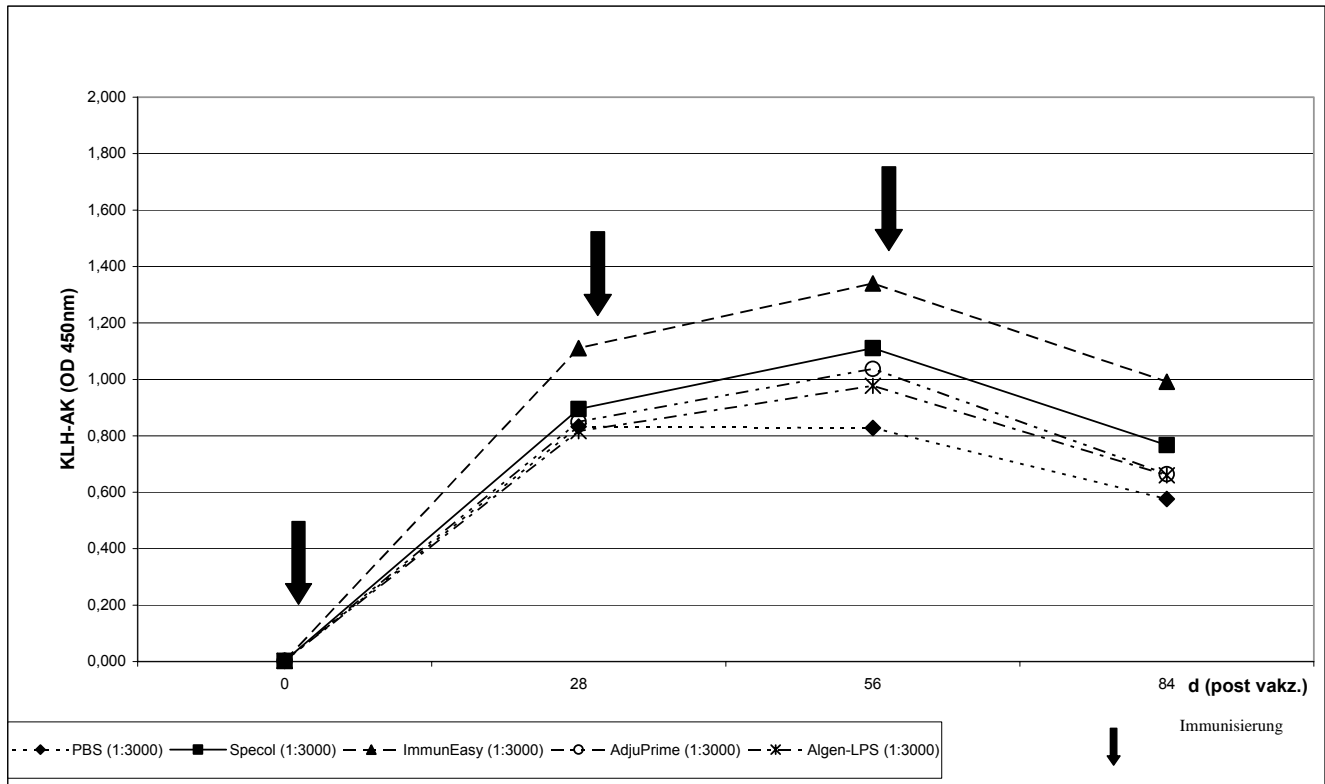


Abbildung 16d: **ELISA zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Antikörpertiters gegen KLH in Abhängigkeit vom Adjuvans** (Serenverdünnung 1:3000, Coating-Antigen: KLH: 0,5 µg je well in 50 µl Citratpuffer, pH 5,0). Die Impftage sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

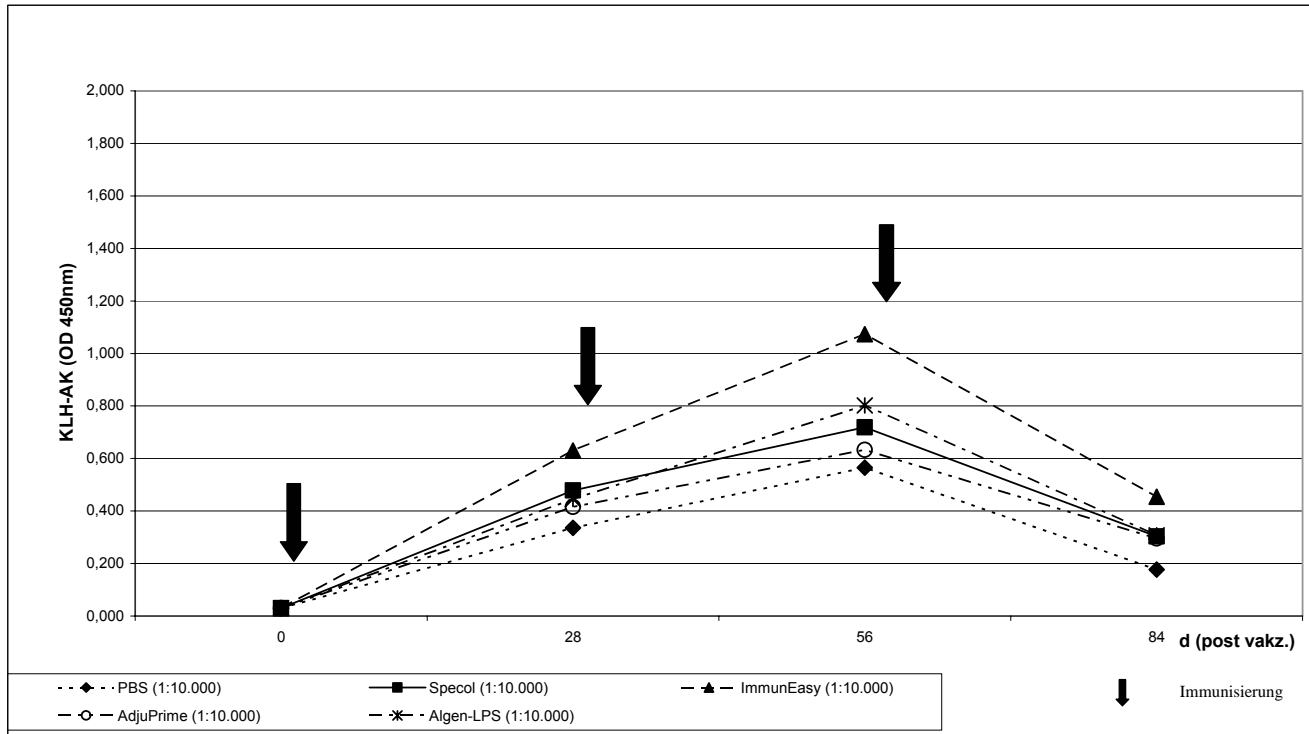


Abbildung 16e: **ELISA zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Antikörpertiters gegen KLH in Abhängigkeit vom Adjuvans** (Serenverdünnung 1:10000, Coating-Antigen: KLH: 0,5 µg je well in 50 µl Citratpuffer, pH 5,0). Die Impfstage sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

### **4.3 Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A in Mäuseseren**

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A (SAA) wurde unter Verwendung der am Versuchstag 84 gewonnenen Seren mit ELISA-Testkits durchgeführt. Für die Haptoglobin-Bestimmung wurden die Mäuseseren 1:2 verdünnt und die Extinktionen in einem ELISA-Platten-Photometer bei einer Messwellenlänge von 630 nm ohne Referenzwellenlänge gelesen. Zur SAA-Bestimmung wurden die Seren 1:200 verdünnt. Die Messwellenlänge betrug 450 nm, die Referenzwellenlänge 630 nm.

Anhand der Kalibrator-Extinktionen wurde eine Eichgerade erstellt und aus deren Geradengleichung die entsprechenden Haptoglobin- bzw. SAA-Konzentrationen errechnet. Die Einzelwerte der Serenkonzentrationen sind dem Anhang zu entnehmen.

Der Referenzwert für die Serum-Haptoglobin-Konzentration bei der Maus betrug 0,0-0,3 mg/ml, für SAA < 20 µg/ml. Die klinische Bewertung der ermittelten Akute-Phase-Proteine-Serenkonzentrationen erfolgte durch Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Die Kontrollgruppe sowie die Gruppen 9, 11, 13 und 14 zeigten keinen Anstieg der **Serum-Haptoglobin-Konzentration**, d.h. die Haptoglobin-Konzentration lag unter 0,3 mg/ml.

Eine geringe Reaktion war bei den Gruppen 1, 3, 5, 6, 7, 8 und 12 festzustellen; hier befanden sich die Haptoglobinwerte in einem Bereich von 0,3-0,5 mg/ml.

Ein starker Anstieg der Haptoglobinkonzentration wurde bei den Tiergruppen 2 (Specol), 4 (ImmunEasy™) und 10 (Algen-LPS-Öladjuvans) beobachtet, wobei Gruppe 10 die höchste Haptoglobin-Konzentration (0,941 mg/ml) aufwies, gefolgt von Gruppe 4 (0,746 mg/ml) und Gruppe 2 (0,632 mg/ml).

In der Kontrollgruppe und Gruppe 6 konnte kein Anstieg der **SAA-Konzentration** beobachtet werden.

Eine geringe Reaktion, d.h. SAA-Konzentrationen von 14-16 µg/ml, war bei allen Gruppen außer den Tiergruppen 2 und 10 festzustellen. Diese beiden Gruppen wiesen einen starken Anstieg der SAA-Konzentration auf. Bei Gruppe 2 wurde die höchste Konzentration ermittelt (20,283 µg/ml), gefolgt von Gruppe 10 (17,13 µg/ml).

### **4.4 Effekte von Adjuvantien auf Akute-Phase-Proteine, histologische Befunde und Allgemeinzustand**

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und SAA und den beobachteten histologischen Befunden bestand. Die Schwere der Veränderungen dieser Parameter sollten Hinweise auf eventuelle Schädigungen der Mäuse geben.

Die Akute-Phase-Proteine und die histologischen Befunde waren bei Gruppe 2 (Specol) am stärksten verändert. Es folgten Gruppe 4 (KLH + ImmunEasy™) und 10 (Algen-LPS-Öladjuvans). Gruppe 8 (ChTxB + ImmunEasy™) zeigte bei allen Merkmalen eine mäßige Reaktion. Bei den anderen Gruppen war zwar ein Adjuvantien-abhängiger Anstieg der Akute-Phase-Proteine zu sehen, aber histologisch konnten keine Veränderungen beobachtet werden.

Insgesamt war also ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Adjuvantien und den Veränderungen der untersuchten Parameter feststellbar. Dabei fiel auf, dass die ölhaltigen Adjuvantien Specol und Algen-LPS-Öladjuvans die deutlichsten Veränderungen

hervorriefen. Die hohen Serum-Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und SAA sowie die starke histologische Gewebe-Reaktion ließen auf eine Beeinträchtigung der Mäuse während der Studie schließen. ImmunEasy™ (Gruppe 4) als wasserlösliches Adjuvans lieferte ein ähnliches Ergebnis wie Specol und Algen-LPS-Öladjuvans.

## 5. Diskussion

Zielsetzung dieser Studie war es, unter Verwendung verschiedener Adjuvantien ein gut verträgliches Immunisierungsschema zu entwickeln, welches geeignet ist, auch mit den meist geringgradig immunogenen Peptidantigenen deutliche Antikörpertiter zu erzeugen. Dabei wurde die Auswahl an Adjuvantien einerseits bezüglich ihrer immunstimulierenden Wirkung und andererseits anhand der verursachten Nebenwirkungen verglichen. Zur Beurteilung von Schmerzen, Leiden und Schäden der Versuchstiere wurden die Parameter von Morton und Griffiths (1985) herangezogen.

### 5.1 Klinische Beobachtungen

#### a) Körpergewicht

Die Ermittlung des Körpergewichts ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Wohlbefindens der Versuchstiere. Gärtner und Militzer (1993) empfehlen, das Wachstum der Tiere durch regelmäßiges Wiegen zu kontrollieren, denn Gewichtsverluste erwachsener Tiere stellen für sie fast immer ein Anzeichen für Leidenszustände dar. Nach Morton und Griffiths (1985) gibt das Unvermögen adulter Tiere, ein konstantes Körpergewicht aufrechtzuerhalten, oder junger Tiere, ein bestimmtes Körpergewicht zu erreichen, einen Hinweis auf eine Abnormalität.

Betrachtet man den gesamten Versuchszeitraum, so nahm die Mehrzahl der Gruppen gleichmäßig an Gewicht zu. Geringfügige Gewichtsabnahmen wurden schnell ausgeglichen, so dass Unterschiede bei der Körpergewichtszunahme bis zum letzten Versuchstag statistisch unauffällig waren. Diese beobachteten leichten Schwankungen wurden wahrscheinlich durch den täglichen Umgang der Tierpfleger mit den Tieren und dem damit verbundenen Stress hervorgerufen.

Eine gewisse Ausnahme bildeten Gruppe 4 und 8, die nach Immunisierung und Boosterungen einen signifikanten Gewichtsabfall zeigten. Beide Gruppen waren mit dem Adjuvans **ImmunEasy™** immunisiert worden. Bei diesem Adjuvans besteht ein **deutlicher** Zusammenhang zwischen Immunisierung und Gewichtsreduktion, was auf einen Leidenszustand der Tiere schließen lässt. Allerdings glichen auch hier die Tiere den entstandenen Gewichtsverlust an den folgenden Tagen wieder aus, so dass am Ende der Versuchsreihe die mittleren Körpergewichte aller Tiergruppen nahe beieinander lagen.

#### b) Allgemeinbefinden und Verhalten

Das Allgemeinbefinden und Verhalten der Tiere wurde als ein weiterer wichtiger Parameter zur Beurteilung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren herangezogen. Bei Mäusen und anderen Nagern ist es besonders schwer, Belastungssymptome zu erkennen, so dass man im Allgemeinen darauf angewiesen ist, aus Verhaltensänderungen, vor allem Änderungen der Aktivität und aus Abwehrreaktionen Rückschlüsse auf Leidenszustände zu ziehen (Gärtner und Militzer, 1993).

Die Untersuchungen in dieser Studie wurden täglich zu einem festgelegten Zeitpunkt und immer nach dem gleichen Schema durchgeführt, so dass ein Vergleich des Verhaltens der Einzeltiere jeder Adjuvansgruppe untereinander und des Verhaltens der Tiere der verschiedenen Gruppen miteinander möglich war. Bei den immunisierten Mäusen und bei der Kontrollgruppe wurden das Spontanverhalten und das Antwortverhalten auf äußere Reize im Rahmen des für die Versuchsdurchführung notwendigen Umgangs untersucht.

Um Verhaltensstörungen auf Grund der Haltungsbedingungen auszuschließen, wurden in dieser Studie die Käfige der Tiere mit „Mouse Houses“ als Rückzugsmöglichkeit und Schlafplatz, Papierrollen als Spiel- und Kletterobjekte und Papiersteifen zum „Nestbau“ ausgestattet. Bei keinem untersuchten Tier wurden Störungen des Verhaltens wie Stereotypie und Beißen beobachtet.

Die Verhaltensuntersuchungen erfolgten in den Vormittagsstunden und damit zu einem Zeitpunkt, an dem die nachtaktiven Mäuse meist schlafend vorgefunden wurden. Eine Störung der Tiere durch die Untersuchung sollte jedoch auf jeden Fall eine Abwehrreaktion hervorrufen (Gärtner und Militzer, 1993).

Die Tiergruppen 2, 4, 6, 7, 8 und 10 wiesen an bis zu vier Tagen nach den Immunisierungen ein leicht gestörtes Allgemeinbefinden auf, was sich in einem deutlich ruhigeren Verhalten der Mäuse zeigte; Abwehrbewegungen waren kaum vorhanden. Das Fell dieser Tiere war struppig und glanzlos. Auf Grund dieser Symptome kann man annehmen, dass die Tiere infolge der Impfungen einem gewissen Stress unterworfen waren und sich infolgedessen für einige Tage ein Leidenszustand einstellte. Bei Gruppe 8, die mit dem Adjuvans ImmunEasy™ immunisiert worden war, hielt dieser Zustand nach den Immunisierungen am längsten an. Danach zeigten die Tiere wieder ihr gewohntes Verhalten und auch das Fell war wieder anliegend und glänzend. Bei der Kontrollgruppe und den Gruppen 1, 3, 5, 9, 11, 12, 13 und 14 wurde an jedem Untersuchungstag natürliches Verhalten und ein völlig ungestörtes Allgemeinbefinden beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein **Zusammenhang** zwischen den verschiedenen angewandten Adjuvantien und dem Allgemeinbefinden sowie dem Verhalten der immunisierten Mäuse **besteht**, da die Tiere Veränderungen nur an den Tagen nach den Impfungen aufwiesen. Dazwischen war ihr Allgemeinbefinden ungestört und ihr Verhalten normal.

### **c) Makroskopisch sichtbare Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle**

Bei depotbildenden Adjuvantien kommt es nach der Verabreichung einer Adjuvans-Antigen-Mischung in der Regel zur Entstehung eines Antigendepots an der Injektionsstelle, aus dem kontinuierlich kleine Antigenmengen abgegeben werden. Dies geschieht beispielsweise durch Emulsionen des Antigens in Öl. Öl-Adjuvantien können allerdings darüber hinaus zu lokalen Entzündungsreaktionen führen.

Nach Immunisierungen mit den ölhaltigen Adjuvantien Specol und Algen-LPS-Öl-Adjuvans traten erwartungsgemäß die stärksten lokalen Reaktionen auf. Die mit **Algen-LPS-Öl-Adjuvans** immunisierten Mäuse zeigten die **deutlichsten** makroskopisch sichtbaren **Veränderungen**. Im Vergleich dazu hatten die Lokalreaktionen der mit **Specol** geimpften Tiere ein **viel geringeres Ausmaß**, es waren jedoch weitaus mehr Tiere als in den anderen Gruppen betroffen. Die Reaktionen fanden sich sowohl im Nacken- als auch im Schulterbereich. Mäßige entzündliche Reaktionen an der Injektionsstelle und leichte Hautreizungen sind für Specol bereits in der Literatur beschrieben (Leenaars et al., 1997). Diese vorteilhaften Eigenschaften werden durch die vorliegende Studie bestätigt.

Beim Einsatz von wasserlöslichen Adjuvantien ist allgemein von einer guten Verträglichkeit auszugehen. Bei **ImmunEasy™** fanden sich bei Einzeltieren **geringfügige lokale Veränderungen** in der Nacken- bzw. Schultergegend. Sie waren jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den ölhaltigen Adjuvantien. Dies konnten auch Ioannou et al. (2003) in ihren Untersuchungen zur Verträglichkeit von CpG-Oligonukleotiden feststellen. Die anderen wasserlöslichen Adjuvantien riefen keine sichtbaren oder palpierbaren Lokalreaktionen am Injektionsort hervor.

#### d) Sektionsbefunde

Auch nach der Sektion wurden die deutlichsten Veränderungen bei dem ölhaltigen Adjuvans Specol und bei dem wasserlöslichen Adjuvans ImmunEasy™ gefunden. In der Nacken- und Schultergegend wurden verschieden große, abgekapselte Abszesse in Haut und Unterhaut, teilweise bis ins Fettgewebe ziehend, aufgefunden.

Die Umfangsvermehrungen der Injektionsstelle bei den Tiergruppen, die mit Algen-LPS-Ölajuvans immunisiert worden waren, befanden sich ebenfalls im Nacken- bzw. Schulterbereich, sie waren jedoch deutlich kleiner und dehnten sich nur in Haut und Unterhaut aus. Bei den übrigen Tiergruppen, die mit wasserlöslichen Adjuvantien geimpft wurden, konnten keine pathologischen Befunde erhoben werden.

#### e) Pathohistologische Befunde

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gewebeschnitte aus dem Bereich der Injektionsstellen bestätigten die pathologischen Befunde. Gewebeschnitte der mit **Specol und ImmunEasy™** immunisierten Tiergruppen zeigten die **deutlichsten** histologischen **Veränderungen**. Das histologische Bild wies zahlreiche dickwandige Vakuolen und eine starke Infiltration des umliegenden Gewebes mit Entzündungszellen (überwiegend Granulozyten, Myelozyten und Lymphozyten) auf. Es fanden sich aber auch Riesenzellen und Makrophagen. Diese Befunde deckten sich mit den Beobachtungen von Leenaars et al. (1997).

Obwohl die Anwendung von Algen-LPS-Ölajuvans ausgeprägte Lokalreaktionen zur Folge hatte, waren die Gewebereaktionen als geringgradig einzustufen. Die Vakuolen waren kleiner und dünnwandig und das umliegende Gewebe mit nur wenigen Entzündungszellen infiltriert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die in dieser Studie verwendeten **Adjuvantien nicht ohne Nebenwirkungen** sind. Insbesondere die mit ölhaltigen Adjuvantien immunisierten Tiere wiesen nach den Impfungen ein gestörtes Allgemeinbefinden, Lokalreaktionen und das histologische Bild einer Entzündung des Gewebes an den Injektionsstellen auf.

Die wasserlöslichen Adjuvantien hingegen riefen – mit Ausnahme von ImmunEasy™ - bei den Mäusen keine sichtbare Störung des Allgemeinbefindens hervor, pathohistologische Befunde konnten nicht erhoben werden. Bei ImmunEasy™, einem Adjuvans auf Basis von CpG-Oligonukleotiden, fanden sich ähnlich starke Reaktionen wie bei den ölhaltigen Adjuvantien. Die in der Literatur (Weiner, 2000; Mc Cluskie et al., 2000) beschriebene, weitgehend nebenwirkungsfreie Anwendung konnte hier nicht bestätigt werden.

## 5.2 Wirksamkeit der Adjuvantien

#### a) ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Peptid rSyb2<sub>70-76</sub>

Die Antikörperbildung wurde unter Verwendung eines ELISA überprüft.

Nach der Immunisierung mit **Specol** kam es in Kombination mit dem Carrier KLH zu einer starken Antikörperantwort, die mit Specol und ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> hingegen deutlich niedriger ausfiel. Die Immunantwort konnte bei beiden Gruppen durch Boosterung gesteigert werden. Leenaars et al. (1997) haben festgestellt, dass Specol als Adjuvans bei niedermolekularen bzw. schlecht immunogenen Substanzen und bei Antigenen, deren Struktur und Eigenschaften nicht gut charakterisiert sind, zu verwenden ist. Dies kann in der vorliegenden Studie nur für die Kombination mit dem Carrier KLH bestätigt werden.

Bei der Verwendung von **Algen-LPS-Öladjuvans** konnte in Verbindung mit dem Carrier KLH nach der Immunisierung ein schwacher Antikörperanstieg bei den Mäusen nachgewiesen werden, der durch die erste und zweite Boosterung verstärkt wurde. Bei der Kombination mit dem Carrier ChTxB konnten zu keinem Zeitpunkt Antikörper festgestellt werden.

Die Immunantwort fiel insgesamt zu schwach aus, um Algen-LPS-Öladjuvans für unsere Zwecke einzusetzen. Auch in Verbindung mit dem Carrier ChTxB erwies sich dieses Adjuvans als **ungeeignet**, da bei Mäusen keine ausreichende Antikörperbildung erzielt werden konnte.

Von den wasserlöslichen Adjuvantien erwies sich **ImmunEasy™** als wirksamstes Adjuvans. Es gehört in die Gruppe der unmethylierten CpG-Oligonukleotide, die im Bakterien-, nicht aber im Säugergenom vorkommen.

Mit ImmunEasy™ wurde sogar eine höhere Antikörperproduktion erzielt als mit Specol, allerdings wieder nur in Verbindung mit dem Carrier KLH. Die Immunantwort mit dem Carrier ChTxB fiel deutlich schwächer aus. Die erste Boosterung führte, wie bei Specol auch, zu einer Verstärkung der Antikörperproduktion.

In der Literatur wird CpG-DNA als ein gutes mucosales Adjuvans beschrieben. Bei oraler oder nasaler Applikation sollen CpG-Oligonukleotide sowohl systemische Immunantworten als auch die lokale IgA-Produktion stimulieren (Klinman et al., 2004). Die Resultate der Experimente von Mc Cluskie et al. (2000) zeigen, dass CpG-Oligonukleotide bei Mäusen eine mit Cholera toxin B vergleichbare Wirkung haben, wenn man sie intranasal appliziert. In der vorliegenden Studie wurden die Mäuse mit ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> in Kombination mit dem Adjuvans ImmunEasy™ oral immunisiert. Alle zwei Wochen erfolgte eine Boosterung. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnte ein messbarer Serum-IgG-Antikörpertiter festgestellt werden. Das mit diesem Antigen erzielte Resultat weicht deutlich von den Ergebnissen von Mc Cluskie (2000) und den Herstellerangaben ab, wonach ImmunEasy™, wenn es über Schleimhäute appliziert wird, auch systemische Immunantworten auslösen soll. In diesem Zusammenhang sollte man die von Mc Cluskie et al. (2002) vorgeschlagene Anwendung eines kombinierten Impfschemas aus mucosaler und parenteraler Applikation der CpG-Oligonukleotide in Betracht ziehen, da in ihren Studien die Interaktion zwischen mucosalem und systemischem Immunsystem eindrucksvoll dargestellt werden konnte.

In dieser Studie wurde **AdjuPrime™** in Kombination mit den Carrierproteinen KLH und ChTxB eingesetzt. Es kam nach der Immunisierung zu einer sehr schwachen Antikörperproduktion, die durch die Boosterimmunisierungen leicht gesteigert wurde. Der AdjuPrime™-Hersteller führte an Mäusen Untersuchungen zur Wirksamkeit seines Adjuvans durch. Dabei verglich er AdjuPrime™ mit dem kompletten Freundschens Adjuvans. Bei AdjuPrime™ wies der Hersteller eine 50-70 % bessere Wirkung im Vergleich mit dem kompletten Freundschens Adjuvans nach. Diese Resultate konnten mit dem hier benutzten Antigen **nicht** bestätigt werden. Da die Antikörperbildung der Mäuse dieser Studie so gering war, ist zu bezweifeln, ob AdjuPrime™ als Adjuvans für Peptidantigen in der Maus überhaupt geeignet ist.

Die mit dem Adjuvans **Imject® Alum** immunisierten Tiere zeigten sowohl nach der Immunisierung als auch nach der ersten und der zweiten Boosterung mit beiden Carrierproteinen nur eine sehr schwache Antikörperbildung. Obwohl Aluminiumverbindungen die IgG1-Produktion stimulieren, gehören sie zu den schwächeren



Adjuvantien und eignen sich daher nur eingeschränkt für den Laborbereich. Für unsere Zwecke war Imject® Alum als Adjuvans **nicht geeignet**.

Die Verwendung des Adjuvans **Diluvac forte**, das  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) enthält, führte sowohl nach der Erstimmunisierung als auch nach den Boosterimmunisierungen nur zu einer kaum nachweisbaren Antikörperbildung. Die **Ergebnisse von Tengerdy (1989)**, wonach Vitamin E eine stärkere Immunantwort hervorrufen kann als inkomplettes Freundsches Adjuvans, konnten in dieser Studie **nicht bestätigt** werden.

Die Gründe für die mangelhafte Wirksamkeit der oben beschriebenen Adjuvantien können vielseitig sein. Zum einen ist hier die Wahl des Antigens zu nennen. Möglicherweise ist das in dieser Studie eingesetzte Antigen in der Maus so schwach immunogen, dass es nur durch Zugabe hochpotenter Adjuvantien wie z.B. Specol und CpG-Oligonukleotide zu einer Stimulation des Immunsystems kommen kann. Zum anderen scheinen die Carrierproteine in Verbindung mit dem hier verwendeten Antigen und der genannten Adjuvantien ebenfalls eine Rolle zu spielen. Die Wahl eines anderen Carrier könnte bei der Lösung dieses Problems hilfreich sein.

Um die adjuvanten Eigenschaften der Carrier KLH und ChTxB zu überprüfen, wurde rSyb2<sub>70-76</sub> an KLH bzw. an ChTxB gekoppelt und den Mäusen subkutan wie oral ohne Zugabe von Adjuvantien appliziert. Die Tiere zeigten zu **keinem Zeitpunkt** eine Antikörperbildung. Um Antikörper gegen das Peptidantigen zu erzielen, war immer die Zugabe von Adjuvantien nötig. Somit konnten die in der Literatur beschriebenen adjuvanten Eigenschaften des ChTxB mit dem Peptidantigen rSyb2<sub>70-76</sub> **nicht bestätigt** werden. Auch in diesem Fall scheint das angewandte Peptidantigen zu schwach immunogen wirksam zu sein, um allein durch Kopplung an einen Carrier eine Immunantwort in Mäusen hervorrufen zu können. Daher war das Hinzufügen von Adjuvantien zwingend notwendig, wobei auch diese nicht immer zum erwünschten Ergebnis führten.

In dieser Studie haben nur das ölhaltige Specol und das wasserlösliche ImmunEasy™ in Kombination mit dem Carrier KLH eine deutliche Produktion von Serum-IgG-Antikörpern in der Maus ausgelöst. Mit dem Carrier ChTxB wurde eine vergleichbare Wirkung nicht erreicht.

Die orale Immunisierung der Mäuse mit dem Peptidantigen und ChTxB ohne Adjuvans und zusammen mit ImmunEasy™ führte zu keiner nachweisbaren systemischen IgG-Antikörperantwort gegen das Immunisierungspeptid. Die oben beschriebene **Annahme**, dass es sich hier um ein relativ schwach immunogen wirksames Antigen handelte, wurde mit diesem Ergebnis **bestätigt**. Da schon bei subkutaner Applikation hochpotente Adjuvantien nötig waren, um eine Antikörperproduktion in der Maus auszulösen, war die Stimulation der humoralen Immunantwort über den oralen Weg zu gering, um eine Reaktion nachweisen zu können. Die Verknüpfung anderer Antigene, Carrierproteine und Adjuvantien könnte jedoch möglicherweise erfolgreicher sein als die hier verwendeten Kombinationen.

Die mangelhafte Wirksamkeit einer Reihe von Adjuvantien dieser Studie ist nicht ohne weiteres zu erklären. Der Einsatz eines Stoffs als Adjuvans stellt oft das Resultat empirischer Beobachtungen dar. Die Übertragbarkeit auf andere Tierarten oder Antigene muss daher in den meisten Fällen ebenfalls experimentell überprüft werden. Zu den Wirkungsweisen auf der Ebene physiologischer Immunmechanismen sind zwar Details bekannt, z.B. die Stimulation der Interleukinproduktion, die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, MHC-I und -II sowie TH-1 und TH-2 Zellen (Triantafyllou und Triantafyllou, 2002; Martin und Wesche, 2002; Akashi et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Liu et al., 2003), ihre Rolle in der Kausalkette der Adjuvantieneffekte ist allerdings kaum

systematisch aufgeklärt. Da die Adjuvantienforschung in der Impfstoffentwicklung jedoch von großer praktischer Bedeutung ist, war ein Endergebnis-bezogener Versuchsansatz in der hier vorliegenden Arbeit unvermeidlich.

#### **b) SDS-PAGE und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> sowie gegen das durch Tetanustoxin gespaltene rSyb2 (rSyb2<sub>frag.</sub>)**

Die Mäuseseren wurden auch mit Hilfe eines Western Blots auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht. Die oben beschriebenen ELISA-Ergebnisse wurden mit dieser Methode bestätigt.

Für die Entwicklung einer *in vitro*-Ersatzmethode für Tierversuche zur Bestimmung der Resttoxizität von Tetanus-Vakzinen und -Seren sollte ein monoklonaler Antikörper entwickelt werden. Es gibt zwar bereits einen monoklonalen Antikörper, der das ungespaltene Protein im ELISA und im Western Blot detektiert, der aber nicht mehr mit dem Protein reagieren kann, wenn es zuvor durch Tetanustoxin gespalten wurde. Ein weiterer monoklonaler Antikörper wird benötigt, der die gespaltene und die ungespaltene Version detektieren kann und mit dessen Hilfe beide Versionen unterschieden werden können. Deshalb sollen die in diesen Versuchen gewonnenen Antiseren das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> und das gespaltene rSyb2 erkennen. **Keines** der Seren reagierte mit fragmentiertem Synaptobrevin 2. Die Serumantikörper der Mäuse detektierten nur das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, nicht aber das durch Tetanustoxin gespaltene Synaptobrevin 2. Dies könnte daran liegen, dass das gespaltene Synaptobrevin 2 viel größer ist als das Peptid und somit eine andere Tertiärstruktur besitzt, die von den Antikörpern nicht identifiziert wird. Eine andere mögliche Erklärung besteht darin, dass die Struktur des fragmentierten rSyb2 durch die Auftrennungsbedingungen in der Elektrophorese so stark verändert wurde, dass die Antikörper der Mäuse es nicht mehr detektieren konnten.

Entsprechend lieferte diese Studie **keinen Ansatz** zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, welcher spezifisch an Synaptobrevin nach Spaltung mit Tetanus-Toxin binden könnte.

#### **c) ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Carrier KLH und ChTxB**

Um weitere vergleichende Aussagen über die Effekte der Adjuvantien zu treffen, wurde die Antikörperbildung der Mäuse gegen KLH und ChTxB im ELISA überprüft.

Damit sollten auch adjuvante Eigenschaften der beiden Carrier untersucht werden.

Alle subkutan immunisierten Tiergruppen bildeten Antikörper gegen KLH und gegen ChTxB. Die Tiere, die nur mit dem Carrier gelöst in PBS immunisiert wurden, zeigten ähnlich hohe Extinktionswerte wie die Tiergruppen, denen zusätzlich noch Adjuvantien beigefügt wurden.

Die Zugabe des ölhaltigen Adjuvans Specol und des wasserlöslichen Adjuvans ImmunEasy™ verstärkte allerdings die Antikörperproduktion gegen KLH und ChTxB. Auch Ioannou et al. (2003) wiesen nach, dass es bei Gabe von KLH und CpG-Oligonukleotiden zu einer Induktion der Immunantwort gegenüber KLH kommt.

In eigenen Versuchen konnte in keiner Tiergruppe eine Verstärkung der Antikörperbildung gegen KLH und gegen ChTxB durch die zweite Boosterung erreicht werden.

**ChTxB** rief bei den Tieren eine **stärkere** Immunantwort hervor als KLH. Dies wird durch die in der Literatur vielfach beschriebenen adjuvanten Eigenschaften von ChTxB bestätigt.

In dieser Studie erwies sich **KLH** allerdings als der **effektivere** Carrier für das hier verwendete Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>. In der vorliegenden Untersuchung konnten auch die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des ChTxB als mucosales Adjuvans

bestätigt werden, denn die mit ChTxB oral geimpften Tiergruppen zeigten eine deutliche systemische Antikörperproduktion gegen ChTxB. Die Zugabe des wasserlöslichen Adjuvans ImmunEasy™ steigerte die Immunantwort der Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe nicht.

In Abhängigkeit vom Carrier weisen Adjuvantien sehr unterschiedliche immunstimulierende Eigenschaften auf. Untersucht man jedoch nur die Immunantwort auf das Carrierprotein (KLH oder ChTxB), finden sich weit weniger markante Differenzen zwischen den Adjuvantien. Generell ist der Effekt des Adjuvans bei starken Antigenen, wie sie die Carrierproteine darstellen, weniger ausgeprägt.

#### **d) Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A (SAA) in Mäuseseren**

Der Gehalt an den Akute-Phase-Proteinen (AP) Haptoglobin und SAA in den Mäuseseren wurde mit ELISA-Testkits ermittelt. Ein Anstieg der AP im Serum der Mäuse wurde als Indikator für eventuelle schädigende Reaktionen der in dieser Studie eingesetzten Adjuvantien genutzt.

Von den mit ölhaltigen Adjuvantien immunisierten Tiergruppen zeigten die Seren der Gruppen 2 und 10 die stärkste Reaktion.

Überraschenderweise ist der Anstieg der AP auch von den verwendeten Carrierproteinen abhängig. So sieht man einen starken Anstieg der Haptoglobin- und SAA-Serumkonzentration bei der mit KLH-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol immunisierten Tiergruppe, während bei den mit ChTxB-rSyb2<sub>70-76</sub> + Specol geimpften Tieren die Reaktion schwach ausfiel. Beim Algen-LPS-Öladjuvans dagegen ist eine deutliche Erhöhung der AP im Zusammenhang mit dem Carrier ChTxB erkennbar, während die Kombination mit dem Carrier KLH zu einem geringen Anstieg der Haptoglobin-Konzentration und zu keiner Zunahme der SAA-Konzentration führte.

Von den mit wasserlöslichen Adjuvantien immunisierten Tiergruppen wies Gruppe 4 einen starken Anstieg der Haptoglobin-Konzentration und einen geringen Anstieg der SAA-Konzentration auf. Auch hier scheint die Reaktion vom Carrier abhängig zu sein, denn ImmunEasy™ führt nur in Kombination mit KLH zu einem starken Anstieg des Haptoglobinspiegels; bei der Verbindung mit ChTxB fällt die Reaktion gering aus. Ioannou et al. (2003) erzielten in ihren Versuchen zur Unschädlichkeit von CpG-Oligonukleotiden ein ähnliches Ergebnis. Es kam ebenfalls nach Applikation von CpG-Oligonukleotiden zu einem leichten Haptoglobin-Anstieg in den untersuchten Rinderseren.

Bei allen übrigen Adjuvantiengruppen war ein eher geringer Anstieg der AP zu sehen. Auch bei den oral immunisierten Tiergruppen war eine leichte Zunahme der SAA-Konzentration nachweisbar, was auf eine systemische Impfreaktion schließen lässt.

Um etwaige Schmerzen, Leiden und Schäden der in dieser Studie eingesetzten Mäuse besser beurteilen zu können, wurde der Anstieg der AP mit den histologischen Befunden verglichen. Dabei fiel auf, dass von den ölhaltigen Adjuvantiengruppen die Tiergruppe 2 (Specol) die deutlichsten histologischen Veränderungen und die höchsten SAA- und Haptoglobin-Konzentrationen aufwies. Gruppe 10 (Algen-LPS-Öladjuvans) zeigte ebenfalls stark erhöhte AP-Konzentrationen, die histologischen Veränderungen deuteten aber auf eine mäßige Entzündung hin.

Aus der Gruppe der wasserlöslichen Adjuvantien beobachtete man die stärksten Veränderungen der AP und der Histologie bei Gruppe 4 (ImmunEasy™). Bei allen übrigen Adjuvantiengruppen konnte bei einem geringen AP-Serumspiegel auch eine geringgradige Entzündung des Gewebes festgestellt werden.

Somit ist ein **Zusammenhang** zwischen den Effekten der angewandten Adjuvantien und den beobachteten histologischen Veränderungen **erkennbar**. Die Tiergruppe, die mit dem Carrier KLH und dem ölhaltigen Adjuvans Specol geimpft wurde, wies die stärksten Reaktionen auf. Bei den wasserlöslichen Adjuvantiengruppen rief die Kombination KLH und

ImmunEasy™ die deutlichsten Veränderungen hervor. Diese Ergebnisse bestätigen auch die in dieser Studie erhobenen klinischen Befunde. So zeigten die Tiere der Gruppen 2 und 4 an den Tagen nach den Immunisierungen ein ruhigeres Verhalten und struppiges Fell. Bei den mit ImmunEasy™ geimpften Tieren war zudem ein Gewichtsabfall nach den Impfungen festzustellen. Aus diesen Resultaten kann man schließen, dass die Mäuse durch die in dieser Studie angewandten Adjuvantien in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigt waren, wobei **ImmunEasy™ und Specol die stärkste Belastung auslösten**. Da genau diese Adjuvantien zusammen mit dem Carrier KLH eine ausreichende Antikörperbildung gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub> auslösten, kann dieses als eine Unterstützung der „Alarm-Signal-Hypothese“ (Kapitel 2.1) gewertet werden.

Nach der „Danger-Hypothese“ von Matzinger (2002) sind „Alarm-Signale“ als Folge einer Gewebereaktion nötig, um eine Immunantwort auszulösen. Daher sind sie wesentlich für die ausreichende Stimulation des Immunsystems und die Bildung spezifischer Antikörper. Diese Vorgänge versucht man durch die Wahl des Antigens, die Kopplung des Antigens an Carrier und die Verwendung von Adjuvantien in Gang zu setzen. Die immunstimulierenden Eigenschaften der verschiedenen Adjuvantien wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vielfach untersucht. Dabei wurde immer wieder auf die unerwünschten Nebenwirkungen der Adjuvantien, wie lokale und systemische Entzündungsreaktionen, hingewiesen. Durch die Ergebnisse von Matzinger (2002) wird verständlich, dass ohne diese Entzündungsreaktionen keine „Alarm-Signale“ gebildet werden und somit keine Immunantwort möglich ist.

Auch in der vorliegenden Studie zeigten nur die Tiergruppen, die Verhaltensänderungen, lokale Reaktionen, histologische Befunde und einen Anstieg der AP aufwiesen, eine ausreichende Antikörperbildung gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>.

Aus der Gruppe der ölhaltigen Adjuvantien lieferte **Specol die besten Ergebnisse und ImmunEasy™** aus der Gruppe der wasserlöslichen Adjuvantien. Diese Adjuvantien scheinen für die Immunisierung von Mäusen mit Peptidantigenen geeignet. Sollen zur Immunisierung Peptidantigene verwendet werden, empfiehlt sich nach den hier gewonnenen Daten die Kopplung an den Carrier KLH.

Die Verwendung von Specol und ImmunEasy™ führte bei den Mäusen dieser Studie zu einer nachweisbaren Störung des Wohlbefindens. Da es Ziel dieser Studie war, ein gut verträgliches Immunisierungsschema für Mäuse zu entwickeln, ist dieses Ergebnis kritisch zu betrachten. Die Veränderungen der Tiere erwiesen sich zwar als wesentlich geringer als die in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen des kompletten Freundschens Adjuvans, doch sollte eigentlich eine nahezu nebenwirkungsfreie Alternative gefunden werden. Dies wird kaum zu realisieren sein, denn durch die Untersuchungen von Matzinger (2002) ist man zu der Erkenntnis gekommen, dass es ohne Entzündungsreiz und den damit verbundenen „Alarm-Signalen“ keine Immunantwort geben wird. Auch Klinman et al. (2004) postulierten in ihren Untersuchungen, dass CpG-Oligonukleotide im Säugerorganismus als „danger signals“ fungieren und das Immunsystem entsprechend darauf reagiert. Vor diesem Hintergrund kann man die **Nebenwirkungen von Specol und ImmunEasy™ als tolerierbar** bezeichnen.

ImmunEasy™ wurde in der Zwischenzeit wegen seiner hohen Herstellungskosten und einer zu geringen Nachfrage vom Markt genommen.

**Specol erweist sich als ein potentes, praktikables Adjuvans zur Immunisierung von Mäusen mit dem Peptidantigen rSyb2<sub>70-76</sub>.**

## 6. Zusammenfassung

Zur Entwicklung eines gut verträglichen Immunisierungsschemas bei Mäusen wurden die Verträglichkeit und die Effizienz von verschiedenen Adjuvantien verglichen. Eingesetzt wurden dafür die ölhaltigen Adjuvantien Specol und Algen-LPS-Öladjuvans sowie die wasserlöslichen Adjuvantien Imject® Alum, ImmunEasy™, AdjuPrime™ und Diluvac forte. Als Modellantigen wurde ein synthetisches, von dem Vesikelprotein Synaptobrevin 2 abgeleitetes Oktamer-Peptid (rSyb2<sub>70-76</sub>) verwendet, das von der Tetanustoxin-Spaltstelle stammt. Das rSyb2<sub>70-76</sub> wurde an den Carrier KLH oder ChTxB gekoppelt und mit einem Adjuvans versetzt.

Für die Immunisierungsexperimente wurden insgesamt 450 weibliche Balb/c-Mäuse eingesetzt. Gruppen von je 10 Mäusen wurden mit KLH-Antigen und PBS (Gruppe 1), Specol (Gruppe 2), ImmunEasy™ (Gruppe 4), AdjuPrime™ (Gruppe 5) oder Algen-LPS-Öladjuvans (Gruppe 6) bzw. mit ChTxB-Antigen und PBS (Gruppe 3), Specol (Gruppe 7), ImmunEasy™, (Gruppe 8), AdjuPrime™ (Gruppe 9), Algen-LPS-Öladjuvans (Gruppe 10), Imject® Alum (Gruppe 11) oder Diluvac forte (Gruppe 12) subkutan immunisiert und an den Versuchstagen 28 und 56 geboostert. Zwei Tiergruppen wurden oral an den Versuchstagen 0, 14, 28, 42, 56 und 70 mit ChTxB-Antigen und PBS (Gruppe 13) oder ImmunEasy™ (Gruppe 14) immunisiert. Die unbehandelte Gruppe 0 sowie die Gruppen 1 und 3 (Carrier KLH oder ChTxB mit PBS ohne Adjuvans) dienen als Kontrollgruppen.

An den Versuchstagen 28 und 56 wurde den Tieren zur Serumgewinnung Blut entnommen, am Tag 84 wurden sie durch Herzpunktion entblutet.

### **Verträglichkeit der Adjuvantien:**

Bei allen Mäusen wurden Verhaltensstudien und klinische Untersuchungen durchgeführt. Des Weiteren wurden makroskopisch sichtbare Veränderungen an den Injektionsstellen pathologisch und histologisch untersucht.

Die Tiergruppen, die mit dem Oktamer-Peptid und einem Adjuvans per Injektion immunisiert wurden (Gruppe 2, 4, 6, 7, 8 und 10) - Ausnahme waren Gruppe 5 (KLH + AdjuPrime™), 9 (ChTxB + AdjuPrime™), 11 (ChTxB + Imject® Alum) und 12 (ChTxB + Diluvac forte) - zeigten an bis zu vier Tagen nach den Immunisierungen ein deutlich ruhigeres Verhalten und wiesen in dieser Zeit ein struppiges und glanzloses Fell auf. Alle Kontrollgruppen sowie die oral immunisierten Tiergruppen waren unauffällig.

Bei fünf Mäusen aus jeder Gruppe wurde die Körpergewichtsentwicklung während des Experiments erfasst. Während des Versuchs konnte man bei den mit ImmunEasy™ immunisierten Gruppen 4 und 8 einen signifikanten Gewichtsabfall nach den Impfungen beobachten, während alle anderen Gruppen eine gleichmäßige Gewichtszunahme zeigten. An den Injektionsstellen im Schulter- und Nackenbereich waren bei den Adjuvansgruppen 2, 4, 6, 8 und 10 Lokalreaktionen feststellbar. Gruppe 2 (KLH und Specol) zeigte die ausgeprägtesten Veränderungen; in der pathologischen Untersuchung stellten sich diese Gewebeveränderungen als abgekapselte Abszesse dar.

Die histologische Untersuchung ergab bei den Gruppen 2 (KLH und Specol) und 4 (KLH und ImmunEasy™) eine deutliche Entzündungsreaktion des Gewebes mit großen, dickwandigen Vakuolen und massiver Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen. Bei den Gruppen 6 (KLH und Algen-LPS-Öladjuvans), 8 (ChTxB und ImmunEasy™) und 10 (ChTxB und Algen-LPS-Öladjuvans) wurden mäßige Gewebereaktionen mit kleinen, dünnwandigen Vakuolen und wenig Entzündungszellen beobachtet.

Bei allen übrigen Tiergruppen konnten keine pathohistologischen Befunde erhoben werden.

Zur weiteren Beurteilung möglicher Schädigungen der Tiere wurde der Anstieg der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A (SAA) in den Seren bestimmt. Bei den Gruppen 2 (KLH und Specol) und 10 (ChTxB und Algen-LPS-Öladjuvans) war ein starker Anstieg der Konzentration beider Proteine nachweisbar, in Gruppe 4 (KLH und ImmunEasy™) war ein solcher Anstieg bei Haptoglobin feststellbar, alle anderen Gruppen zeigten nur einen geringen Anstieg an Haptoglobin und SAA. Gruppe 2 und 10 zeigten ebenfalls einen starken Anstieg der SAA-Konzentration, die anderen Gruppen wiederum einen geringen Anstieg. Somit ist eine Belastung der Tiere der Gruppen 2 (KLH und Specol), 4 (KLH und ImmunEasy™) und 10 (ChTxB und Algen-LPS-Öladjuvans) durch die angewandten Adjuvantien wahrscheinlich.

### **Effizienz der Adjuvantien:**

Zur vergleichenden Bewertung der Effektivität der Adjuvantien wurde neben der Antikörperbildung gegen das Modellantigen (Oktamer-Peptid) auch die Immunantwort gegenüber den verwendeten Carrierproteinen untersucht.

Die Seren aller immunisierten Tiergruppen wiesen eine deutlich messbare Antikörperbildung gegen die Carrier KLH und ChTxB auf, wobei die beiden Boosterungen die Immunantwort der Tiere nicht verstärkten. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Adjuvantien gezeigt werden.

Bei den oral mit ChTxB immunisierten Tiergruppen war eine starke systemische Antikörperbildung, die aber durch Zugabe von ImmunEasy™ nicht weiter stimuliert wurde, nachweisbar.

Die Untersuchung auf Antikörperbildung gegen das Oktamer-Peptid ergab im ELISA und im Western Blot nur für die Gruppen 2 (KLH und Specol) und 4 (KLH und ImmunEasy™) eine sehr deutliche Immunantwort. Leider gelang es mit den Seren nur solche Epitope zu detektieren, die auf dem synthetischen Oktamer-Peptid selbst vorhanden waren. Das durch Tetanustoxin gesplante Synaptobrevin 2 wurde von den Hyperimmunseren im Western Blot nicht detektiert. Somit konnte das ursprüngliche Vorhaben, mit erfolgreich immunisierten Mäusen später monoklonale Antikörper gegen das durch Tetanustoxin gesplante Synaptobrevin 2 herzustellen, nicht weiter verfolgt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für Mäuse das ölhaltige Adjuvans Specol und das wasserlösliche Adjuvans ImmunEasy™ als potente, praktikable Adjuvantien mit gleichzeitig tolerablen Nebenwirkungen identifiziert werden konnten. Alle übrigen Adjuvantien induzierten mit dem geprüften Modellantigen keine ausreichende Antikörperbildung.

## 7. Summary

To develop an animal immunization scheme that is well-tolerated by mice, a comparison was made between the tolerance and efficiency of different adjuvants. For this purpose, use was made of the water-in-oil emulsion adjuvant Specol and the algae-LPS-oil-based adjuvant as well as of the water-soluble adjuvants Imject® Alum, ImmunEasy™, AdjuPrime™ and Diluvac forte. A synthetic octamer peptide (rSyb2<sub>70-76</sub>) derived from the vesicle protein Synaptobrevin 2 was chosen as a model antigen which originates from the cleavage site of the tetanus toxin. The rSyb2<sub>70-76</sub> was coupled to carrier KLH or carrier ChTxB and charged with adjuvants.

For the immunization experiments, a total of 450 female BALB/c mice were selected. Groups of ten mice each were immunized subcutaneously with KLH antigens and PBS (Group 1), Specol (Group 2), ImmunEasy™ (Group 4), AdjuPrime™ (Group 5) or the algae-LPS-oil-based adjuvant (Group 6), or with ChTxB antigens and PBS (Group 3), Specol (Group 7), ImmunEasy™, (Group 8), AdjuPrime™ (Group 9), the algae-LPS-oil-based adjuvant (Group 10), Imject® Alum (Group 11) or Diluvac forte (Group 12), and all groups were boosted on the 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> days of the experiment. On test days 0, 14, 28, 42, 56 and 70, two groups of animals were immunized orally with ChTxB antigen and PBS (Group 13) or ImmunEasy™ (Group 14). The non-treated Group 0 as well as Groups 1 and 3 (carrier KLH or carrier ChTxB, both with PBS and without adjuvant) served as control groups.

On test days 28 and 56, some blood samples were taken from the animals for the purpose of serum collection; on day 84 of the experiment, exsanguination of the animals was carried out by heart puncture.

### **Tolerance of the adjuvants:**

Behavioral studies, clinical observations, including the determination of macroscopically visible changes at the sites of injection, were conducted for all mice. The changes identified were examined pathologically and histologically.

Within four days of immunization, the groups of animals immunized with the octamer peptide and an adjuvant per injection (Groups 2, 4, 6, 7, 8 and 10) – with the exception of Groups 5 (KLH + AdjuPrime™), 9 (ChTxB + AdjuPrime™), 11 (ChTxB + Imject® Alum) and 12 (ChTxB + Diluvac forte) – revealed markedly quieter behavior and exhibited a dull and scruffy coat of fur during that period of time. All control groups as well as the orally immunized animal groups were without any pathological findings.

In the course of the experiment, the development of the body weight of five mice from each group was recorded. During the test, a significant decline in weight could be observed after immunization in the case of Groups 4 and 8 which were immunized with ImmunEasy™, while all other groups showed a constant increase in body weight.

At the injection sites in the shoulder and neck areas, local reactions could be identified at Adjuvant Groups 2, 4, 6, 8 and 10. Group 2 (KLH and Specol) exhibited the most pronounced changes; when pathologically examined, these changes in the tissue turned out to be encapsulated abscesses.

The histological examination revealed a clear inflammatory response of the tissue with large, thick-walled vacuoles and a massive infiltration of the tissue with inflammatory cells in the case of Groups 2 (KLH and Specol) and 4 (KLH und ImmunEasy™), whereas moderate responses of the tissue with small, thin-walled vacuoles and only a small amount of inflammatory cells were observed for Groups 6 (KLH and algae-LPS-oil-based adjuvant), 8 (ChTxB and ImmunEasy™) and 10 (ChTxB and algae-LPS-oil-based adjuvant).

As far as the remaining animal groups are concerned, there were no pathohistological findings.

To further assess possible physical damages to, or pain and distress in, the animals, the increase of the acute-phase proteins haptoglobin and serum amyloid A (SAA) was determined in the sera.

In the case of Groups 2 (KLH and Specol) and 10 (ChTxB and algae-LPS-oil-based adjuvant), a sharp rise in the concentration of both proteins could be established; in Group 4 (KLH and ImmunEasy™), such a high rise could be found for haptoglobin; all other groups of mice revealed only a slight increase.

Groups 2 and 10 showed a large increase of the SAA concentration as well. Again, the other groups exhibited a slight increase only.

Thus the probability exists that the adjuvants in use lead to distress, discomfort or pain in the animals of Groups 2 (KLH and Specol), 4 (KLH and ImmunEasy™) and 10 (ChTxB and algae-LPS-oil-based adjuvant).

### **Efficiency of the adjuvants:**

For a comparative evaluation of the efficiency of the adjuvants applied, not only the antibody production against the model antigen (octamer peptide) was examined but also the immune response against the carrier proteins used.

The sera of all immunized animal groups revealed a clearly measurable antibody production against the KLH and ChTxB carriers, the two booster injections not resulting in an augmentation of the animals' immune responses. In this context, no significant differentiation between the adjuvants could be detected.

For the groups of animals orally immunized with ChTxB, a large systemic antibody production was detectable, which was not stimulated further by the addition of ImmunEasy™, however.

Only for Groups 2 (KLH and Specol) and 4 (KLH and ImmunEasy™) did the examination for the production of antibodies against the octamer peptide reveal a very clear immune response in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and in the Western blot. Unfortunately, the sera only recognized the epitopes that were present on the synthetic octamer peptide itself. The Synaptobrevin 2 cleaved by tetanus toxin was not detected by the hyperimmune sera in the Western blot. As a consequence, the original plan to subsequently produce, with the aid of successfully immunized mice, monoclonal antibodies against the Synaptobrevin 2 cleaved by tetanus toxin could not be further pursued.

In conclusion, it can be stated that for mice the water-in-oil emulsion adjuvant Specol and the water-soluble adjuvant ImmunEasy™ could be identified as very potent, practicable adjuvants with simultaneously tolerable side effects. All other adjuvants did not induce a sufficient production of antibodies with the tested model antigen.



## 8. Literaturverzeichnis

- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M. and Wagner, H. (2002): Bacterial CpG-DANN and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1958-1968.
- Akashi, S., Saitoh, S.-I., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., Kosugi, A. and Miyake, K. (2003): Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: Higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J. Exp. Med.* **7**, 1035-1042.
- Akira, S., Hoshino, K., Kaisho, T. (2000): The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J. Endotoxin. Res.* **6**, 383-387.
- Amyx, H.L. (1987): Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **191**, 1287-1289.
- Audibert, F.M. and Lise, L.D. (1993): Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today* **14**, 281-284.
- Baumert, M. et al. (1989): Synaptobrevin: An integral membran protein of 18 kDA present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* **8**, 379-384.
- Bauer, S. and Wagner, H. (2002): Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **270**, 145-154.
- Boersma, W.J.A., Bogaerts, W.J.C., Bianchi, A.T.J. and Claassen, E. (1992): Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with Specol. In: 44th Forum in Immunology. *Res. Immunol.* **143**, 503-512.
- Canadian Council on Animal Care (1991). CCAC guidelines on acceptable immunological procedures. Ottawa, Ontario, Kanada.
- Chen, W., Yu, Y., Shao, C., Zhang, M., Wang, W., Zhang, L., Cao, X. (2001): Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol. Let.* **77**, 17-23.
- Cox, J.C. and Coulter, A.R. (1997): Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**, 248-256.
- Dertzbaugh, M.T. and Elson, C.O. (1991): Cholera toxin as a mucosal adjuvant. In: Spriggs, R.D. and Koff, W.C. (eds.): Topics in Vaccine Adjuvant Research, *CRC Press Boca Raton*, 119-131.
- Dickhöfer, D. (2002): Haptoglobin als Screeningparameter für Atemwegserkrankungen des Schweines. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, 31-41.

- Fischer, P.M., Comis, A. and Howden, M.E.H. (1988): Direct immunization with synthetic peptidyl-polyamide resin. Comparison with antibody production from free peptide and conjugates with carrier proteins. *J. Immunol. Meth.* **118**, 119-123.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Gärtner, K. und Militzer, K. (1993): Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren. *Schriftenreihe Versuchstierkunde* Heft **14**, Verlag Paul Parey, Berlin.
- Griffiths, P.H.M. (1991): Clinical assessment of pain, distress and discomfort. In: Hendriksen, C.F.M. and Koeter, H.B.W.M. (eds.): *Animals in Biomedical Research. Elsevier Science Publishers B.V.*, Amsterdam, 235-246.
- Hanly, W.C., Artwohl, J.E., Bennett, B.T. (1995): Overview of adjuvants. In: Smith, C.P., Jensen, D. A., Allen, T., Kreger, M. (eds.): *Information resources for adjuvants and antibody production. Comparison and alternative technologies 1990-1997, Animal Welfare Information Center Resources Series 3*, 1-8.
- Hartinger, J. (1997): Tierschutzgerechter Einsatz von Adjuvantien bei Immunisierungen. Herausgegeben im Mai 1996 beim Tierschutzseminar am BgVV, Berlin. *ALTEX* **14**, 138.
- Hartinger, J. (1997): Steckbriefe immunologischer Adjuvantien: I. komplettes und inkomplettes Freundsches Adjuvans (FA). *Der Tierschutzbeauftragte* **3/97**, 218-221.
- Hartinger, J. und Mateis, W. (1998): Steckbriefe immunologischer Adjuvantien: II. Aluminium-Gele. *Der Tierschutzbeauftragte* **1/98**, 47-48.
- Hartinger, J., Külbs, D., Volkens, P. and Cussler, K. (2003): Suitability of temperature-sensitive transponders to measure body temperature during animal experiments required for regulatory tests. *ALTEX* **20**, 65-70.
- Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H. (1985): Statistik, Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. 4. Auflage, Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Holmgren, J., Lycke, N. and Czerkinsky, C. (1993): Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* **11**, 1179-1184.
- Ioannou, X.P., Griebel, P., Mena, A., Gomis, S.M., Godson, D.L., Mutwiri, G., Hecker, R., Babiuk, L.A. and Van Drunen Littel-Van den Hurk, S. (2003): Safety of CpG Oligodeoxynucleotides in veterinary species. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **13**, 157-167.
- Kaeberle, M.C. (1986): Function of carriers and adjuvants in induction of immune response. In: Nervig, R.M., Gough, P.M., Kaeberle, M.L., Whitestone, C.A. (eds.): *Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics. Iowa State Univ. Press, Ames, IA*, 11-23.

- Kaisho, T. and Akira, S. (2002): Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim. et Biophys. Acta* **1589** **1**, 1-13.
- Klinman, D.M., Currie, D., Gursel, I., Verthelyi, D. (2004): Use of CpG-oligonucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**, 201-216.
- Lebens, M. and Holmgren, J. (1994): Mucosal vaccines based on the use of cholera toxin B subunit as immunogen and antigen carrier. In: Brown, F (ed.): Recombinant vectors in vaccine development. *Dev. Biol. Stand.* **82**, 215-227.
- Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., Angulo, A.F, Koedam, M.A. and Claassen, E. (1994): Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **40**, 225-241.
- Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., Koedam, A.F., Claassen, I. and Claassen, E. (1995): Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **48**, 123-138.
- Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., Savelkoul, H.F.J., van Rooijen, N. and Claassen, E. (1997): Increased adjuvant efficacy in stimulation of antibody response after macrophage elimination *in vivo*. *Immunol.* **90**, 337-343.
- Lim, S.K. (2003): Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 115-118.
- Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. and Heeg, K. (1997): CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell response to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2340-2344.
- Liu, L., Zhou, X., Shi, J., Xie, X. and Yuan, Z. (2003): Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin. *Immunol.* **110**, 341-347.
- Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Taniguchi, T., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K. and Goto, N. (2002): Effects of Recombinant Cholera Toxin B Subunit on IL-1 $\beta$  Production by Macrophages *In Vitro*. *Microbiol. Immunol.* **46**, 593-599.
- Martin, M.U. and Wesche, H. (2002): Summary and comparison of the signaling mechanism of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochem. Biophys. Acta* **1592**, 265-280.
- Matzinger, P. (2002): The Danger Model: A renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305.
- Mc Cluskie, M.J., Weeratna, R.D. and Davis, H.L. (2000): Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol. Med.* **6**, 867-877.
- Mc Cluskie, M.J., Weeratna, R.D., Payette, P.J., Davis, H.L. (2002): Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. *Immunol. Med. Microbiol.* **32**, 179-185.

- Mc Kenzie, S. and Halsey, J. (1984): Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J. Immunol.* **133**, 1818-1823.
- Militzer, K. (1993): „Unterschiedliche Voraussetzungen für Formen des Leidens bei Mensch und Tier.“ In: Gärtner, K. und Militzer, K. (eds.): Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren. *Schriftenreihe Versuchstierkunde* Heft **14**, Verlag Paul Parey, Berlin.
- Montecucco, C. and Schiavo, G. (1994): Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* **13**, 1-8.
- Morton, D.B. and Griffiths, P.H. (1985): Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Vet.Rec.* **116**, 431-436.
- Newman, M.J. and Powell, M.F. (1995): “Immunological and formulation design considerations for subunit vaccines.” In: Powell, M.F., Newman, M.J. (eds.): Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach. *Plenum Press, New York and London*.
- Nicklas, W. (1992): Aluminium salts. In: 44th Forum in Immunology *Res. Immunol.* **143**, 489-494.
- Persing, D.H., Coler, R.N., Lacy, M.J., Johnson, D.A., Baldrige, J.R., Hershberg, R.M. and Reed, S.G. (2002): Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends in Microbiol.* **10**, 32-37.
- Rajesh, K.G., Rost, B.E., Relyveld, E. and Siber, G.R. (1995): “Adjuvant Properties of aluminium and calcium compounds.” In: Powell, M.F. and Newman, M.J. (eds.): Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach. *Plenum Press, New York*.
- Sachs, L. (2004): *Angewandte Statistik*. 11. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- SAS, SAS Institute Inc., Cary NC, 1999-2001.
- Schijns, V.E. (2000): Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current Opinion in Immunology* **12**, 456-463.
- Schmidt, U., Wagner, H. and Miethke, T. (1999): CpG-DNA upregulates the major acute-phase proteins SAA and SAP. *Cell. Microbiol.* **1**, 61-67.
- Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Röthlisberger, P. and Bachmann, M.F. (2003): Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1465-1470.
- Seeber, S.J., White, J.L., Hem, S.C. (1991): Predicting the adsorption of proteins by aluminium containing adjuvants. *Vaccine* **9**, 201-203.
- Shi, Y., Evans, J.E. and Rock, K.L. (2003): Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516-521.

- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **11**, 1777-1782.
- Suckow, M.A., Bowersock, T.L., Nielsen, K. and Grigdesby, C.F. (1996): Enhancement of respiratory immunity to *Pasteurella multocida* by cholera toxin in rabbits. *Lab. Anim.* **30**, 120-126.
- Tengerdy, R.P. (1989): Vitamin E, immune response, and disease resistance. *Ann. NY Acad. Sci.* **570**, 335-344.
- Tengerdy, R.P. (1990): The role of vitamin E in immune response and disease resistance. *Ann. NY Acad. Sci.* **587**, 24-33.
- Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2002): Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and LPS-activation cluster. *Trends in Immunol.* **23**, 301-304.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M. and Scheller, R.H. (1988): VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4538-4542.
- Urieli-Shoval, S., Cohen, P., Eisenberg, S. and Matzner, Y. (1998): Widespread expression of Serum Amyloid A in histologically normal human tissues: Predominant localization to the epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 1377-1384.
- Vogel, F.R. and Powell, M.F. (1995): A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell, M.F., Newman, M.J. (eds.): *Vaccine design: The subunit and adjuvant approach.* Plenum Press New York, 141-228.
- Warren, H.S., Vogel, F.R. and Chedid, L.A. (1986): Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.* **4**, 369-388.
- Weiner, G.J. (2000): The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J. Leuk. Biol.* **68**, 455-463.
- Wiedemann, F., Link, R., Pumpe, K., Jacobshagen, U., Schaeffer, H.E., Wiesmüller, K.-H., Hummel, R.-P., Jung, G., Bessler, W. und Böltz, T. (1991): Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's Adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P<sub>3</sub>) conjugates. *J. Pathol.* **164**, 265-271.
- Woodard, L.F. (1990): Surface chemistry and classification of vaccine adjuvants in vehicles. *Adv. Biotechnol. Processes* **13**, 281-306.
- Wu, H.Y. and Russell, M.W. (1998): Induction of mucosal and systemic immune response by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **16**, 286-292.
- Yang, Y.-W., Wu, C.-A., Morrow, W.J.W. (2004): Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine* **22**, 1524-1536.

## 9. Anhang

### a) Körpergewicht

Dargestellt sind die statistischen Kennzahlen des Körpergewichts. Es werden für jede Tiergruppe Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum tabellarisch für die Immunisierung, die erste und zweite Boosterung aufgeführt.

Tabelle A 1a: Verlauf des Körpergewichts (g) der Kontrollgruppe

Gruppe	Mittel- Tag	n	wert	1. SD	3. Min. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	Baseline	15	17.1	2.26	13	15.0	16.3	19.3
	0 - Imm.	15	18.1	2.03	16	17.0	17.0	20.0
	1	15	18.3	2.15	16	17.0	17.0	21.0
	3	15	18.3	2.02	15	17.0	18.0	20.0
	7	15	18.7	2.55	16	17.0	17.0	20.0
	8	15	18.5	2.00	16	17.0	18.0	20.0
	10	15	18.6	1.92	16	17.0	18.0	20.0
	14	15	19.0	1.96	16	18.0	19.0	21.0
	15	15	19.1	2.07	16	18.0	19.0	21.0
	17	15	19.3	1.67	17	18.0	19.0	21.0
	21	15	19.3	1.59	17	18.0	19.0	20.0
	22	15	19.3	1.29	18	18.0	19.0	20.0
	24	15	19.4	1.40	18	18.0	19.0	20.0
	28 - Imm.	15	19.7	1.49	18	18.0	20.0	21.0
	29	15	19.9	1.77	18	18.0	19.0	22.0
	31	15	19.5	1.30	18	19.0	19.0	20.0
	35	15	20.0	1.20	18	19.0	20.0	21.0
	36	15	20.1	1.25	18	19.0	20.0	21.0
	38	15	20.2	1.15	18	19.0	20.0	21.0
	42	15	20.8	1.26	19	20.0	21.0	21.0
	43	15	20.7	1.28	18	20.0	21.0	22.0
	45	15	20.7	1.10	19	20.0	21.0	22.0
	49	15	20.9	1.10	19	20.0	21.0	22.0
	50	15	20.7	1.16	19	20.0	21.0	22.0
	52	15	20.8	0.94	19	20.0	21.0	22.0
	56 - Imm.	15	21.1	0.92	19	21.0	21.0	22.0
	57	15	20.9	0.96	20	20.0	21.0	22.0
	59	15	21.1	1.16	19	20.0	21.0	22.0
	63	15	21.0	0.93	19	21.0	21.0	21.0
	64	15	21.2	1.01	20	20.0	21.0	22.0
	66	15	21.1	1.19	19	20.0	21.0	22.0
	70	15	21.5	1.19	19	21.0	21.0	23.0
	71	15	21.4	1.12	19	21.0	21.0	22.0
	73	15	21.5	1.13	19	21.0	21.0	23.0
	77	15	21.3	1.05	19	21.0	21.0	22.0
	78	15	21.5	1.13	19	21.0	22.0	22.0
	80	15	21.5	0.99	20	21.0	22.0	22.0
	84 - Imm.	15	22.1	1.03	20	21.0	22.0	23.0

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1b: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 1

Gruppe	Mittel- Tag	n	wert	1. SD	3. Min. Quartil	Median	Quartil	Max.
KLH-rSyb2(70-76) +PBS	Baseline	15	17.5	2.54	14	15.7	17.0	20.7 22
0 - Imm.	15	18.0	2.24	15	16.0	17.0	20.0	22
1	15	18.7	2.05	16	17.0	19.0	21.0	22
3	15	18.5	1.96	16	17.0	18.0	21.0	22
7	15	18.3	1.98	16	17.0	17.0	20.0	22
8	15	18.6	1.76	17	17.0	18.0	21.0	21
10	15	18.9	2.05	16	17.0	18.0	21.0	22
14	15	19.4	1.84	17	18.0	19.0	21.0	22
15	15	19.5	1.60	17	18.0	19.0	21.0	22
17	15	19.3	1.59	17	18.0	19.0	21.0	22
21	15	19.7	1.45	18	18.0	19.0	21.0	22
22	15	19.8	1.26	18	19.0	19.0	20.0	22
24	15	19.7	1.35	18	19.0	19.0	21.0	22
28 - Imm.	15	19.8	1.47	18	19.0	19.0	21.0	22
29	15	19.9	1.68	18	18.0	19.0	22.0	22
31	15	19.9	1.41	18	19.0	19.0	21.0	22
35	15	20.2	1.42	19	19.0	20.0	22.0	23
36	15	20.1	1.30	19	19.0	20.0	22.0	22
38	15	20.3	1.33	19	19.0	20.0	22.0	22
42	15	20.3	0.88	19	20.0	20.0	21.0	22
43	15	19.7	1.53	18	18.0	20.0	21.0	22
45	15	20.2	0.86	19	20.0	20.0	21.0	22
49	15	20.9	0.92	19	20.0	21.0	22.0	22
50	15	20.5	0.99	19	20.0	20.0	21.0	22
52	15	20.9	0.59	20	21.0	21.0	21.0	22
56 - Imm.	15	21.1	0.88	20	20.0	21.0	22.0	23
57	15	20.9	0.74	20	20.0	21.0	21.0	22
59	15	21.0	0.76	20	20.0	21.0	22.0	22
63	15	20.7	0.80	20	20.0	21.0	21.0	22
64	15	21.1	0.99	20	20.0	21.0	22.0	23
66	15	20.8	0.94	19	20.0	21.0	22.0	22
70	15	21.2	1.01	19	21.0	21.0	22.0	23
71	15	21.0	1.07	19	20.0	21.0	22.0	23
73	15	21.4	0.91	20	21.0	22.0	22.0	23
77	15	21.2	0.77	20	21.0	21.0	22.0	22
78	15	21.2	1.08	19	20.0	21.0	22.0	23
80	15	21.5	0.74	20	21.0	22.0	22.0	22
84 - Imm.	15	22.0	0.76	21	21.0	22.0	23.0	23

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1c: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 2

Gruppe	Tag	Mittel-	1.		3.		Quartil	Max.	
		n	wert	SD	Min.	Median			
KLH-rSyb2(70-76) +Specol	Baseline	15	17.4	2.24	14	15.7	16.7	20.0	21
0 - Imm.	15	15	18.1	2.33	15	16.0	18.0	21.0	21
1	15	15	18.9	2.03	16	17.0	18.0	21.0	22
3	15	15	19.1	1.85	17	17.0	19.0	21.0	22
7	15	15	19.7	1.95	17	18.0	19.0	22.0	23
8	15	15	19.4	1.64	17	18.0	19.0	21.0	22
10	15	15	19.7	1.87	17	18.0	19.0	21.0	23
14	15	15	20.3	1.58	18	19.0	20.0	22.0	23
15	15	15	20.4	1.55	18	19.0	20.0	22.0	22
17	15	15	20.3	1.62	18	19.0	20.0	22.0	22
21	15	15	20.3	1.50	18	19.0	20.0	22.0	22
22	15	15	20.4	1.45	18	19.0	20.0	22.0	23
24	15	15	20.7	1.72	18	19.0	20.0	22.0	23
28 - Imm.	15	15	20.9	1.60	18	20.0	20.0	23.0	23
29	15	15	20.7	1.67	18	20.0	21.0	22.0	23
31	15	15	20.3	1.50	17	20.0	20.0	22.0	22
35	15	15	20.9	1.44	18	20.0	21.0	22.0	23
36	15	15	21.1	1.58	19	20.0	21.0	22.0	24
38	15	15	21.3	1.68	19	20.0	22.0	23.0	24
42	15	15	21.5	1.77	19	20.0	22.0	23.0	24
43	15	15	21.4	1.40	19	20.0	22.0	23.0	23
45	15	15	22.0	1.36	19	21.0	22.0	23.0	24
49	15	15	22.1	1.62	19	21.0	22.0	24.0	24
50	15	15	21.9	1.67	19	20.0	22.0	23.0	24
52	15	15	22.2	1.78	19	21.0	23.0	23.0	26
56 - Imm.	15	15	22.1	1.36	20	21.0	22.0	23.0	25
57	15	15	21.9	1.53	20	20.0	22.0	23.0	24
59	15	15	22.2	1.37	20	21.0	22.0	23.0	25
63	15	15	22.1	1.55	19	21.0	22.0	23.0	25
64	15	15	22.1	1.68	19	21.0	22.0	23.0	25
66	15	15	22.5	1.41	20	22.0	23.0	23.0	25
70	15	15	22.7	1.05	21	22.0	23.0	23.0	25
71	15	15	22.5	1.25	20	22.0	23.0	23.0	25
73	15	15	22.7	1.22	21	22.0	23.0	24.0	25
77	15	15	22.7	1.29	20	22.0	23.0	23.0	25
78	15	15	22.8	1.01	21	22.0	23.0	23.0	25
80	15	15	23.0	1.20	21	22.0	23.0	24.0	25
84 - Imm.	15	15	23.2	1.32	21	22.0	23.0	24.0	25

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum



Tabelle A 1d: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 3

Gruppe	Mittel- Tag	n	wert	1. SD	Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
ChTxB+rSyb2(70-76) +PBS	Baseline	15	17.4	1.86	15	15.7	17.0	19.3	20
0 - Imm.	15	18.3	1.67	16	17.0	18.0	20.0	21	
1	15	18.6	1.68	16	17.0	18.0	20.0	21	
3	15	18.5	1.85	16	17.0	18.0	20.0	22	
7	15	18.7	1.76	16	17.0	18.0	21.0	21	
8	15	18.7	1.62	16	17.0	19.0	20.0	21	
10	15	19.1	1.51	17	18.0	19.0	21.0	21	
14	15	19.3	1.33	17	18.0	19.0	21.0	21	
15	15	19.1	1.30	17	18.0	19.0	20.0	21	
17	15	19.6	1.30	18	19.0	19.0	21.0	22	
21	15	19.3	1.39	17	18.0	19.0	20.0	22	
22	15	19.4	1.18	17	19.0	19.0	20.0	21	
24	15	19.6	1.18	18	19.0	19.0	21.0	21	
28 - Imm.	15	20.0	1.41	18	19.0	20.0	21.0	22	
29	15	20.0	1.41	18	19.0	20.0	21.0	22	
31	15	20.1	1.19	18	19.0	20.0	21.0	22	
35	15	20.1	1.46	18	19.0	20.0	22.0	22	
36	15	20.3	1.40	18	19.0	20.0	22.0	22	
38	15	20.3	1.54	18	19.0	20.0	22.0	23	
42	15	20.7	1.54	19	19.0	20.0	22.0	23	
43	15	20.8	1.32	19	20.0	20.0	22.0	23	
45	15	21.1	1.53	19	20.0	20.0	23.0	24	
49	15	20.9	1.25	19	20.0	20.0	22.0	23	
50	15	20.9	1.36	19	20.0	20.0	22.0	23	
52	15	20.9	1.41	19	20.0	20.0	22.0	24	
56 - Imm.	15	21.3	0.96	20	20.0	21.0	22.0	23	
57	15	20.9	0.96	19	20.0	21.0	22.0	22	
59	15	21.1	1.22	19	20.0	21.0	22.0	23	
63	15	21.1	1.41	19	20.0	21.0	22.0	23	
64	15	21.5	1.25	19	21.0	22.0	23.0	23	
66	15	21.4	1.06	20	20.0	22.0	22.0	23	
70	15	21.5	0.64	20	21.0	22.0	22.0	22	
71	15	21.5	0.92	20	21.0	22.0	22.0	23	
73	15	21.7	1.10	20	21.0	22.0	23.0	23	
77	15	21.5	0.92	20	21.0	21.0	22.0	23	
78	15	21.5	0.83	20	21.0	22.0	22.0	23	
80	15	21.6	0.63	20	21.0	22.0	22.0	22	
84 - Imm.	15	21.9	0.70	21	21.0	22.0	22.0	23	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1e: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 4

Gruppe	Tag	Mittel-	1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Median		
KLH-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	Baseline	15	17.3	2.21	15	15.7	16.7	21
	0 - Imm.	15	18.3	2.06	16	16.0	18.0	21.0
	1	15	17.0	1.60	15	16.0	17.0	19.0
	3	15	17.6	1.88	15	16.0	17.0	19.0
	7	15	18.9	2.19	16	17.0	19.0	21.0
	8	15	18.7	1.98	16	17.0	18.0	21.0
	10	15	18.8	1.74	17	17.0	18.0	21.0
	14	15	19.4	1.50	17	18.0	19.0	21.0
	15	15	19.7	1.59	18	18.0	19.0	21.0
	17	15	19.7	1.33	18	18.0	20.0	21.0
	21	15	19.6	1.64	17	18.0	19.0	21.0
	22	15	19.7	1.54	17	18.0	20.0	21.0
	24	15	19.6	2.06	17	18.0	19.0	22.0
	28 - Imm.	15	19.9	1.91	17	18.0	19.0	22.0
	29	15	18.9	1.51	16	18.0	19.0	20.0
	31	15	19.1	1.60	16	18.0	19.0	21.0
	35	15	19.9	1.10	18	19.0	20.0	21.0
	36	15	20.1	1.44	18	19.0	20.0	22.0
	38	15	20.1	1.77	17	19.0	20.0	22.0
	42	15	20.5	2.10	17	19.0	20.0	23.0
	43	15	20.5	1.73	17	20.0	20.0	22.0
	45	15	20.9	1.60	18	20.0	21.0	22.0
	49	15	20.9	1.53	18	20.0	21.0	22.0
	50	15	20.9	1.96	18	19.0	21.0	23.0
	52	15	20.7	1.88	18	19.0	21.0	22.0
	56 - Imm.	15	20.9	1.39	18	20.0	21.0	22.0
	57	15	19.5	1.25	17	19.0	20.0	21.0
	59	15	20.6	1.55	18	20.0	21.0	22.0
	63	15	20.9	1.67	18	20.0	21.0	22.0
	64	15	21.2	1.66	19	20.0	21.0	23.0
	66	15	21.1	1.68	18	20.0	21.0	23.0
	70	15	21.4	1.35	19	20.0	22.0	22.0
	71	15	21.5	1.30	19	20.0	22.0	23.0
	73	15	21.7	1.63	19	20.0	22.0	23.0
	77	15	21.5	1.60	19	20.0	21.0	23.0
	78	15	21.7	1.63	19	20.0	22.0	23.0
	80	15	21.9	1.49	19	21.0	22.0	23.0
	84 - Imm.	15	21.7	1.16	20	21.0	22.0	22.0

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1f: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 5

Gruppe	Mittel-		1.		3.		Max.		
	Tag	n	wert	SD	Min.	Quartil			
KLH-rSyb2(70-76) AdjuPrime	Baseline	15	17.6	2.41	15	15.3	17.3	20.7	21
0 - Imm.	15	18.6	1.99	17	17.0	18.0	21.0	22	
1	15	18.9	1.83	17	17.0	18.0	21.0	22	
3	15	18.9	1.68	17	17.0	19.0	21.0	22	
7	15	19.1	1.98	17	17.0	19.0	21.0	22	
8	15	19.1	1.91	17	17.0	19.0	21.0	22	
10	15	19.2	1.70	17	18.0	19.0	21.0	22	
14	15	19.6	1.64	17	18.0	20.0	21.0	22	
15	15	19.5	1.60	17	18.0	19.0	21.0	22	
17	15	19.7	1.44	18	19.0	19.0	21.0	22	
21	15	19.9	1.55	18	19.0	19.0	22.0	22	
22	15	19.8	1.37	18	19.0	19.0	21.0	22	
24	15	20.0	1.65	18	19.0	19.0	21.0	23	
28 - Imm.	15	20.3	1.79	18	19.0	20.0	22.0	24	
29	15	20.2	1.61	18	19.0	20.0	22.0	23	
31	15	20.2	1.42	19	19.0	20.0	21.0	23	
35	15	20.6	1.59	18	19.0	20.0	22.0	23	
36	15	20.5	1.73	18	19.0	20.0	22.0	23	
38	15	20.9	1.55	19	20.0	20.0	23.0	23	
42	15	20.7	1.67	19	20.0	20.0	21.0	24	
43	15	21.0	1.60	19	20.0	21.0	22.0	24	
45	15	21.2	1.52	19	20.0	21.0	22.0	24	
49	15	21.3	1.45	19	20.0	21.0	23.0	24	
50	15	21.3	1.33	20	20.0	21.0	22.0	24	
52	15	21.4	1.30	20	20.0	22.0	23.0	23	
56 - Imm.	15	21.3	1.22	20	20.0	21.0	23.0	23	
57	15	21.1	1.28	19	20.0	21.0	22.0	23	
59	15	21.3	1.23	20	20.0	21.0	22.0	24	
63	15	21.3	1.22	20	20.0	21.0	23.0	23	
64	15	21.5	1.36	20	20.0	21.0	23.0	24	
66	15	21.7	1.33	20	21.0	22.0	23.0	24	
70	15	21.9	1.25	20	21.0	22.0	23.0	24	
71	15	21.8	1.15	20	21.0	22.0	22.0	24	
73	15	22.3	1.10	21	21.0	22.0	23.0	24	
77	15	22.0	1.20	20	21.0	22.0	23.0	24	
78	15	22.3	1.03	21	21.0	22.0	23.0	24	
80	15	22.0	0.93	21	21.0	22.0	23.0	24	
84 - Imm.	15	21.9	0.99	20	21.0	22.0	22.0	24	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1g: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 6

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Max.
		n	wert	SD	Min.	Quartil	Median	
KLH-rSyb2(70-76)	Baseline	15	17.4	2.47	12	16.0	17.0	19.7
Algen-LPS	Baseline	15	17.4	2.47	12	16.0	17.0	19.7
0 - Imm.	15	18.3	2.55	12	17.0	18.0	20.0	23
1	15	18.1	2.45	12	17.0	18.0	20.0	22
3	15	18.5	2.33	13	17.0	18.0	20.0	23
7	15	18.7	2.40	14	17.0	18.0	21.0	23
8	15	18.8	2.08	14	18.0	18.0	20.0	23
10	15	19.0	2.07	14	18.0	19.0	20.0	23
14	15	19.5	2.45	14	18.0	19.0	21.0	24
15	15	19.5	2.20	15	18.0	19.0	21.0	24
17	15	19.8	2.27	15	18.0	20.0	22.0	24
21	15	19.6	2.23	14	19.0	19.0	21.0	24
22	15	19.6	2.29	14	18.0	20.0	21.0	24
24	15	19.7	2.35	14	19.0	20.0	21.0	24
28 - Imm.	15	19.9	2.31	14	19.0	20.0	22.0	24
29	15	19.8	2.34	14	18.0	20.0	22.0	24
31	15	19.6	2.13	14	18.0	20.0	21.0	23
35	15	20.0	2.14	14	19.0	20.0	21.0	23
36	15	20.1	2.19	14	19.0	20.0	21.0	24
38	15	20.2	1.93	15	19.0	20.0	22.0	23
42	15	20.7	2.16	16	19.0	21.0	22.0	25
43	15	20.8	1.82	17	20.0	21.0	22.0	25
45	15	21.2	1.97	18	20.0	21.0	22.0	26
49	15	21.1	1.81	18	20.0	21.0	22.0	25
50	15	21.0	1.93	18	19.0	21.0	23.0	25
52	15	21.3	1.76	18	20.0	21.0	23.0	25
56 - Imm.	15	21.5	1.77	18	20.0	22.0	23.0	25
57	15	21.3	2.02	18	20.0	21.0	22.0	26
59	15	21.4	1.72	18	20.0	22.0	22.0	25
63	15	21.3	1.71	18	20.0	21.0	22.0	25
64	15	21.2	1.82	18	20.0	21.0	22.0	25
66	15	21.4	1.55	19	21.0	21.0	22.0	25
70	15	22.1	1.77	19	21.0	22.0	23.0	26
71	15	21.9	1.79	19	21.0	22.0	23.0	26
73	15	22.0	1.73	19	21.0	22.0	23.0	26
77	15	21.9	1.79	19	21.0	22.0	23.0	26
78	15	21.9	1.79	19	21.0	22.0	23.0	26
80	15	22.0	1.73	19	21.0	22.0	23.0	26
84 - Imm.	15	22.0	1.25	20	21.0	22.0	23.0	24

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1h: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 7

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Quartil	Median		
ChTxB-rSyb2(70-76) +Specol	Baseline	15	17.7	1.77	15	16.7	17.0	19.7	21
0 - Imm.	15	18.4	1.92	16	17.0	18.0	20.0	22	
1	15	19.0	1.77	16	18.0	19.0	21.0	22	
3	15	18.9	1.51	17	18.0	19.0	20.0	22	
7	15	19.3	2.12	16	18.0	19.0	21.0	23	
8	15	19.5	2.00	16	18.0	19.0	21.0	23	
10	15	19.6	1.80	16	18.0	19.0	21.0	23	
14	15	19.8	1.74	16	19.0	20.0	21.0	23	
15	15	19.7	1.58	17	19.0	20.0	21.0	23	
17	15	19.9	1.79	17	19.0	20.0	21.0	24	
21	15	20.1	1.53	17	19.0	20.0	21.0	23	
22	15	20.0	1.65	17	19.0	20.0	21.0	23	
24	15	20.1	1.92	17	19.0	20.0	22.0	24	
28 - Imm.	15	20.3	1.87	18	19.0	20.0	22.0	24	
29	15	20.5	1.51	18	19.0	20.0	22.0	23	
31	15	20.3	1.58	18	19.0	20.0	22.0	23	
35	15	20.4	1.80	17	19.0	20.0	22.0	23	
36	15	20.5	1.85	17	19.0	20.0	22.0	23	
38	15	20.5	1.85	17	19.0	20.0	22.0	23	
42	15	20.6	1.84	18	19.0	21.0	22.0	24	
43	15	20.4	1.92	17	19.0	21.0	22.0	24	
45	15	20.7	1.67	18	19.0	21.0	22.0	24	
49	15	20.9	1.64	18	20.0	21.0	22.0	24	
50	15	20.8	2.08	17	19.0	21.0	22.0	25	
52	15	21.0	1.89	18	19.0	21.0	22.0	25	
56 - Imm.	15	21.3	1.80	18	20.0	21.0	23.0	25	
57	15	21.2	1.97	17	20.0	21.0	23.0	25	
59	15	21.0	1.77	18	20.0	21.0	22.0	25	
63	15	21.1	1.81	18	20.0	21.0	22.0	25	
64	15	21.3	1.80	19	20.0	21.0	23.0	25	
66	15	21.3	1.79	18	20.0	21.0	23.0	25	
70	15	21.7	1.67	19	20.0	22.0	23.0	25	
71	15	21.4	1.40	19	20.0	21.0	23.0	24	
73	15	21.9	1.64	19	21.0	22.0	23.0	25	
77	15	21.9	1.64	19	21.0	22.0	23.0	25	
78	15	21.9	1.44	19	21.0	22.0	23.0	25	
80	15	21.9	1.88	19	20.0	22.0	24.0	25	
84 - Imm.	15	21.6	1.59	19	21.0	21.0	23.0	25	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1i: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 8

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Median	Quartil		
ChTxB-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	Baseline	15	17.5	1.91	15	16.3	16.7	19.7	21
0 - Imm.	15	18.2	1.82	16	17.0	18.0	20.0	21	
1	15	16.8	1.57	15	16.0	16.0	18.0	20	
3	15	17.4	1.84	15	16.0	17.0	19.0	21	
7	15	18.4	1.92	16	17.0	18.0	20.0	22	
8	15	18.7	1.76	17	17.0	18.0	20.0	22	
10	15	18.8	1.52	17	18.0	18.0	20.0	22	
14	15	19.1	1.46	18	18.0	19.0	20.0	22	
15	15	19.5	1.77	17	18.0	19.0	20.0	23	
17	15	19.5	1.51	18	18.0	19.0	20.0	23	
21	15	19.6	1.45	18	19.0	19.0	20.0	23	
22	15	19.6	1.45	18	18.0	19.0	20.0	22	
24	15	19.2	2.14	16	18.0	19.0	20.0	23	
28 - Imm.	15	19.7	1.83	17	18.0	19.0	21.0	23	
29	15	18.8	1.32	17	18.0	19.0	19.0	21	
31	15	19.1	1.58	17	18.0	19.0	20.0	22	
35	15	19.7	1.40	18	19.0	19.0	20.0	22	
36	15	19.9	1.68	18	19.0	19.0	21.0	23	
38	15	19.9	1.71	18	19.0	19.0	21.0	23	
42	15	20.3	1.76	17	19.0	20.0	22.0	23	
43	15	20.3	1.58	18	19.0	20.0	21.0	23	
45	15	20.8	1.52	18	20.0	20.0	22.0	23	
49	15	20.7	1.63	18	20.0	20.0	21.0	24	
50	15	20.9	1.81	18	20.0	20.0	22.0	24	
52	15	20.7	1.62	18	20.0	20.0	22.0	24	
56 - Imm.	15	20.5	1.68	18	19.0	20.0	21.0	24	
57	15	19.3	1.40	18	18.0	19.0	20.0	22	
59	15	20.3	1.53	18	19.0	20.0	22.0	23	
63	15	20.9	1.73	18	20.0	20.0	22.0	24	
64	15	21.0	1.93	18	19.0	21.0	23.0	24	
66	15	20.9	1.60	18	20.0	21.0	22.0	24	
70	15	21.2	1.61	18	20.0	21.0	22.0	24	
71	15	21.1	1.67	18	20.0	21.0	22.0	24	
73	15	21.3	1.72	18	20.0	21.0	23.0	24	
77	15	21.3	1.62	18	20.0	21.0	22.0	24	
78	15	21.3	1.58	19	20.0	21.0	22.0	24	
80	15	21.5	1.13	19	21.0	21.0	22.0	23	
84 - Imm.	15	21.7	1.22	19	21.0	22.0	23.0	24	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1j: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 9

Gruppe	Tag	Mittel-	1.		3.		Quartil	Max.	
		n	wert	SD	Min.	Median			
ChTxB+rSyb2(70-76) +AdjuPrime	Baseline	15	17.9	2.30	15	16.0	17.0	21.0	21
0 - Imm.	15	18.8	2.31	16	17.0	18.0	22.0	22	
1	15	18.9	2.37	16	17.0	18.0	22.0	22	
3	15	18.9	2.28	16	17.0	18.0	21.0	23	
7	15	18.9	2.50	16	17.0	18.0	22.0	23	
8	15	18.8	2.11	16	17.0	18.0	21.0	23	
10	15	19.1	2.12	17	17.0	18.0	21.0	23	
14	15	19.7	2.16	17	18.0	19.0	22.0	23	
15	15	19.4	2.26	16	18.0	18.0	22.0	23	
17	15	19.3	1.95	17	18.0	19.0	21.0	23	
21	15	19.4	1.88	17	18.0	19.0	21.0	23	
22	15	19.6	1.92	17	18.0	19.0	22.0	23	
24	15	19.7	1.76	18	18.0	19.0	21.0	23	
28 - Imm.	15	20.2	2.04	18	19.0	19.0	22.0	24	
29	15	20.0	1.96	18	18.0	19.0	22.0	24	
31	15	19.9	1.92	17	18.0	19.0	22.0	23	
35	15	20.0	1.81	18	18.0	20.0	22.0	23	
36	15	20.2	1.97	18	18.0	20.0	22.0	23	
38	15	20.1	2.03	18	18.0	20.0	22.0	23	
42	15	20.5	2.26	17	18.0	21.0	23.0	24	
43	15	20.3	2.06	18	18.0	20.0	22.0	24	
45	15	20.5	2.00	18	19.0	21.0	22.0	24	
49	15	20.7	1.87	18	19.0	20.0	23.0	24	
50	15	20.3	2.13	17	19.0	20.0	23.0	24	
52	15	20.6	2.03	18	19.0	20.0	23.0	24	
56 - Imm.	15	20.8	1.86	18	19.0	21.0	23.0	23	
57	15	20.8	1.78	18	19.0	21.0	22.0	24	
59	15	20.9	1.94	18	19.0	21.0	23.0	24	
63	15	20.7	2.05	18	19.0	20.0	23.0	24	
64	15	21.0	1.93	18	19.0	21.0	23.0	24	
66	15	20.9	1.91	18	19.0	21.0	23.0	24	
70	15	21.2	1.66	19	20.0	21.0	23.0	24	
71	15	21.0	1.77	19	19.0	21.0	23.0	24	
73	15	21.5	1.92	19	20.0	21.0	23.0	25	
77	15	21.3	1.79	19	19.0	21.0	23.0	24	
78	15	21.3	1.80	19	20.0	21.0	23.0	24	
80	15	21.5	1.77	19	20.0	21.0	23.0	24	
84 - Imm.	15	21.5	1.96	19	20.0	21.0	24.0	24	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1k: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 10

Gruppe	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
	Tag	n	wert	SD	Min.	Median		
ChTxB-rSyb2(70-76) +Algen-LPS	Baseline	15	17.8	2.03	15	16.7	17.0	20.0 21
0 - Imm.	15	15	18.3	1.91	16	17.0	17.0	20.0 22
1	15	15	18.3	1.62	16	17.0	18.0	20.0 21
3	15	15	18.5	1.68	16	17.0	18.0	20.0 21
7	15	15	19.2	1.90	17	18.0	18.0	21.0 23
8	15	15	19.1	1.73	17	18.0	18.0	21.0 22
10	15	15	19.2	1.66	17	18.0	18.0	21.0 22
14	15	15	19.6	1.40	18	18.0	19.0	21.0 22
15	15	15	19.9	2.09	18	18.0	19.0	22.0 24
17	15	15	19.9	1.41	18	19.0	20.0	21.0 22
21	15	15	19.8	1.52	18	18.0	20.0	21.0 22
22	15	15	20.1	1.28	18	19.0	20.0	21.0 22
24	15	15	20.1	1.53	18	19.0	20.0	21.0 23
28 - Imm.	15	15	20.1	1.44	18	19.0	20.0	21.0 23
29	15	15	20.1	1.36	19	19.0	20.0	21.0 23
31	15	15	20.1	1.03	19	19.0	20.0	21.0 22
35	15	15	20.5	0.92	19	20.0	20.0	21.0 22
36	15	15	20.5	1.25	19	20.0	20.0	21.0 23
38	15	15	20.8	1.32	19	20.0	20.0	22.0 23
42	15	15	20.9	1.46	19	20.0	20.0	22.0 24
43	15	15	20.9	1.41	19	20.0	21.0	22.0 24
45	15	15	21.4	1.35	20	20.0	22.0	22.0 24
49	15	15	21.4	1.45	19	20.0	21.0	22.0 24
50	15	15	21.3	1.50	19	20.0	21.0	22.0 24
52	15	15	21.2	1.21	20	20.0	21.0	22.0 24
56 - Imm.	15	15	21.3	0.90	20	21.0	21.0	22.0 23
57	15	15	21.3	1.05	20	21.0	21.0	22.0 23
59	15	15	21.4	1.18	20	21.0	21.0	22.0 24
63	15	15	21.8	1.26	20	21.0	22.0	23.0 24
64	15	15	22.0	1.31	20	21.0	22.0	23.0 24
66	15	15	21.9	1.25	20	21.0	22.0	23.0 24
70	15	15	22.2	1.32	21	21.0	22.0	23.0 25
71	15	15	21.8	1.37	20	21.0	22.0	23.0 24
73	15	15	22.2	1.42	20	21.0	22.0	24.0 25
77	15	15	22.4	1.06	21	22.0	22.0	23.0 24
78	15	15	22.4	0.99	21	22.0	22.0	23.0 24
80	15	15	22.2	1.15	21	21.0	22.0	23.0 24
84 - Imm.	15	15	22.1	1.30	20	21.0	22.0	23.0 24

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum



Tabelle A 11: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 11

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Median	Quartil		
ChTxB-rSyb2(70-76) +AL(OH)3	Baseline	15	17.8	1.88	15	16.3	17.0	19.7	21
0 - Imm.	15	18.5	1.55	16	17.0	18.0	20.0	21	
1	15	19.0	1.65	16	18.0	19.0	20.0	22	
3	15	18.9	1.49	17	18.0	19.0	20.0	22	
7	15	19.1	1.62	17	18.0	19.0	21.0	22	
8	15	18.9	1.16	17	18.0	19.0	20.0	21	
10	15	19.1	1.22	17	18.0	19.0	20.0	21	
14	15	19.3	1.29	18	18.0	19.0	20.0	22	
15	15	19.9	1.64	18	18.0	20.0	21.0	23	
17	15	19.6	1.18	18	19.0	20.0	20.0	22	
21	15	19.6	0.99	17	19.0	20.0	20.0	21	
22	15	19.7	0.62	19	19.0	20.0	20.0	21	
24	15	20.1	0.88	19	19.0	20.0	21.0	21	
28 - Imm.	15	20.1	1.16	19	19.0	20.0	21.0	22	
29	15	20.3	1.16	19	19.0	20.0	21.0	22	
31	15	20.1	0.96	19	19.0	20.0	21.0	22	
35	15	20.4	1.12	19	19.0	20.0	21.0	22	
36	15	20.7	1.18	19	20.0	20.0	22.0	23	
38	15	20.6	1.35	19	19.0	20.0	22.0	23	
42	15	20.9	1.16	19	20.0	21.0	22.0	23	
43	15	20.8	0.77	20	20.0	21.0	21.0	22	
45	15	21.3	0.88	20	21.0	21.0	22.0	23	
49	15	20.9	0.80	20	20.0	21.0	22.0	22	
50	15	21.2	0.94	20	20.0	22.0	22.0	22	
52	15	21.5	0.74	20	21.0	21.0	22.0	23	
56 - Imm.	15	21.0	1.00	19	20.0	21.0	22.0	23	
57	15	21.1	1.06	19	20.0	21.0	22.0	23	
59	15	21.1	0.99	19	21.0	21.0	22.0	23	
63	15	21.2	0.94	20	20.0	21.0	22.0	23	
64	15	21.1	1.06	19	20.0	21.0	22.0	23	
66	15	21.4	0.83	20	21.0	21.0	22.0	23	
70	15	21.5	0.64	21	21.0	21.0	22.0	23	
71	15	21.7	0.82	20	21.0	22.0	22.0	23	
73	15	21.9	1.03	20	21.0	22.0	23.0	23	
77	15	21.9	0.96	20	21.0	22.0	23.0	23	
78	15	22.1	1.03	20	21.0	22.0	23.0	24	
80	15	22.3	0.96	21	22.0	22.0	23.0	24	
84 - Imm.	15	21.9	1.03	21	21.0	22.0	23.0	24	

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1m: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 12

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Quartil	Median		
ChTxB-rSyb2(70-76) +Diluvac	Baseline	15	17.8	2.19	15	16.0	16.7	20.0	22
	0 - Imm.	15	18.6	1.92	17	17.0	18.0	20.0	23
	1	15	19.0	2.27	17	17.0	18.0	21.0	24
	3	15	18.7	1.87	17	17.0	18.0	20.0	23
	7	15	18.5	2.13	16	17.0	18.0	20.0	23
	8	15	18.7	1.72	17	17.0	18.0	20.0	22
	10	15	19.1	1.88	17	18.0	19.0	21.0	23
	14	15	19.3	1.84	17	18.0	19.0	21.0	23
	15	15	19.9	2.69	17	18.0	19.0	23.0	24
	17	15	19.9	1.73	17	19.0	19.0	21.0	24
	21	15	19.3	1.54	17	18.0	19.0	20.0	23
	22	15	19.6	1.30	18	19.0	19.0	21.0	22
	24	15	19.5	1.68	17	18.0	19.0	21.0	23
	28 - Imm.	15	19.7	1.72	18	18.0	19.0	21.0	23
	29	15	19.7	1.53	18	19.0	19.0	21.0	23
	31	15	19.7	1.45	18	19.0	19.0	21.0	22
	35	15	19.9	1.64	17	19.0	20.0	22.0	22
	36	15	19.9	1.44	18	19.0	20.0	21.0	23
	38	15	20.1	1.75	17	19.0	20.0	22.0	23
	42	15	20.3	1.75	17	19.0	20.0	22.0	23
	43	15	20.0	1.89	17	19.0	19.0	22.0	23
	45	15	20.5	1.51	18	19.0	20.0	22.0	23
	49	15	20.5	1.60	18	19.0	20.0	22.0	23
	50	15	20.3	1.62	18	19.0	20.0	22.0	23
	52	15	20.6	1.76	18	19.0	21.0	22.0	24
	56 - Imm.	15	20.5	1.73	18	19.0	20.0	22.0	24
	57	15	20.7	1.58	18	20.0	20.0	22.0	23
	59	15	20.7	1.62	18	20.0	20.0	22.0	24
	63	15	20.5	1.73	18	19.0	20.0	22.0	24
	64	15	20.9	1.77	19	20.0	20.0	22.0	25
	66	15	20.8	1.61	18	20.0	21.0	22.0	24
	70	15	21.3	1.58	18	20.0	21.0	23.0	24
	71	15	21.0	1.60	18	20.0	21.0	22.0	24
	73	15	21.4	1.68	18	20.0	21.0	23.0	24
	77	15	21.2	1.70	18	20.0	21.0	23.0	24
	78	15	21.3	1.54	18	20.0	21.0	23.0	24
	80	15	21.1	1.68	18	20.0	21.0	23.0	24
	84 - Imm.	15	21.3	1.84	19	20.0	21.0	23.0	25

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1n: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 13

Gruppe	Tag	Mittel-		1.		3.		Quartil	Max.
		n	wert	SD	Min.	Median			
ChTxB-rSyb2(70-76) +PBS(oral)	Baseline	15	17.5	2.21	15	16.0	17.0	20.0	22
	0	15	18.0	2.07	16	16.0	17.0	20.0	22
	1	15	18.5	1.73	17	17.0	18.0	20.0	22
	3	15	18.3	1.84	17	17.0	17.0	20.0	22
	7	15	18.5	1.85	17	17.0	18.0	20.0	22
	8	15	18.3	1.62	17	17.0	18.0	19.0	22
	10	15	18.5	1.60	17	17.0	18.0	20.0	22
	14	15	19.0	1.60	17	18.0	19.0	20.0	22
	15	15	18.9	1.58	17	18.0	18.0	20.0	22
	17	15	19.0	1.73	17	18.0	19.0	21.0	22
	21	15	19.1	1.41	17	18.0	19.0	20.0	22
	22	15	19.4	1.40	18	18.0	19.0	20.0	22
	24	15	19.3	1.53	17	18.0	19.0	20.0	22
	28	15	19.7	1.62	18	18.0	19.0	21.0	23
	29	15	19.3	1.45	17	18.0	19.0	20.0	22
	31	15	19.4	1.35	17	18.0	19.0	20.0	22
	35	15	19.6	1.12	18	19.0	20.0	21.0	21
	36	15	19.4	1.35	18	18.0	19.0	21.0	22
	38	15	19.9	1.55	18	18.0	20.0	21.0	22
	42	15	19.9	1.60	17	19.0	20.0	21.0	23
	43	15	20.0	1.65	18	18.0	20.0	21.0	23
	45	15	20.1	1.64	17	19.0	20.0	21.0	23
	49	15	20.3	1.76	18	19.0	21.0	22.0	23
	50	15	20.5	1.68	18	19.0	21.0	22.0	23
	52	15	20.5	2.03	17	19.0	21.0	22.0	23
	56	15	20.7	1.59	18	19.0	21.0	22.0	23
	57	15	20.5	1.68	18	19.0	20.0	22.0	23
	59	15	20.3	1.49	18	19.0	20.0	21.0	23
	63	15	20.2	1.61	18	19.0	21.0	21.0	23
	64	15	20.5	1.68	18	19.0	21.0	22.0	23
	66	15	20.7	1.45	18	19.0	21.0	22.0	23
	70	15	20.6	1.40	18	19.0	21.0	22.0	23
	71	15	20.6	1.64	18	19.0	21.0	22.0	23
	73	15	21.0	1.81	18	19.0	22.0	23.0	23
	77	15	20.7	1.54	18	19.0	21.0	22.0	23
	78	15	20.8	1.61	18	19.0	21.0	22.0	23
	80	15	20.9	1.77	18	19.0	21.0	22.0	23
	84	15	21.0	1.31	19	20.0	21.0	22.0	23

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 1o: Verlauf des Körpergewichts (g) der Gruppe 14

Gruppe	Tag	Mittel- n	wert	1.		3.		Quartil	Max.
				SD	Min.	Quartil	Median		
ChTxB-rSyb2(70-76) +ImmunEasy(oral)	Baseline	15	17.3	2.08	14	15.7	17.0	19.7	21
	0	15	18.2	1.70	16	17.0	18.0	20.0	21
	1	15	18.6	1.76	16	17.0	18.0	21.0	21
	3	15	18.7	1.63	16	18.0	18.0	21.0	21
	7	15	18.9	1.79	17	18.0	18.0	21.0	22
	8	15	18.8	1.52	17	18.0	18.0	21.0	21
	10	15	18.9	1.46	17	18.0	18.0	21.0	21
	14	15	19.5	1.55	17	19.0	19.0	21.0	22
	15	15	19.5	1.36	17	18.0	19.0	21.0	21
	17	15	19.6	1.55	17	19.0	19.0	21.0	22
	21	15	19.5	1.19	18	19.0	19.0	21.0	22
	22	15	19.7	1.11	18	19.0	19.0	21.0	22
	24	15	19.9	1.44	18	19.0	19.0	21.0	23
	28	15	19.9	1.28	19	19.0	19.0	21.0	23
	29	15	19.9	1.22	19	19.0	20.0	20.0	23
	31	15	19.7	0.98	19	19.0	19.0	20.0	22
	35	15	19.8	1.08	18	19.0	20.0	21.0	22
	36	15	19.9	1.13	18	19.0	20.0	21.0	22
	38	15	20.2	1.08	19	19.0	20.0	21.0	22
	42	15	20.4	1.30	19	19.0	20.0	22.0	23
	43	15	20.5	1.19	19	20.0	20.0	22.0	23
	45	15	20.3	1.23	19	19.0	20.0	21.0	23
	49	15	20.7	1.22	19	20.0	20.0	22.0	23
	50	15	20.6	1.30	19	20.0	20.0	22.0	23
	52	15	20.6	1.12	19	20.0	20.0	21.0	23
	56	15	20.9	1.03	19	20.0	21.0	22.0	22
	57	15	20.6	1.35	18	20.0	21.0	22.0	23
	59	15	20.7	1.50	18	20.0	20.0	22.0	23
	63	15	20.9	1.13	20	20.0	20.0	22.0	23
	64	15	21.0	1.13	20	20.0	21.0	22.0	23
	66	15	20.9	1.10	20	20.0	21.0	22.0	23
	70	15	21.2	1.08	19	21.0	21.0	22.0	23
	71	15	21.4	1.06	20	21.0	21.0	22.0	23
	73	15	21.5	1.19	20	21.0	21.0	22.0	24
	77	15	21.6	1.18	20	21.0	21.0	23.0	24
	78	15	21.5	0.92	20	21.0	22.0	22.0	23
	80	15	21.5	0.99	20	21.0	21.0	22.0	23
	84	15	21.3	0.98	20	21.0	21.0	22.0	23

Baseline = Mittelwert aus 3 Einzelmessungen vor Immunisierung; SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Die folgende Tabelle gibt die statistischen Kennzahlen der Körpergewichte bei Versuchsende (Tag 84) wieder.

Tabelle A 2: Körpergewicht (g) der einzelnen Tiergruppen am Tag 84

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	1. Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	15	22.1	1.03	20	21.0	22.0	23.0	24
KLH-rSyb2(70-76)	15	22.0	0.76	21	21.0	22.0	23.0	23
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	23.2	1.32	21	22.0	23.0	24.0	25
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.9	0.70	21	21.0	22.0	22.0	23
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	21.7	1.16	20	21.0	22.0	22.0	24
+ImmunEasy								
KLH-rSyb2(70-76)	15	21.9	0.99	20	21.0	22.0	22.0	24
+AdjuPrime								
KLH-rSyb2(70-76)	15	22.0	1.25	20	21.0	22.0	23.0	24
+Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.6	1.59	19	21.0	21.0	23.0	25
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.7	1.22	19	21.0	22.0	23.0	24
+ImmunEasy								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.5	1.96	19	20.0	21.0	24.0	24
+AdjuPrime								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	22.1	1.30	20	21.0	22.0	23.0	24
+Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.9	1.03	21	21.0	22.0	23.0	24
+AL(OH)3								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.3	1.84	19	20.0	21.0	23.0	25
+Diluvac								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.0	1.31	19	20.0	21.0	22.0	23
+PBS(oral)								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	21.3	0.98	20	21.0	21.0	22.0	23
+ImmunEasy(oral)								

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Für die Änderung des Körpergewichts während der Studie erhält man folgende Kennzahlen:  
Tabelle A 3: Änderung des Körpergewichts (g) zu Tag 84 gegenüber dem Ausgangswert

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	1. Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	15	5.0	2.08	2.0	2.7	5.7	6.7	8.3
KLH-rSyb2(70-76)	15	4.5	2.17	1.0	2.3	5.3	6.3	7.0
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	5.8	1.97	2.7	4.3	5.7	7.7	9.3
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	4.5	1.70	1.7	3.0	4.7	6.0	7.0
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	4.4	2.11	1.3	3.0	4.0	6.3	7.3
+ImmunEasy								
KLH-rSyb2(70-76)	15	4.2	2.51	0.0	2.0	4.3	6.7	7.3
+AdjuPrime								
KLH-rSyb2(70-76)	15	4.6	2.34	1.3	2.0	4.3	7.3	7.7
+Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	3.9	1.64	1.0	3.0	4.0	4.7	7.0
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	4.2	1.51	2.0	3.0	4.3	5.3	7.3
+ImmunEasy								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	3.6	1.63	2.0	2.7	3.0	4.0	8.0
+AdjuPrime								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	4.4	1.41	2.0	3.3	4.3	6.0	6.3
+Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	4.1	1.91	1.3	2.3	4.0	5.7	7.7
+AL(OH)3								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	3.6	1.12	2.3	2.7	3.3	4.0	5.7
+Diluvac								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	3.5	1.93	1.3	2.0	3.0	5.0	7.3
+PBS(oral)								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	4.0	2.03	1.0	2.3	3.7	5.7	7.7
+ImmunEasy(oral)								

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Um den akuten Einfluss der Erstimmunisierung auf die Gewichtsentwicklung zu beurteilen, wurde die Gewichtsentwicklung von Tag 0 auf Tag 1 untersucht. Die folgende Tabelle gibt die Änderung der Körpergewichte von Tag 0 zu Tag 1 an (negative Werte entsprechen einem Gewichtsverlust):

Tabelle A 4: Änderung des Körpergewichts (g) von Tag 0 zu Tag 1

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	1. Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	15	0.1	0.52	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76)	15	0.7	0.59	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	0.7	0.80	0.0	0.0	1.0	1.0	3.0
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.3	0.62	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
+PBS								
KLH-rSyb2(70-76)	15	-1.3	0.82	-2.0	-2.0	-1.0	-1.0	1.0
+ImmunEasy								
KLH-rSyb2(70-76)	15	0.3	0.49	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
+AdjuPrime								
KLH-rSyb2(70-76)	15	-0.1	0.64	-1.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
+Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.6	0.74	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0
+Specol								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	-1.4	0.51	-2.0	-2.0	-1.0	-1.0	-1.0
+ImmunEasy								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.1	0.35	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
AdjuPrime								
+ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.0	0.93	-2.0	0.0	0.0	0.0	2.0
Algen-LPS								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.5	0.52	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0
+AL(OH)3								
ChTxB-rSyb2(70-76)	15	0.4	0.63	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
+Diluvac								

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Analog ergibt sich für die Gewichtsänderung von Tag 28 auf Tag 29 (1. Boosterung):

Tabelle A 5: Änderung des Körpergewichts (g) von Tag 28 zu Tag 29

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	1. Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	15	0.1	0.64	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +PBS	15	0.1	0.46	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +Specol	15	-0.1	0.74	-2.0	0.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +PBS	15	0.0	0.38	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	15	-1.1	1.03	-3.0	-2.0	-1.0	0.0	0.0
KLH-rSyb2(70-76) +AdjuPrime	15	-0.1	0.59	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +Algen-LPS	15	-0.1	0.52	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Specol	15	0.2	0.68	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	15	-0.9	0.80	-2.0	-2.0	-1.0	0.0	0.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +AdjuPrime	15	-0.2	0.41	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Algen-LPS	15	0.1	0.59	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +AL(OH)3	15	0.2	0.56	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Diluvac	15	0.1	0.46	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Für die Gewichtsänderung von Tag 56 auf Tag 57 ergeben sich folgende Kennzahlen (negative Werte entsprechen einem Gewichtsverlust):

Tabelle A 6: Änderung des Körpergewichts (g) von Tag 56 zu Tag 57

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	1. Min.	3. Quartil	Median	Quartil	Max.
Kontrolle	15	-0.2	0.86	-2.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +PBS	15	-0.2	0.56	-1.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +Specol	15	-0.2	0.86	-1.0	-1.0	0.0	1.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +PBS	15	-0.3	0.72	-2.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	15	-1.4	0.63	-2.0	-2.0	-1.0	-1.0	0.0
KLH-rSyb2(70-76) +AdjuPrime	15	-0.2	0.68	-1.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
KLH-rSyb2(70-76) +Algen-LPS	15	-0.1	0.74	-1.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Specol	15	-0.1	0.64	-1.0	-1.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +ImmunEasy	15	-1.2	0.68	-2.0	-2.0	-1.0	-1.0	0.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +AdjuPrime	15	0.0	0.76	-1.0	-1.0	0.0	1.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Algen-LPS	15	0.0	0.65	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +AL(OH)3	15	0.1	0.52	-1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
ChTxB-rSyb2(70-76) +Diluvac	15	0.2	0.56	-1.0	0.0	0.0	1.0	1.0

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

## b) Antikörperbildung gegen das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>

Dargestellt sind die statistischen Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen. Es werden für jede Tiergruppe Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median und Maximum tabellarisch für die Immunisierung, die erste und zweite Boosterung bei den einzelnen Serenverdünnungen aufgeführt.

Tabelle A 7a: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:2

Gruppe	Mittel- Zeitpunkt	n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	Immunisierung	3	-0.038	0.014	-0.050	-0.041	-0.022
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	Immunisierung	3	0.073	0.066	0.006	0.075	0.139
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	Immunisierung	3	0.868	0.161	0.689	0.915	1.000
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	Immunisierung	3	0.354	0.246	0.166	0.263	0.632
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunisierung	3	0.696	0.150	0.531	0.731	0.826
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunisierung	3	-0.037	0.385	-0.471	0.096	0.263
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunisierung	3	0.299	0.203	0.147	0.222	0.529
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	Immunisierung	3	0.122	0.107	0.006	0.141	0.218
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunisierung	3	0.501	0.222	0.248	0.592	0.664
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunisierung	3	0.216	0.105	0.095	0.267	0.285
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunisierung	3	0.360	0.152	0.220	0.338	0.521
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH) <sub>3</sub>	Immunisierung	3	0.328	0.223	0.191	0.209	0.585
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	Immunisierung	3	0.206	0.187	0.041	0.169	0.408
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	Immunisierung	3	0.200	0.386	-0.052	0.007	0.644
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	Immunisierung	3	0.207	0.355	-0.006	0.011	0.617

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum



Tabelle A 7b: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:5

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel- n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	Immunsierung	3	0,075	0,049	0,028	0,072	0,126
	1. Booster	3	0,059	0,202	-0,173	0,161	0,190
	2. Booster	3	0,091	0,105	-0,030	0,139	0,163
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0,194	0,055	0,131	0,221	0,230
	1. Booster	3	0,180	0,223	-0,010	0,125	0,426
	2. Booster	3	0,308	0,360	0,012	0,204	0,709
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	1,217	0,113	1,102	1,221	1,328
	1. Booster	3	1,371	0,295	1,032	1,513	1,567
	2. Booster	3	1,080	0,623	0,384	1,270	1,586
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0,555	0,311	0,238	0,566	0,860
	1. Booster	3	0,343	0,195	0,118	0,449	0,462
	2. Booster	3	0,195	0,074	0,127	0,184	0,274
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	1,150	0,211	0,953	1,125	1,372
	1. Booster	3	1,105	0,189	0,899	1,148	1,269
	2. Booster	3	0,872	0,570	0,214	1,182	1,220
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0,158	0,127	0,060	0,112	0,301
	1. Booster	3	0,447	0,647	0,029	0,120	1,192
	2. Booster	3	0,804	0,518	0,329	0,727	1,356
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0,284	0,151	0,160	0,239	0,451
	1. Booster	3	0,353	0,166	0,180	0,367	0,511
	2. Booster	3	0,844	0,721	0,026	1,125	1,382
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	0,277	0,164	0,143	0,228	0,460
	1. Booster	3	0,249	0,260	0,010	0,211	0,526
	2. Booster	3	0,250	0,237	-0,023	0,374	0,399
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	0,473	0,104	0,363	0,486	0,571
	1. Booster	3	0,554	0,544	-0,019	0,616	1,065
	2. Booster	3	0,448	0,405	0,054	0,427	0,863
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0,236	0,104	0,116	0,285	0,306
	1. Booster	3	0,244	0,200	0,056	0,222	0,454
	2. Booster	3	0,323	0,297	0,136	0,167	0,665
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0,317	0,215	0,114	0,295	0,543
	1. Booster	3	0,279	0,249	0,025	0,288	0,523
	2. Booster	3	0,338	0,247	0,056	0,450	0,509
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	Immunsierung	3	0,414	0,083	0,329	0,420	0,494
	1. Booster	3	0,290	0,222	0,036	0,389	0,445
	2. Booster	3	0,163	0,098	0,051	0,201	0,237
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	Immunsierung	3	0,146	0,120	0,014	0,173	0,250
	1. Booster	3	0,207	0,186	-0,001	0,268	0,356
	2. Booster	3	0,192	0,161	0,007	0,269	0,300
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	Immunsierung	3	0,208	0,156	0,032	0,263	0,328
	1. Booster	3	0,167	0,133	0,023	0,194	0,285
	2. Booster	3	0,089	0,094	-0,014	0,113	0,168
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	Immunsierung	3	0,151	0,244	-0,106	0,180	0,380
	1. Booster	3	0,086	0,105	-0,034	0,133	0,158
	2. Booster	3	0,072	0,095	-0,036	0,111	0,142

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7c: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:10

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-					
		n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	Immunsierung	3	0.048	0.045	0.018	0.025	0.100
	1. Booster	3	0.057	0.083	-0.039	0.092	0.116
	2. Booster	3	0.063	0.066	-0.013	0.099	0.103
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0.115	0.038	0.084	0.103	0.158
	1. Booster	3	0.138	0.152	-0.013	0.135	0.291
	2. Booster	3	0.239	0.206	0.081	0.164	0.473
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	1.097	0.345	0.713	1.200	1.379
	1. Booster	3	1.270	0.365	0.857	1.408	1.546
	2. Booster	3	1.124	0.640	0.412	1.308	1.651
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0.396	0.285	0.152	0.325	0.710
	1. Booster	3	0.221	0.125	0.077	0.282	0.305
	2. Booster	3	0.151	0.018	0.137	0.144	0.171
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	1.203	0.350	0.831	1.251	1.527
	1. Booster	3	1.067	0.553	0.429	1.356	1.416
	2. Booster	3	1.052	0.676	0.290	1.285	1.581
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0.099	0.094	0.025	0.066	0.205
	1. Booster	3	0.495	0.620	0.062	0.217	1.205
	2. Booster	3	0.761	0.576	0.294	0.582	1.405
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0.191	0.162	0.090	0.106	0.378
	1. Booster	3	0.235	0.068	0.175	0.220	0.309
	2. Booster	3	0.938	0.827	-0.001	1.258	1.556
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	0.152	0.048	0.121	0.127	0.207
	1. Booster	3	0.163	0.146	0.026	0.146	0.318
	2. Booster	3	0.157	0.139	0.005	0.186	0.280
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	0.247	0.120	0.141	0.222	0.377
	1. Booster	3	0.452	0.567	-0.075	0.381	1.051
	2. Booster	3	0.345	0.371	0.010	0.281	0.744
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0.106	0.017	0.086	0.113	0.117
	1. Booster	3	0.150	0.105	0.040	0.162	0.249
	2. Booster	3	0.242	0.263	0.083	0.097	0.546
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0.108	0.116	0.028	0.054	0.241
	1. Booster	3	0.149	0.149	-0.008	0.166	0.289
	2. Booster	3	0.175	0.127	0.029	0.247	0.250
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	Immunsierung	3	0.240	0.048	0.203	0.222	0.294
	1. Booster	3	0.190	0.152	0.015	0.275	0.282
	2. Booster	3	0.120	0.106	-0.002	0.168	0.193
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	Immunsierung	3	0.063	0.079	-0.028	0.104	0.113
	1. Booster	3	0.151	0.156	-0.012	0.166	0.300
	2. Booster	3	0.123	0.103	0.005	0.175	0.189
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	Immunsierung	3	0.087	0.085	0.001	0.088	0.171
	1. Booster	3	0.092	0.062	0.021	0.119	0.137
	2. Booster	3	0.040	0.044	0.004	0.028	0.088
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	Immunsierung	3	0.056	0.090	-0.046	0.091	0.123
	1. Booster	3	0.084	0.066	0.014	0.092	0.145
	2. Booster	3	0.044	0.050	-0.007	0.046	0.092

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7d: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantiengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:30

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-					
		n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	Immunsierung	3	0.006	0.022	-0.020	0.017	0.020
	1. Booster	3	0.015	0.039	-0.030	0.030	0.045
	2. Booster	3	0.026	0.041	-0.004	0.010	0.073
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0.062	0.039	0.022	0.065	0.099
	1. Booster	3	0.047	0.069	-0.032	0.074	0.098
	2. Booster	3	0.099	0.099	0.017	0.072	0.208
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	0.750	0.483	0.229	0.840	1.182
	1. Booster	3	1.414	0.243	1.146	1.473	1.621
	2. Booster	3	1.163	0.650	0.441	1.345	1.703
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	Immunsierung	3	0.166	0.110	0.087	0.121	0.291
	1. Booster	3	0.065	0.041	0.031	0.053	0.111
	2. Booster	3	0.048	0.036	0.009	0.055	0.081
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	0.950	0.409	0.614	0.833	1.405
	1. Booster	3	1.061	0.651	0.310	1.415	1.458
	2. Booster	3	1.080	0.689	0.296	1.356	1.587
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0.010	0.066	-0.059	0.018	0.071
	1. Booster	3	0.451	0.665	0.038	0.098	1.218
	2. Booster	3	0.558	0.605	0.162	0.258	1.255
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0.079	0.083	-0.006	0.084	0.159
	1. Booster	3	0.067	0.049	0.010	0.091	0.098
	2. Booster	3	0.843	0.688	0.049	1.240	1.242
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	Immunsierung	3	0.055	0.013	0.046	0.050	0.070
	1. Booster	3	0.123	0.043	0.074	0.140	0.156
	2. Booster	3	0.093	0.069	0.013	0.132	0.133
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	Immunsierung	3	0.074	0.082	-0.002	0.064	0.161
	1. Booster	3	0.279	0.324	0.038	0.152	0.647
	2. Booster	3	0.147	0.157	0.001	0.128	0.314
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	Immunsierung	3	0.040	0.015	0.025	0.040	0.055
	1. Booster	3	0.047	0.046	0.002	0.045	0.094
	2. Booster	3	0.076	0.099	0.005	0.033	0.188
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	Immunsierung	3	0.044	0.017	0.026	0.047	0.059
	1. Booster	3	0.068	0.069	-0.004	0.073	0.134
	2. Booster	3	0.082	0.077	0.003	0.086	0.157
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	Immunsierung	3	0.093	0.048	0.065	0.065	0.148
	1. Booster	3	0.106	0.026	0.076	0.120	0.121
	2. Booster	3	0.060	0.013	0.046	0.063	0.072
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	Immunsierung	3	0.002	0.032	-0.033	0.011	0.029
	1. Booster	3	0.044	0.040	-0.001	0.057	0.076
	2. Booster	3	0.025	0.023	0.001	0.028	0.046
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	Immunsierung	3	0.026	0.039	0.001	0.007	0.071
	1. Booster	3	0.041	0.013	0.028	0.043	0.053
	2. Booster	3	0.029	0.029	-0.004	0.041	0.049
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	Immunsierung	3	0.015	0.028	-0.017	0.030	0.032
	1. Booster	3	-0.006	0.098	-0.115	0.023	0.074
	2. Booster	3	0.015	0.017	-0.004	0.018	0.030

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7e: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantiengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:100

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-					
		n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	1. Booster	3	0.005	0.026	-0.021	0.005	0.030
	2. Booster	3	0.006	0.022	-0.011	-0.001	0.031
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	1. Booster	3	0.022	0.013	0.007	0.029	0.030
	2. Booster	3	0.044	0.048	-0.002	0.041	0.093
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	1. Booster	3	1.291	0.267	1.022	1.294	1.556
	2. Booster	3	1.135	0.634	0.429	1.324	1.653
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	1. Booster	3	0.019	0.018	0.004	0.013	0.039
	2. Booster	3	0.022	0.007	0.017	0.020	0.030
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	1. Booster	3	1.299	0.436	0.796	1.541	1.559
	2. Booster	3	1.133	0.752	0.286	1.395	1.720
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	1. Booster	3	0.235	0.397	0.000	0.012	0.693
	2. Booster	3	0.359	0.391	0.043	0.237	0.796
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	1. Booster	3	0.027	0.035	0.002	0.014	0.067
	2. Booster	3	0.664	0.539	0.048	0.898	1.046
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	1. Booster	3	0.027	0.004	0.023	0.028	0.031
	2. Booster	3	0.055	0.052	0.005	0.051	0.108
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	1. Booster	3	0.117	0.116	0.039	0.062	0.250
	2. Booster	3	0.024	0.046	-0.023	0.024	0.070
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	1. Booster	3	0.013	0.008	0.007	0.009	0.022
	2. Booster	3	0.029	0.021	0.012	0.023	0.052
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	1. Booster	3	-0.065	0.114	-0.193	-0.028	0.025
	2. Booster	3	0.018	0.014	0.001	0.025	0.027
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	1. Booster	3	0.032	0.027	0.013	0.020	0.063
	2. Booster	3	0.021	0.014	0.011	0.015	0.037
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	1. Booster	3	0.004	0.008	-0.003	0.004	0.012
	2. Booster	3	0.016	0.011	0.003	0.020	0.024
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	1. Booster	3	0.008	0.011	-0.005	0.013	0.015
	2. Booster	3	0.011	0.010	0.000	0.011	0.020
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	1. Booster	3	0.015	0.019	-0.003	0.011	0.036
	2. Booster	3	-0.000	0.004	-0.003	-0.002	0.004

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7f: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:300

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-					
		n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	1. Booster	3	0.009	0.006	0.006	0.006	0.016
	2. Booster	3	0.007	0.005	0.002	0.005	0.012
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	1. Booster	3	0.004	0.008	-0.002	0.000	0.013
	2. Booster	3	0.014	0.014	-0.001	0.016	0.026
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	1. Booster	3	0.903	0.416	0.497	0.883	1.328
	2. Booster	3	1.160	0.732	0.341	1.387	1.752
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	1. Booster	3	0.020	0.014	0.005	0.021	0.033
	2. Booster	3	0.012	0.004	0.007	0.012	0.016
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	1. Booster	3	1.249	0.489	0.687	1.490	1.571
	2. Booster	3	1.106	0.696	0.323	1.340	1.656
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	1. Booster	3	0.097	0.169	-0.008	0.007	0.291
	2. Booster	3	0.263	0.352	0.032	0.090	0.668
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	1. Booster	3	0.021	0.015	0.012	0.013	0.038
	2. Booster	3	0.374	0.354	0.005	0.408	0.710
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	1. Booster	3	0.029	0.018	0.015	0.024	0.049
	2. Booster	3	0.074	0.098	0.008	0.029	0.187
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	1. Booster	3	0.046	0.035	0.024	0.027	0.086
	2. Booster	3	0.011	0.024	-0.005	-0.001	0.039
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	1. Booster	3	-0.004	0.019	-0.026	0.006	0.007
	2. Booster	3	0.070	0.086	0.014	0.028	0.169
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	1. Booster	3	0.005	0.010	-0.006	0.006	0.013
	2. Booster	3	0.004	0.004	-0.001	0.005	0.008
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	1. Booster	3	0.010	0.009	0.000	0.011	0.019
	2. Booster	3	0.010	0.003	0.007	0.011	0.012
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	1. Booster	3	0.005	0.007	-0.002	0.003	0.012
	2. Booster	3	0.004	0.002	0.003	0.004	0.006
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	1. Booster	3	0.001	0.005	-0.005	0.003	0.005
	2. Booster	3	0.008	0.003	0.006	0.007	0.011
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	1. Booster	3	0.010	0.018	-0.004	0.004	0.030
	2. Booster	3	0.001	0.007	-0.007	0.003	0.007

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7g: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:1000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-					
		n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	2. Booster	3	0.004	0.005	-0.002	0.006	0.008
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	2. Booster	3	1.067	0.684	0.320	1.218	1.664
	1. Booster	3	0.483	0.295	0.154	0.574	0.722
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	2. Booster	3	1.064	0.753	0.205	1.382	1.607
	1. Booster	3	1.082	0.683	0.309	1.331	1.605

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 7h: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Immunisierungspeptid rSyb2<sub>70-76</sub>, Serum-Verdünnung 1:3000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-		SD	Min	Median	Max
		n	wert				
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	2. Booster	3	0.943	0.672	0.284	0.920	1.627
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	2. Booster	3	0.877	0.680	0.092	1.241	1.297

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

### c) Antikörperbildung gegen die Carrier KLH und ChTxB

Dargestellt sind die statistischen Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen. Es werden für jede Tiergruppe Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median und Maximum tabellarisch für die Immunisierung, die erste und zweite Boosterung bei den einzelnen Serenverdünnungen aufgeführt.

Tabelle A 8a: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für den Carrier ChTxB, Serum-Verdünnung 1:10000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-		SD	Min	Median	Max
		n	wert				
Kontrolle	Immunisierung	3	0.029	0.044	-0.002	0.009	0.080
PBS	Immunisierung	3	0.861	0.710	0.042	1.248	1.294
	1. Booster	3	1.419	0.196	1.193	1.521	1.543
	2. Booster	3	1.444	0.034	1.406	1.458	1.470
Specol	Immunisierung	3	0.972	0.664	0.205	1.355	1.356
	1. Booster	3	1.468	0.057	1.403	1.491	1.509
	2. Booster	3	1.409	0.020	1.390	1.407	1.429
ImmunEasy	Immunisierung	3	1.421	0.058	1.356	1.438	1.469
	1. Booster	3	1.561	0.102	1.455	1.571	1.658
	2. Booster	3	1.495	0.107	1.423	1.445	1.619
AdjuPrime	Immunisierung	3	1.003	0.529	0.411	1.172	1.427
	1. Booster	3	1.477	0.073	1.393	1.515	1.525
	2. Booster	3	1.434	0.024	1.406	1.448	1.449
Algen-LPS	Immunisierung	3	1.144	0.236	0.890	1.185	1.357
	1. Booster	3	1.553	0.056	1.494	1.560	1.605
	2. Booster	3	1.493	0.076	1.408	1.516	1.555
AL(OH)3	Immunisierung	3	1.232	0.357	0.826	1.380	1.492
	1. Booster	3	1.462	0.131	1.354	1.424	1.608
	2. Booster	3	1.436	0.076	1.385	1.400	1.524
Diluvac	Immunisierung	3	1.165	0.229	0.914	1.221	1.361
	1. Booster	3	1.527	0.067	1.467	1.516	1.599
	2. Booster	3	1.466	0.077	1.380	1.491	1.528
PBS (oral)	Immunisierung	3	0.708	0.239	0.432	0.835	0.857
	1. Booster	3	0.995	0.176	0.873	0.916	1.198
	2. Booster	3	1.001	0.360	0.616	1.059	1.330
ImmunEasy (oral)	Immunisierung	3	0.653	0.419	0.170	0.867	0.923
	1. Booster	3	1.209	0.223	1.026	1.143	1.458
	2. Booster	3	1.215	0.076	1.132	1.233	1.281

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 8b: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für den Carrier ChTxB, Serum-Verdünnung 1:30000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-			Min	Median	Max
		n	wert	SD			
Kontrolle	Immunsierung	3	0.006	0.015	-0.010	0.007	0.019
PBS	Immunsierung	3	0.744	0.625	0.030	1.011	1.191
	1. Booster	3	1.466	0.057	1.411	1.462	1.525
	2. Booster	3	1.317	0.103	1.198	1.369	1.383
Specol	Immunsierung	3	1.272	0.247	1.002	1.329	1.486
	1. Booster	3	1.577	0.088	1.480	1.599	1.652
	2. Booster	3	1.384	0.141	1.226	1.427	1.499
ImmunEasy	Immunsierung	3	1.468	0.052	1.422	1.459	1.524
	1. Booster	3	1.573	0.066	1.499	1.598	1.624
	2. Booster	3	1.363	0.180	1.175	1.379	1.534
AdjuPrime	Immunsierung	3	0.934	0.336	0.585	0.963	1.255
	1. Booster	3	1.458	0.128	1.348	1.427	1.599
	2. Booster	3	1.348	0.095	1.242	1.374	1.428
Algen-LPS	Immunsierung	3	1.252	0.170	1.091	1.235	1.430
	1. Booster	3	1.561	0.061	1.502	1.557	1.625
	2. Booster	3	1.391	0.165	1.222	1.399	1.552
AL(OH)3	Immunsierung	3	0.865	0.317	0.587	0.797	1.210
	1. Booster	3	1.448	0.094	1.388	1.399	1.557
	2. Booster	3	1.374	0.053	1.339	1.348	1.436
Diluvac	Immunsierung	3	0.891	0.509	0.304	1.161	1.208
	1. Booster	3	1.340	0.147	1.173	1.403	1.446
	2. Booster	3	1.354	0.029	1.333	1.342	1.388
PBS (oral)	Immunsierung	3	0.747	0.417	0.278	0.889	1.074
	1. Booster	3	0.540	0.243	0.268	0.612	0.739
	2. Booster	3	0.693	0.320	0.410	0.627	1.041
ImmunEasy (oral)	Immunsierung	3	0.155	0.087	0.082	0.133	0.251
	1. Booster	3	1.128	0.143	0.969	1.169	1.247
	2. Booster	3	1.234	0.124	1.114	1.227	1.362

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 8c: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für den Carrier KLH, Serum-Verdünnung 1:1000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-			Min	Median	Max
		n	wert	SD			
Kontrolle	Immunsierung	3	0.014	0.014	0.003	0.009	0.029
PBS	Immunsierung	3	1.043	0.226	0.783	1.155	1.190
	1. Booster	3	1.110	0.077	1.023	1.143	1.166
	2. Booster	3	0.979	0.210	0.746	1.035	1.155
Specol	Immunsierung	3	1.169	0.170	0.973	1.257	1.277
	1. Booster	3	1.301	0.114	1.170	1.356	1.377
	2. Booster	3	1.172	0.115	1.041	1.218	1.257
ImmunEasy	Immunsierung	3	0.946	0.391	0.608	0.856	1.374
	1. Booster	3	1.135	0.344	0.791	1.139	1.478
	2. Booster	3	0.977	0.341	0.608	1.040	1.282
AdjuPrime	Immunsierung	3	0.726	0.333	0.512	0.557	1.109
	1. Booster	3	0.875	0.334	0.621	0.750	1.253
	2. Booster	3	0.768	0.291	0.512	0.707	1.084
Algen-LPS	Immunsierung	3	1.042	0.167	0.856	1.091	1.178
	1. Booster	3	0.968	0.357	0.597	1.000	1.309
	2. Booster	3	1.058	0.151	0.893	1.091	1.189

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 8d: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für den Carrier KLH, Serum-Verdünnung 1:3000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-			Min	Median	Max
		n	wert	SD			
Kontrolle	Immunsierung	3	0.002	0.060	-0.058	0.002	0.062
PBS	Immunsierung	3	0.833	0.250	0.623	0.766	1.110
	1. Booster	3	0.828	0.343	0.554	0.719	1.213
	2. Booster	3	0.576	0.203	0.362	0.600	0.766
Specol	Immunsierung	3	0.895	0.266	0.643	0.871	1.172
	1. Booster	3	1.111	0.120	0.979	1.139	1.215
	2. Booster	3	0.767	0.156	0.587	0.843	0.871
ImmunEasy	Immunsierung	3	1.111	0.273	0.804	1.204	1.325
	1. Booster	3	1.340	0.186	1.126	1.443	1.453
	2. Booster	3	0.992	0.257	0.707	1.066	1.204
AdjuPrime	Immunsierung	3	0.850	0.241	0.636	0.805	1.111
	1. Booster	3	1.037	0.265	0.733	1.155	1.223
	2. Booster	3	0.664	0.163	0.486	0.701	0.805
Algen-LPS	Immunsierung	3	0.817	0.237	0.549	0.905	0.999
	1. Booster	3	0.977	0.276	0.659	1.109	1.162
	2. Booster	3	0.660	0.410	0.186	0.888	0.905

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 8e: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für den Carrier KLH, Serum-Verdünnung 1:10000

Gruppe	Zeitpunkt	Mittel-			Min	Median	Max
		n	wert	SD			
Kontrolle	Immunsierung	3	0.030	0.044	0.000	0.009	0.080
PBS	Immunsierung	3	0.336	0.140	0.242	0.270	0.497
	1. Booster	3	0.565	0.232	0.404	0.459	0.831
	2. Booster	3	0.177	0.090	0.075	0.215	0.242
Specol	Immunsierung	3	0.478	0.205	0.278	0.468	0.688
	1. Booster	3	0.719	0.214	0.487	0.758	0.911
	2. Booster	3	0.303	0.168	0.131	0.310	0.468
ImmunEasy	Immunsierung	3	0.630	0.216	0.499	0.512	0.879
	1. Booster	3	1.073	0.216	0.828	1.153	1.238
	2. Booster	3	0.454	0.145	0.289	0.512	0.561
AdjuPrime	Immunsierung	3	0.416	0.189	0.210	0.459	0.580
	1. Booster	3	0.633	0.266	0.359	0.650	0.890
	2. Booster	3	0.295	0.165	0.130	0.296	0.459
Algen-LPS	Immunsierung	3	0.446	0.166	0.297	0.416	0.625
	1. Booster	3	0.802	0.165	0.617	0.859	0.931
	2. Booster	3	0.307	0.190	0.087	0.416	0.418

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum



## d) Statistische Vergleiche der verschiedenen angewandten Adjuvantien im Hinblick auf die beobachtete Antikörperbildung gegen KLH und ChTxB

Generelle Anmerkung zu den durchgeführten Vergleichen

Es handelt sich nicht um geplante statistische Vergleiche und es erfolgt keinerlei Adjustierung für die Durchführung von etlichen Dutzend Tests am gleichen Datenmaterial. Aus statistischer Sicht kommt beobachteten Signifikanzen keinerlei beweisender Wert zu, da die Zahl der durchgeführten Beobachtungen zu gering ist. Umgekehrt muss auch klar gesagt werden, dass aus einer Nichtsignifikanz auf keinen Fall das Fehlen eines Unterschiedes abgeleitet werden kann, es kann lediglich postuliert werden, dass kein Unterschied gefunden wurde.

### 1. Carrier ChTxB

Die folgenden Tabellen geben die p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen zu den verschiedenen Tagen wieder.

Tabelle A 9a: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 28, Serum-Verdünnung 1:10000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH) <sub>3</sub>	0,5033	0,7956	0,8446	0,5812	0,1007	0,0019	0,2831	0,1348	0,4478
AdjuPrime		0,6796	0,6344	0,2285	0,3111	0,0090	0,6778	0,3910	0,9271
Algen-LPS			0,9497	0,4201	0,1603	0,0035	0,4105	0,2098	0,6145
Diluvac				0,4565	0,1436	0,0030	0,3765	0,1890	0,5713
ImmunEasy					0,0336	0,0005	0,1117	0,0468	0,1969
ImmunEasy (oral)						0,0783	0,5437	0,8726	0,3551
Kontrolle							0,0225	0,0572	0,0110
PBS								0,6538	0,7456
PBS(oral)									0,4421

Tabelle A 9b: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 28, Serum-Verdünnung 1:30000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH) <sub>3</sub>	0,8032	0,1743	0,9252	0,0403	0,0180	0,0054	0,6649	0,6740	0,1541
AdjuPrime		0,2612	0,8765	0,0666	0,0103	0,0030	0,4967	0,5046	0,2334
Algen-LPS			0,2038	0,4424	0,0007	0,0002	0,0794	0,0813	0,9428
Diluvac				0,0489	0,0146	0,0043	0,5987	0,6074	0,1809
ImmunEasy					0,0001	< 0,0001	0,0160	0,0164	0,4853
ImmunEasy (oral)						0,5929	0,0451	0,0439	0,0006
Kontrolle							0,0144	0,0140	0,0002
PBS								0,9900	0,0691
PBS(oral)									0,0708

Tabelle A 9c: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 56, Serum-Verdünnung 1:10000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH)3	0,8816	0,3944	0,5375	0,3527	0,0259	< 0,0001	0,6863	0,0002	0,9550
AdjuPrime		0,4801	0,6389	0,4328	0,0188	< 0,0001	0,5812	0,0002	0,9263
Algen-LPS			0,8105	0,9362	0,0038	< 0,0001	0,2151	< 0,0001	0,4256
Diluvac				0,7493	0,0066	< 0,0001	0,3120	< 0,0001	0,5749
ImmunEasy					0,0031	< 0,0001	0,1886		0,3818
ImmunEasy (oral)						< 0,0001	0,0597	< 0,0001	0,0229
Kontrolle							< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
PBS								0,0007	0,6455
PBS(oral)									0,0002

Tabelle A 9d: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 56, Serum-Verdünnung 1:30000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH)3	0,9203	0,2636	0,2889	0,2174	0,0041	< 0,0001	0,8558	< 0,0001	0,2059
AdjuPrime		0,3067	0,2476	0,2548	0,0033	< 0,0001	0,9349	< 0,0001	0,2418
Algen-LPS			0,0366	0,9031	0,0003	< 0,0001	0,3455	< 0,0001	0,8767
Diluvac				0,0284	0,0441	< 0,0001	0,2174	< 0,0001	0,0264
ImmunEasy					0,0002	< 0,0001	0,2889	< 0,0001	0,9734
ImmunEasy (oral)						< 0,0001	0,0027	< 0,0001	0,0002
Kontrolle							< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
PBS								< 0,0001	0,2746
PBS(oral)									< 0,0001

Tabelle A 9e: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 84, Serum-Verdünnung 1:10000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH) <sub>3</sub>	0,9815	0,5746	0,7670	0,5591	0,0365	< 0,0001	0,9366	0,0002	0,7822
AdjuPrime		0,5591	0,7495	0,5438	0,0383	< 0,0001	0,9182	0,0002	0,8001
Algen-LPS			0,7899	0,9815	0,0104	< 0,0001	0,6295	< 0,0001	0,4046
Diluvac				0,7721	0,0191	< 0,0001	0,8283	0,0001	0,5679
ImmunEasy					0,0099	< 0,0001	0,6132	< 0,0001	0,3920
ImmunEasy (oral)						< 0,0001	0,0308	0,0423	0,0646
Kontrolle							< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
PBS								0,0002	0,7221
PBS(oral)									0,0004

Tabelle A 9f: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 84, Serum-Verdünnung 1:30000

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	Kontrolle	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH) <sub>3</sub>	0,8194	0,8832	0,8614	0,9200	0,2295	< 0,0001	0,6162	< 0,0001	0,9327
AdjuPrime		0,7077	0,9571	0,8981	0,36261	< 0,0001	0,7845	< 0,0001	0,7546
Algen-LPS			0,7480	0,8047	0,1799	< 0,0001	0,5182	< 0,0001	0,9501
Diluvac				0,9408	0,3011	< 0,0001	0,7436	< 0,0001	0,7957
ImmunEasy					0,2689	< 0,0001	0,6884	< 0,0001	0,8534
ImmunEasy (oral)						< 0,0001	0,4746	< 0,0001	0,1999
Kontrolle							< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
PBS								< 0,0001	0,5590
PBS(oral)									< 0,0001

Änderung der Extinktionen von Tag 28 zu Tag 56

Verdünnung 1: 10000: p = 0,88 d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden

Verdünnung 1: 30000: p = 0,03 d.h. Unterschied zwischen den Gruppen gefunden, anhand der folgenden Tabelle kann festgestellt werden, zwischen welchen Gruppen die p-Werte < 0,05 sind:

Tabelle A 9g: Zusammenfassende Darstellung der einzelnen p-Werte

	AdjuPrime	Algen-LPS	Diluvac	ImmunEasy	ImmunEasy (oral)	PBS	PBS (oral)	Specol
Al(OH) <sub>3</sub>	0,8374	0,3501	0,6456	0,1119	0,1894	0,6322	0,0127	0,3424
AdjuPrime		0,4623	0,7982	0,1607	0,1333	0,4958	0,0197	0,4531
Algen-LPS			0,6289	0,4856	0,0321	0,1653	0,0875	0,9876
Diluvac				0,2443	0,0836	0,3524	0,0337	0,6181
ImmunEasy					0,0071	0,0447	0,2879	0,4951
ImmunEasy (oral)						0,3920	0,0006	0,0311
PBS							0,0044	0,1610
PBS(oral)								0,0900

Änderung der Extinktionen von Tag 56 zu Tag 84

Verdünnung 1: 10000: p = 0,99 d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden

Verdünnung 1: 30000: p = 0,11 d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden

## 2. Carrier KLH

Die folgenden Tabellen geben die p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen zu den verschiedenen Tagen wieder.

Tabelle A 10a: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 28, Serum-Verdünnung 1:1000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,146	0,2998	0,0043	0,1447	0,0498
Algen-LPS		0,6462	0,0003	0,9955	0,5426
ImmunEasy			0,0006	0,6422	0,2939
Kontrolle				0,0003	0,0001
PBS					0,5462

Tabelle A 10b: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 28, Serum-Verdünnung 1:3000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,8652	0,1956	0,0008	0,9275	0,8170
Algen-LPS		0,1486	0,0011	0,9371	0,6890
ImmunEasy			< 0,0001	0,1691	0,2790
Kontrolle				0,0009	0,0005
PBS					0,7475

Tabelle A 10c: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 28, Serum-Verdünnung 1:10000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,8362	0,1493	0,0165	0,5734	0,6647
Algen-LPS		0,2085	0,0111	0,4448	0,8197
ImmunEasy			0,001	0,0556	0,2944
Kontrolle				0,0475	0,0072
PBS					0,3264

Tabelle A 10d: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 56, Serum-Verdünnung 1:1000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,6544	0,2258	0,0012	0,2711	0,0592
Algen-LPS		0,4294	0,0005	0,5005	0,1031
ImmunEasy			0,0001	0,9041	0,4353
Kontrolle				0,0002	< 0,0001
PBS					0,3705

Tabelle A 10e: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 56, Serum-Verdünnung 1:3000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,7540	0,1320	0,0001	0,2883	0,7015
Algen-LPS		0,0766	0,0002	0,4446	0,4894
ImmunEasy			< 0,0001	0,0183	0,2445
Kontrolle				0,0009	< 0,0001
PBS					0,1585

Tabelle A 10f: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 56, Serum-Verdünnung 1:10000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,3266	0,0208	0,0033	0,6868	0,6139
Algen-LPS		0,1277	0,0005	0,1766	0,6228
ImmunEasy			< 0,0001	0,0097	0,0013
Kontrolle				0,0072	0,0013
PBS					0,3702

Tabelle A 10g: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 84, Serum-Verdünnung 1:1000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,0871	0,2069	< 0,0001	0,2021	0,0221
Algen-LPS		0,6163	< 0,0001	0,6265	0,4813
ImmunEasy			< 0,0001	0,9884	0,2362
Kontrolle				< 0,0001	< 0,0001
PBS					0,2416

Tabelle A 10h: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 84, Serum-Verdünnung 1:3000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,9818	0,0756	0,0005	0,6180	0,5573
Algen-LPS		0,0724	0,0005	0,6340	0,5424
ImmunEasy			< 0,0001	0,0288	0,2103
Kontrolle				0,0016	0,0001
PBS					0,2847

Tabelle A 10i: p-Werte für den Vergleich der Adjuvantengruppen am Versuchstag 84, Serum-Verdünnung 1:10000

	Algen-LPS	ImmunEasy	Kontrolle	PBS	Specol
AdjuPrime	0,9119	0,1511	0,0107	0,2804	0,9404
Algen-LPS		0,1818	0,0082	0,2368	0,9714
ImmunEasy			0,0003	0,0188	0,1713
Kontrolle				0,1263	0,0090
PBS					0,2503

#### Änderung der Extinktionen von Tag 28 zu Tag 56

Verdünnung 1: 1000:	p = 0,48, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden
Verdünnung 1: 3000:	p = 0,29, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden
Verdünnung 1: 10000:	p = 0,29, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden

#### Änderung der Extinktionen von Tag 56 zu Tag 84

Verdünnung 1: 1000:	p = 0,45, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden
Verdünnung 1: 3000:	p = 0,96, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden
Verdünnung 1: 10000:	p = 0,31, d.h. kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden

### e) Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid A (SAA)

Dargestellt sind die statistischen Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen. Es werden für jede Tiergruppe Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median und Maximum tabellarisch für die Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und SAA bei den einzelnen Serenverdünnungen aufgeführt.

Außerdem werden die errechneten Serum-Haptoglobin- und SAA-Konzentrationen der einzelnen Adjuvantengruppen in Tabellenform aufgelistet.

Tabelle A 11a: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Akute-Phase-Protein Haptoglobin, Serum-Verdünnung 1:2

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	3	0.134	0.004	0.130	0.132	0.139
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	3	0.181	0.018	0.165	0.177	0.200
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	3	0.205	0.023	0.191	0.191	0.232
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	3	0.154	0.011	0.142	0.159	0.163
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	3	0.223	0.085	0.166	0.183	0.322
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	3	0.168	0.031	0.132	0.182	0.190
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	3	0.184	0.056	0.138	0.167	0.246
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	3	0.178	0.042	0.151	0.157	0.227
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	3	0.153	0.002	0.151	0.152	0.155
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	3	0.147	0.011	0.140	0.141	0.160
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	3	0.254	0.061	0.198	0.245	0.320
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	3	0.148	0.017	0.138	0.139	0.168
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	3	0.166	0.021	0.143	0.169	0.185
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	3	0.139	0.009	0.129	0.141	0.147
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	3	0.140	0.016	0.124	0.141	0.156

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 11b: Kennzahlen der Extinktionen der verschiedenen Adjuvantengruppen für das Akute-Phase-Protein SAA, Serum-Verdünnung 1:200

Gruppe	Mittel- n	wert	SD	Min	Median	Max
Kontrolle	3	0.151	0.007	0.144	0.151	0.158
KLH-rSyb2(70-76)+PBS	3	0.206	0.028	0.179	0.205	0.234
KLH-rSyb2(70-76)+Specol	3	0.289	0.096	0.186	0.305	0.376
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS	3	0.227	0.036	0.195	0.222	0.266
KLH-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	3	0.217	0.011	0.205	0.222	0.225
KLH-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	3	0.203	0.024	0.182	0.199	0.230
KLH-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	3	0.172	0.010	0.161	0.178	0.178
ChTxB-rSyb2(70-76)+Specol	3	0.220	0.053	0.183	0.196	0.280
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy	3	0.203	0.005	0.198	0.203	0.208
ChTxB-rSyb2(70-76)+AdjuPrime	3	0.222	0.054	0.171	0.216	0.279
ChTxB-rSyb2(70-76)+Algen-LPS	3	0.244	0.079	0.169	0.238	0.326
ChTxB-rSyb2(70-76)+AL(OH)3	3	0.222	0.018	0.201	0.229	0.236
ChTxB-rSyb2(70-76)+Diluvac	3	0.228	0.072	0.174	0.202	0.310
ChTxB-rSyb2(70-76)+PBS(oral)	3	0.221	0.043	0.193	0.199	0.270
ChTxB-rSyb2(70-76)+ImmunEasy(oral)	3	0.202	0.013	0.188	0.206	0.212

SD = Standardabweichung; Min= Minimum; Max = Maximum

Tabelle A 11c: Haptoglobin-Konzentrationen (mg/ml) der verschiedenen Adjuvantiengruppen, Serum-Verdünnung 1:2

Haptoglobin-Konzentration (mg/ml)	Serum-Verdünnung 1:2
Kontrolle	0,185
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS	0,481
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Specol	0,632
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS	0,311
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy	0,746
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + AdjuPrime	0,399
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Algen-LPS	0,500
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Specol	0,462
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy	0,305
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + AdjuPrime	0,267
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Algen-LPS	0,941
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Imject Alum	0,273
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Diluvac forte	0,387
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS (oral)	0,217
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy (oral)	0,223

Tabelle A 11d SAA-Konzentrationen (µg/ml) der verschiedenen Adjuvantiengruppen, Serum-Verdünnung 1:200

SAA-Konzentration (µg/ml)	Serum-Verdünnung 1:200
Kontrolle	10,60
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS	14,46
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Specol	20,28
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS	15,93
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy	15,23
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + AdjuPrime	14,25
KLH-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Algen-LPS	12,07
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Specol	15,44
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy	14,25
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + AdjuPrime	15,58
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Algen-LPS	17,13
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Imject Alum	15,58
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + Diluvac forte	16,00
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + PBS (oral)	15,51
ChTxB-rSyb2 <sub>70-76</sub> + ImmunEasy (oral)	14,17



## 10. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Dr. J. Hartinger danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Aufgabe.

Bei Herrn PD Dr. A. Hoffmann bedanke ich mich für die intensive Betreuung, seine jederzeit vorhandene Bereitwilligkeit zur Besprechung technischer und theoretischer Fragen, kritische Beurteilung meiner Ausführungen sowie für die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer (Geschäftsführender Direktor des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität in Gießen), der diese Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin vertreten hat und meine Arbeit beurteilt.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. K. Cußler für seine Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Durchführung der Vorstudie dieser Arbeit (Messung der Körpertemperatur mit Hilfe implantierbarer, temperatursensitiver Transponder).

Ich danke Herrn Dr. R. Plesker, Leiter der Zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Instituts, der mir durch seine fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft bei der pathologischen Befunderhebung sowie der Bearbeitung und Auswertung der histologischen Befunde und dem Anfertigen histologischer und pathologischer Bilder mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. B. Kegel und Frau U. Bonifas verdienen meinen besonderen Dank für ihre geduldige, einfühlsame Einweisung in die Laborarbeit. Ihnen verdanke ich das Gelingen der serologischen Untersuchungen.

Ich danke der Arbeitsgruppe „Entwicklung einer *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Tetanustoxizität“ des Paul-Ehrlich-Instituts für die großzügige Bereitstellung des gegen das rekombinante Synaptobrevin 2 gerichteten polyklonalen N-terminalen Antikörpers vom Kaninchen (Ra-N-term.-rSyb2-AK), des rekombinanten Synaptobrevin 2 sowie des Tetanustoxins.

Ich möchte mich auch bei Frau J. Seidl für ihre fachliche Beratung in Labor- und Computerfragen und für die Freiheit, die ich in ihrem Labor genießen durfte, bedanken.

Frau I. Ringelstetter danke ich für die histologische Bearbeitung des Probenmaterials.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn P. Volkers, der die statistische Bearbeitung und Auswertung des Datenmaterials ausführte und mir geduldig Fragen zum Thema Statistik beantwortete.

Herrn H. Bartel und Frau H. Rahmouni möchte ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der in dieser Arbeit verwendeten Photographien danken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn K. Papadopoulos, der mich mit seinem Fachwissen, seiner großen Hilfsbereitschaft, Zuverlässigkeit und Geduld während meiner Arbeit tatkräftig unterstützte und immer Zeit fand, mich zu motivieren.

Nicht vergessen dankend zu erwähnen möchte ich alle Tierpflegerinnen und -pfleger für ihre kompetente und liebevolle Betreuung meiner Mäuse.

Neben den namentlich aufgeführten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts möchte ich auch all den anderen danken, die durch ihr freundliches und entgegenkommendes Verhalten die Arbeit im Hause für mich angenehm gemacht haben.

Ich möchte meinen Eltern danken, die mir durch ihre stetige Unterstützung auf meinem Lebensweg die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein inniges Dankeschön gilt meinem Freund F. Nitzsche, der mich geduldig beim Anfertigen der Grafiken dieser Arbeit mit seinen Computerkenntnissen unterstützte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei unserem Nachbarn W. Seip, der mir freundlicherweise seinen Rechner zur Verfügung stellte und durch sein fundiertes technisches Wissen die meisten meiner Computerprobleme lösen konnte.

**Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Verleihung des Dr. med. vet. und des Dr. biol. animalium**

Gemäß den Beschlüssen des Fachbereichsrates vom 19.12.2001 und 06.02.2002

§10 (5) Erklärung: „Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



ISBN 3-938026-61-8



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75  
e-mail: [Geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>