



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 39 927 A1** 2005.03.24

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 39 927.5**

(22) Anmeldetag: **29.08.2003**

(43) Offenlegungstag: **24.03.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 39/29**

C12N 15/51, C12N 15/63, C12Q 1/68

(71) Anmelder:

**Rhein Biotech Gesellschaft für neue
biotechnologische Prozesse und Produkte mbH,
40595 Düsseldorf, DE**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(72) Erfinder:

Melber, Karl, 40591 Düsseldorf, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

US2003/00 83 291 A1

WO 91/17 768 A1

WO 01/40 279 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Zusammensetzung zur Prophylaxe/Therapie von HBV-Infektionen und HBV-vermittelten Erkrankungen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die wenigstens zwei Hepatitis B Virus Oberflächenantigene (HBsAgs), Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthalten, wobei sich die HBsAgs im HBV Genotyp und/oder Subtyp unterscheiden und wobei die Zusammensetzung kein HBV Core Antigen (HBcAg) oder dieses kodierende Nukleinsäure enthält; pharmazeutische Zusammensetzungen, insbesondere Vakzine, enthaltend diese Zusammensetzungen, zur Prophylaxe/Therapie einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Patienten-spezifischen Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung von Hepatitis B.

A.

- (1) MENTISGFLG PLLVLQAGFF LLTRLTIPQ SLDSWWTSLN FLGGTTVCLG QNSQSPSTNH¹⁰
(2) MENTISGFLG PLLVLQAGFF LLTRLTIPQ SLDSWWTSLN FLGGSPVCLG QNSQSPSTNH
- 1) SPTSCPPTCP GYRWMCLRRF IFLFILLC LIFLLVLDY QGMLPVCPLI PGSTTTSTGP¹²⁰
(2) SPTSCPPICP GYRWMCLRRF IFLFILLC LIFLLVLDY QGMLPVCPLI PGSTTTSTGP
- ¹²¹
- (1) C¹²¹MTTAQG TSMVPSCCCT KPSDGNCTCI PIPSSWAFK FLWEWASRF SWLSLLVPFV¹²⁰
(2) C¹²¹CTTPAQQ NSMFPSCCCT KPTDGNCTCI PIPSSWAFK YLWEWASRF SWLSLLVPFV
- (1) QWFVGLSPTY WLSVWMMWY WGPSLYSL FFLPLPIFF CLWVYI¹²⁶
(2) QWFVGLSPTY WLSAVMMWY WGPSLYSVS FFLPLPIFF CLWVYI

B.

Epitop	Rest	Aminosäuresequenz		Restriktion	Prozessierung
		ayw	adw ₂		
1	208-215	ILSPFLPL	IVSPFIPL	K ¹	Exo
2	190-197	VWLSVWMM	VWLSAVMM	K ²	endo

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die wenigstens zwei Hepatitis B Virus Oberflächen-Antigene (HBsAg's), Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthalten, wobei sich die HBsAg's im Hepatitis B Virus (HBV) Genotyp und/oder Subtyp unterscheiden, und wobei die Zusammensetzung kein HBV Core Antigen (HBcAg) oder dieses kodierende Nukleinsäure enthält; pharmazeutische Zusammensetzungen, insbesondere Vakzine enthaltend diese Zusammensetzungen und deren Verwendung zur Prophylaxe/Therapie einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Patienten-spezifischen Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung von Hepatitis; und einen Kit zur Diagnostik von HBV-Genotypen/Subtypen.

[0002] Mehr als 250 Millionen Menschen sind weltweit mit Hepatitis B Virus (HBV) infiziert. Ein bedeutender Teil der Infizierten zeigt pathologische Konsequenzen, einschließlich chronischer hepatischer Insuffizienz, Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom (HCC). Die Ursache, warum bestimmte Personen eine akute HBV-Infektion entwickeln, während andere dies nicht tun, ist wenig verstanden. Klinische Daten und die Analogie mit weiteren chronischen viralen Infektionen haben die Bedeutung einer Zell-vermittelten Immunantwort bei der Bekämpfung viraler Infektionen betont, insbesondere einer solchen Immunantwort, die zytotoxische T-Lymphozyten umfaßt. Die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort ist ein kritischer Faktor, die akute HBV-Infektion zu beseitigen und die chronische HBV-Infektion zu verhindern. Das virale Genom kodiert unter anderem die Envelope-Proteine Prä-S1, Prä-S2 und das S-Antigen (HBsAg), die Polymerase und das Core-Protein (HBcAg).

[0003] Die chronische Hepatitis B stellt eine progredient verlaufende Leberentzündung dar, die chronisch persistierend oder chronisch aggressiv verlaufen kann. Die chronisch persistierende Hepatitis zeigt eine auf die verbreiterten Portalfelder der Leber beschränkte Infiltration mit zunehmender Fibrosierung; klinisch bestehen jahrelang (bis zu 10 Jahren) Zeichen der persistierenden Hepatitis, ca. 80 % der Fälle sind HBsAg-positiv. Die Pathogenese beruht wahrscheinlich auf der Insuffizienz des zellulären Immunsystems und persistierender Virusinfektion.

[0004] Das kleine Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg), ein 226-Aminosäuren Protein (p24/gp27 oder S-Protein), ist ein prominentes HBV-Antigen, das in 20–30 nm Lipoproteinpartikel selbst assembliert, in denen 100–150 Untereinheiten durch multiple inter- und intra-molekulare Disulfidbindungen quervernetzt sind. Die Variabilität des S Proteins aus HBV-Isolaten unterschiedlicher Subtypen und Genotypen ist begrenzt. Die vier stabilen, HBsAg Subtypen adw, ayw, adr und ayr betreffen einzelne Aminosäureaustausche an den Positionen 122 und 160, die benachbart zur immunodominanten „a-Determinante“ (eine hydrophile Region, die die Reste 124–147 umfaßt) gelegen sind. Bisher wurden diesen Subtypen keine biologischen oder pathogenetischen Unterschiede bei der HBV-Infektion zugeordnet.

[0005] 1982 wurde in der Bundesrepublik Deutschland erstmals ein Impfstoff (Vakzin) zugelassen, der aus dem Plasma chronischer HBsAg-Träger gewonnen wurde. Inzwischen wird der Impfstoff gentechnologisch gewonnen und zur aktiven Immunisierung gefährdeter Personengruppen angewendet. 95 % der vor Impfung seronegativen Personen zeigen nach einem Jahr eine Immunreaktion. Alle verwendeten Hepatitis B Impfstoffe enthalten in hoher Konzentration das gereinigte, der nicht infektiösen Hülle des Hepatitis B Virus entsprechende HBsAg-Protein und sind frei von Virus-DNA bzw. Formalin-inaktiviert.

[0006] Ein Nachteil des Standes der Technik besteht darin, dass mindestens 5 % der immunisierten Personen sog. „non-responder“ sind, die keine Immunantwort zeigen. Darüber hinaus ist bis heute kein Vakzin zur Behandlung von chronisch persistierender Hepatitis bekannt.

Stand der Technik

[0007] WO 01/40279 und WO 01/38498 beschreiben Vakzine auf der Basis von Hepatitis B Virus Genotyp G. Den beiden Patentschriften ist jedoch kein Hinweis auf die Kombination verschiedener Genotypen bzw. Subtypen zu entnehmen.

[0008] Michel et al., PNAS 92 (1995), 5307–5311 und Mancini et al., PNAS (1996), 12496–12501 betreffen DNA-Vakzine auf der Basis von HBsAg. Den Dokumenten ist kein Hinweis auf die Verwendung von Zusammensetzungen zu entnehmen, die Kombinationen von HBsAg unterschiedlicher HBV-Genotypen/Subtypen enthalten.

[0009] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, verbesserte Mittel zur Prophylaxe/Therapie einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung bereitzustellen. Der vorliegenden Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde, ein Patienten-spezifisches Arzneimittel zur therapeutischen Behandlung von Hepatitis anzugeben. Weiterhin soll ein verbesserter Kit zur Diagnostik von HBV-Infektionen bereitgestellt werden.

Aufgabenstellung

[0010] Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung einer Zusammensetzung, die wenigstens zwei Hepatitis B Virus Oberflächen-Antigene (HBsAg's), Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthält, wobei sich die HBsAg's im Hepatitis B Virus (HBV) Genotyp und/oder Subtyp unterscheiden, und wobei die Zusammensetzung kein HBV Core Antigen (HbcAg) oder dieses kodierende Nukleinsäure enthält.

[0011] Der vorliegenden Erfindung liegt folgende überraschende Beobachtung zugrunde. Als präklinisches Modell zur Beurteilung der Effizienz spezifischer Immuntherapieprotokolle für chronische HBV-Infektionen sind transgene Mäuse anzusehen, die konstitutiv den HBsAg-Subtyp ayw in der Leber exprimieren. Diese Mäuse produzieren große Mengen an HBsAg, welches aufgrund einer persistierenden Antigenämie auftritt, und sind im wesentlichen tolerant gegenüber HBsAg. Die Erfinder haben nun 2 Gruppen dieser transgenen Mäuse einerseits mit einem DNA-Vakzin, das einen HBsAg-Subtyp kodiert, der dem Subtyp der transgenen Maus entspricht (ayw), und andererseits mit einem DNA-Vakzin immunisiert, der HBsAg-Subtyp adw2 kodiert, der sich vom Subtyp der transgenen Maus unterscheidet. Trotz wiederholter Immunisierung der transgenen Maus mit einem HBsAg-Antigen, der dem eigenen HBsAg entspricht, konnte keine zytotoxische T-Zellantwort beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu ergab die Immunisierung der transgenen Mäuse mit einem vom eigenen Subtyp unterschiedlichen HBsAg-Subtyp Subtyp-spezifische und kreuzreaktive zytotoxische T-Zellantworten gegenüber HBsAg. Dies zeigt, dass eine natürlich vorkommende Variante von HBsAg die „Toleranz“ durch das Priming einer kreuzreaktiven T-Zellimmunität durchbrechen kann. Die Aktivierung der zytotoxischen T-Zell-Immunität führt hierbei zu einer Abnahme des HBsAg ayw-Antigens und ferner zu einer Leber-spezifischen Symptomatik, die einer akuten Hepatitis mit einer effektiven Bekämpfung des HBV entspricht. Die beobachtete Immunantwort ist insbesondere bemerkenswert, da sich die Aminosäuresequenz des HBsAg ayw-Antigens nur an wenigen Positionen von der Aminosäuresequenz des HBsAg adw2-Antigens unterscheidet. In der vorliegenden Erfindung wird festgestellt, dass bereits wenige konservative Austausche von Aminosäuren in einem T-Zellepitop zu einer veränderten T-Zellreaktion gegenüber diesem Epitop führen können.

[0012] Die Spezifität und Effizienz der T-Zellantwort gegen ein Proteinantigen wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert, insbesondere entscheidend ist (i) die proteolytische Freisetzung des Epitops (bzw. antigenen Peptids); (ii) die Affinität des antigenen Peptids für das Präsentierende Glykoprotein des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC); und (iii) die negative Interferenz kompetitiv sich entwickelnder T-Zellantworten gegen unterschiedliche Epitope desselben Antigens. Natürliche Varianten eines Proteinantigens können (durch individuelle Aminosäureaustausche in kritischen Sequenzen innerhalb des Epitops oder das Epitop flankierend, oder durch Schaffung neuer Epitope) auf folgenden 4 Wegen eine spezifische T-Zellantwort induzieren:

- (i) effizientere proteolytische Prozessierung (Freisetzung) des antigenen Peptids aus dem Protein;
- (ii) hoch-affine Bindung des antigenen Peptids an das präsentierende MHC Molekül;
- (iii) Elimination immundominanter Epitope (die Antworten gegen andere Epitope desselben Proteinantigens supprimieren) durch einen, in (i) und/oder (ii) aufgeführten, analogen Prozess, der die Immunogenität des Epitops abschwächt;
- (iv) neue Epitope können generiert werden.

[0013] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird demonstriert, dass natürliche Varianten des HBsAg, reflektiert durch die Genotypen bzw. Subtypen, ein breiteres Spektrum von Spezifitäten in der T-Zellantwort, die sie stimulieren, aufweisen.

[0014] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck „HBV Genotyp“ die Gesamtheit des Hepatitis B Virus Genoms. Vorzugsweise wird der HBV Genotyp durch Totalsequenzierung und phylogenetische Analyse bestimmt. Zur Zeit sind 8 Standardgenotypen bekannt. Diese 8 Genotypen basieren auf einer Nukleotidvariation von 8 % zueinander; siehe Bartholomeusz, Rev. Med. Virol. 13 (2003), 1–14. Vorzugsweise weist der HBV Genotyp A die Referenz-Nukleinsäuresequenz Genbank X02763 bzw. für den HBV Genotyp A_{af} die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AF297621 auf. Für den HBV Genotyp B_a ist die Referenz-Nukleinsäuresequenz Genbank D00330 und für den Genotyp B_j die Referenz-Nukleinsäuresequenz AB073858. Für den HBV Genotyp C ist die Referenz-Nukleinsäuresequenz Genbank AB033556, in Be-

zug auf den Genotyp C_{aus} die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AB048704. Für den Genotyp D ist die Referenz-Nukleinsäuresequenz Genbank X02496. Die Referenz-Nukleinsäuresequenz für den Genotyp E ist X75657. Die Referenz-Nukleinsäuresequenz für den Genotyp F ist X69798. Die Referenz-Nukleinsäuresequenz für den Genotyp G ist AF160501 und die Referenz-Nukleinsäuresequenz für den Genotyp H ist AY090454.

[0015] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck „HBV Subtyp“ jeden beliebigen bekannten Subtyp. Vorzugsweise ist der HBV Subtyp einer der vier stabilen Subtypen adw, adr, ayw und ayr. Der Ausdruck „HBV Subtyp“ umfaßt ebenfalls Untergliederungen dieser Subtypen wie z.B. adw2, ayw1, usw. In Bezug auf die vorgenannten Genotypen besteht eine gewisse Korrelation zwischen Genotyp und Subtyp wie folgt: Genotyp A korreliert mit Subtyp adw2, ayw1; Genotyp B korreliert mit adw2, ayw1, Genotyp C korreliert mit adw2, adr_q+, adr_q-, ayr, adr. Genotyp D korreliert mit ayw2, ayw3, ayw4. Genotyp E korreliert mit ayw4. Genotyp F korreliert mit adw4_q-, adw2 und ayw4, Genotyp G korreliert mit adw2 und Genotyp H korreliert mit adw4.

[0016] Die Bestimmung des HBV-Subtyps eines infizierten Patienten kann serologisch mit Hilfe von mono-spezifischen Antikörpern z.B. anti-d, anti-y, anti-r, anti-a(w) durchgeführt werden. Die Bestimmung kann als Agardiffusionstest oder als Radioimmunassay erfolgen; („HBs Antigen Subtypes“, Herausgeber: Couroucé, A. M., Holland, P.V., Muller, J.Y. and Soulier, J. P., Bibliotheca Haematologica no. 42, S. Karger, Basel, 1976).

[0017] Vorzugsweise wird der Subtyp durch Sequenzierung der HBsAg-kodierenden DNA aus Patientenserum bestimmt. Aus der bestimmten Nukleinsäuresequenz wird dann die Aminosäuresequenz des HBsAg abgeleitet. Die Zuordnung des Subtyps erfolgt dann über die Aminosäuren an den Positionen 122 und 160 wie beschrieben in Magnius, L.O. und Norder, H., „Subtypes, Genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene“ Intervirology 38(1-2): 24–34.

[0018] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck „Hepatitis B Virus Oberflächen-Antigen“ (HBsAg) das kleine HBV Oberflächen-Antigen oder S Protein (p24/gp27). HBsAg kann hierbei ferner die Prä-S1- und/oder Prä-S2-Proteindomänen umfassen.

[0019] In Bezug auf die Numerierung von HBsAg wird das System gemäß Kidd-Ljunggren et al., J. Gen. Virol. 83 (2002), 1267–1280 verwendet.

[0020] Der Ausdruck „Fragment“ umfaßt erfindungsgemäß Fragmente von HBsAg. Vorzugsweise umfaßt das Fragment mindestens 5 Aminosäuren und enthält ein T-Zell-Epitop, vorzugsweise mindestens 10, besonders bevorzugt mindestens 20, insbesondere mindestens 50 Aminosäuren. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung wenigstens zwei HBsAg's oder zwei Fragmente davon. Diese Zusammensetzung ist insbesondere als Vakzine auf Polypeptidbasis verwendbar. Besonders bevorzugt in dem Fall, in dem die Zusammensetzung zwei Fragmente enthält, die sich von HBsAg's mit unterschiedlichem HBV Genotyp und/oder Subtyp ableiten, haben das erste und das zweite Fragment wenigstens 10, vorzugsweise 20 Aminosäuren gemeinsam, unterscheiden sich jedoch wenigstens durch eine Aminosäure.

[0021] Wie vorstehend ausgeführt, besteht eine Erkenntnis der vorliegenden Erfindung darin, dass bereits sehr geringe Unterschiede in einem Antigen (HBsAg) aufgrund unterschiedlicher Genotypen und/oder Subtypen zu modifizierten T-Zellepitopen führen, die sich lediglich geringfügig voneinander unterscheiden, jedoch zu einer dramatischen Veränderung der T-Zell-Reaktivität führen. Die beiden sich durch wenigstens eine Aminosäure voneinander unterscheidenden Fragmente können daher leicht durch einfachen Sequenzvergleich der bekannten Genotypen in Bezug auf das HBsAg ermittelt werden. Geeignete Fragmente, die sich durch wenigstens eine Aminosäure voneinander unterscheiden, können in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verwendet werden. Vorzugsweise enthalten die Fragmente wenigstens ein T-Zell-Epitop, besonders bevorzugt ein humanes T-Zell-Epitop. Verfahren zur Bestimmung von T-Zell-Epitopen sind bekannt z.B. Lauer et al., J. Virol. 76 (2002), 6104–6113.

[0022] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung wenigstens zwei HBsAg's und/oder wenigstens zwei Fragmente davon.

[0023] Ferner bevorzugt sind Zusammensetzungen, die wenigstens ein erstes HBsAg oder ein Fragment davon und ein zweites HBsAg oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure enthalten, wobei sich das erste und zweite HBsAg im HBV Genotyp/Subtyp unterscheiden.

[0024] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung wenigstens zwei Nukleinsäuren, die zwei HBsAg's kodieren, wobei sich die HBsAg's im HBV Genotyp und/oder Subtyp unterscheiden. Die Nukleinsäuren können hierbei auch solche sein, die ein wie vorstehend definiertes Fragment kodieren. Die Nukleinsäuren können virale DNA oder synthetische DNA sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten. Weiterhin kann es sich bei den Nukleinsäuren um RNA-Moleküle handeln, was für die Expression mittels rekombinanter Vektorsysteme erforderlich sein kann. Ferner werden erfindungsgemäß auch gemischte DNA/RNA-Moleküle als Nukleinsäuren in Betracht gezogen.

[0025] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der Genotyp ausgewählt aus den bekannten Genotypen A, B, C, D, E, F, G oder H. Im Hinblick auf die jeweilige Referenz-Nukleinsäuresequenz wird auf den vorstehenden Definitionsabschnitt verwiesen. Üblicherweise wird der Genotyp hierbei über eine 8 %ige Nukleotid-Variation relativ zur Referenz-Nukleinsäuresequenz bestimmt, d.h. Nukleinsäuren, die wenigstens 92 % Identität mit der Referenz-Nukleinsäuresequenz aufweisen, werden definitionsgemäß ebenso als Genotyp verstanden. Besonders bevorzugt ist die Identität wenigstens 95 %, insbesondere 98 % relativ zur Referenz-Nukleinsäuresequenz. Die „Identität“ relativ zur Referenz-Nukleinsäuresequenz wird hierbei mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt. Generell werden besondere Computerprogramme mit Algorithmen unter Berücksichtigung spezieller Erfordernisse verwendet.

[0026] Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den zu vergleichenden Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), 387; Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (WI); und BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S., et al. J. Mol. Biol. 215 (1990), 403–410. Das BLASTX Programm kann erhalten werden vom National Center For Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen (BLAST Handbuch, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al.; vorstehend). Der bekannte Smith-Waterman Algorithmus kann ebenso zur Bestimmung der Identität verwendet werden.

[0027] Bevorzugte Parameter zum Nukleinsäurevergleich umfassen die nachfolgenden:
Algorithmus Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (1970), 443–453

Vergleichsmatrix:

Matches = +10
Mismatches = 0
Gap penalty :50
Gap length penalty: 3

[0028] Das GAP-Programm ist ebenso zur Verwendung mit dem vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die default-Parameter im Nukleinsäuresequenzvergleich. Weitere Beispiele für Algorithmen, Gap Opening Penalties, Gap Extension Penalties und Vergleichsmatrizen umfassen jene in dem Programmhandbuch Wisconsin Package, Version 9, September 1997. Die Wahl hängt hierbei von dem durchführenden Vergleich ab und ferner, ob der Vergleich zwischen Paaren von Sequenzen durchgeführt wird, wenn GAP oder Best Fit verwendet werden oder zwischen einer Sequenz und einer großen Sequenzdatenbank, wenn FASTA oder BLAST verwendet werden.

[0029] Eine Übereinstimmung von 92 % gemäß dem vorstehenden Algorithmus bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung 92 % Identität. Das gleiche gilt für höhere Identitäten.

[0030] Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet, dass die Variante eine Polymerase kodiert, deren Aktivität im wesentlichen der Aktivität der von der Referenz-Nukleinsäuresequenz kodierten Polymerase entspricht und/oder die Variante ein HBsAg kodiert, dessen Immunreaktivität im wesentlichen der Immunreaktivität des von der Referenz-Nukleinsäure kodierten HBsAg entspricht.

[0031] Die Polymeraseaktivität kann hierbei bestimmt werden gemäß Kim et al, Biochem. Mol. Biol. Int. 1999; 47 (2), 301–308. Die Immunreaktivität von HBsAg kann durch kommerziell erhältliche Antigen-ELISA's bestimmt werden. Eine „im wesentlichen von der Immunreaktivität des von der Referenz-Nukleinsäure kodierten HBsAg“ bedeutet, dass ein Antikörper an das Referenz HBsAg mit im wesentlichen derselben Affinität wie an das von der Variante kodierte HBsAg bindet.

[0032] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist der Subtyp ausgewählt aus: adw, ayw, adr oder ayr. Diese stellen die vier stabilen HBsAg Subtypen dar, die sich in der Aminosäurebesetzung an den Positionen 122 (d/y) und 160 (w/r) unterscheiden. Die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Subtyp kann wie vorstehend beschrieben bestimmt werden.

[0033] Erfindungsgemäß werden auch sämtliche weiteren Untergliederungen der Subtypen umfaßt.

[0034] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung wenigstens drei, vorzugsweise wenigstens fünf unterschiedliche HBsAg's, Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren.

[0035] Besonders bevorzugt enthält die Zusammensetzung HBsAg's sämtlicher bekannter HBV Genotypen und/oder Subtypen, Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren.

[0036] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zusammensetzung liegt die Nukleinsäure, die HBsAg oder ein Fragment davon kodiert, in einem Vektor unter der Kontrolle eines zur Expression von HBsAg in einer Säugerzelle, vorzugsweise einer humanen Zelle, geeigneten Promotors vor. Sofern die Zusammensetzung wenigstens zwei HBsAg oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäuren enthält, können diese in demselben Vektor (binärer Vektor) oder getrennt voneinander auf verschiedenen Vektoren vorliegen. Geeignete Vektoren sind hierbei bspw. Plasmide, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, Masernviren und Retroviren. Der Vektor umfaßt generell einen Replikationsursprung, der die Replikation des Vektors in der transfizierten Säugerzelle bewirkt.

[0037] Geeignete Promotoren können sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren sein. Bevorzugte Promotoren sind abgeleitet von CMV und SV-40.

[0038] Die vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen können durch einfaches Mischen der einzelnen Komponenten erhalten werden und sind daher sehr einfach herstellbar. Geeignete Lösungsmittel und Träger hängen hierbei von der Art der Zusammensetzung (Polypeptid und/oder Nukleinsäuren) ab. Grundsätzlich sind wasserhaltige Systeme bevorzugt. HBsAg oder Fragmente davon sind synthetisch oder durch rekombinante Herstellung erhältlich. Die hergestellten Polypeptide können durch chromatographische Verfahren aufgereinigt werden.

[0039] Alternativ können die Zusammensetzungen erhalten werden durch Co-Expression der wenigstens zwei HBsAg oder Fragmente davon kodierenden Nukleinsäuren in einem rekombinanten Expressionssystem. Dem Fachmann sind zahlreiche Expressionssysteme und -verfahren bekannt, vorzugsweise wird Hefe als Wirtszelle, besonders bevorzugt *Hansenula polymorpha* verwendet. Die Nukleinsäuren können hierbei innerhalb eines Vektors oder in zwei voneinander getrennten Vektoren vorliegen. Geeignete Vektoren und Promotoren sind hierbei wie vorstehend beschrieben.

[0040] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die eine erfindungsgemäße Zusammensetzung und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten. Pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann bekannt. Beispiele sind: Aluminiumsalze, Calciumphosphat, Lyophilisate des HBsAg mit oder ohne Polysaccharidzusatz, Öl-in-Wasser-Emulsionen, Poly-Lactid-Co-glycolat. Diesen Trägern können, soweit nicht selbst schon adjuvantiv wirkend, weitere Adjuvantien beigefügt sein, wie z.B. Lipid A-Mimetika, Immunstimulatorische Nukleotide oder bakterielle Toxine.

[0041] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist insbesondere ein Vakzin. Erfindungsgemäß wird angegeben, dass die pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere das Vakzin, zur therapeutischen Behandlung einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung geeignet ist. Ebenso ist die pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere das Vakzin, zur prophylaktischen Behandlung einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung geeignet. Die HBV-Infektion ist vorzugsweise eine chronisch persistierende Hepatitis B-Infektion. Eine HBV-vermittelte Erkrankung kann eine akute chronische Hepatitis B-Infektion sein. Weitere HBV-vermittelte Erkrankungen sind die Leberzirrhose und das primäre Leberzellkarzinom. Das Vakzin ist zur Verabreichung an klinisch inapparente HBV-Träger geeignet, d.h., solche, die noch nicht im eigentlichen Sinne erkrankt sind, jedoch für die Zukunft ein hohes Risiko aufweisen, eine HBV-vermittelte Erkrankung auszubilden.

[0042] Die pharmazeutische Zusammensetzung kann intramuskulär, subkutan, intradermal, intravenös, mucosal oder oral verabreicht werden, wobei dies lediglich als bevorzugt angegeben wird und nicht darauf be-

schränkt ist.

[0043] Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält die wenigstens zwei HBsAg's oder Fragmente davon im Dosisbereich von 0,1 bis 1000 µg/HBsAg oder Fragment davon, vorzugsweise 2,5 bis 40 µg/HBsAg oder Fragment davon.

[0044] Sofern die pharmazeutische Zusammensetzung, HBsAg oder Fragmente davon kodierende Nukleinsäuren enthält, so liegen diese im Dosisbereich von 10 bis 1000 µg/HBsAg oder Fragment davon kodierende Nukleinsäure.

[0045] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung von Hepatitis B angegeben, das die Schritte umfaßt:

- a) Bestimmen des HBV-Genotyps oder Subtyps, mit dem der Patient infiziert ist; und
- b) Bereitstellen eines Arzneimittels, das wenigstens ein HBsAg eines HBV Genotyps oder Subtyps, ein Fragment des HBsAg oder eine HBsAg oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure enthält, wobei der HBV Genotyp oder Subtyp sich vom nach a) bestimmten HBV Genotyp oder Subtyp des Patienten unterscheidet.

[0046] Wie vorstehend ausgeführt, besteht eine wesentliche Erkenntnis der vorliegenden Erfindung darin, dass in einem präklinischen Modell der chronisch persistierenden Hepatitis ein Behandlungseffekt dadurch erzielt werden konnte, dass das transgene Tier mit einem HBsAg behandelt wurde, das von einem HBV Genotyp/Subtyp stammt, der sich vom Genotyp/Subtyp des transgenen Tieres unterscheidet.

[0047] Der Genotyp kann hierbei durch die folgenden Verfahren bestimmt werden: Sequenzierung des vollständigen HBV-Genoms oder wenigstens des für das HBsAg-kodierenden Abschnitts und phylogenetische Analyse, Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), Multiplex-PCR.

[0048] Der Subtyp wird wie vorstehend ausgeführt durch Sequenzierung und Bestimmung der Aminosäuren an den Positionen 122 und 160 determiniert.

[0049] Das Bereitstellen des Arzneimittels wird durch Formulieren wenigstens eines HBsAg, eines Fragments davon oder einer HBsAg oder eines Fragments davon kodierende Nukleinsäure in an sich bekannter Weise durchgeführt.

[0050] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen Kit zur Diagnostik des Genotyps oder Subtyps einer HBV-Infektion bereit. Der Kit umfaßt hierbei wenigstens zwei HBsAg-spezifische Bindungsmittel, dadurch gekennzeichnet, dass die zwei HBsAg-spezifischen Bindungsmittel für unterschiedliche HBV-Genotypen und/oder Subtypen spezifisch sind. Die wenigstens zwei HBsAg-spezifischen Bindungsmittel können hierbei HBsAg Genotyp/Subtyp-spezifische Primer und/oder spezifische Antikörper sein. Die Primer können hierbei eine Länge von 10–30 Nukleotiden aufweisen und sind komplementär zu den bekannten HBsAg-Sequenzen des jeweiligen Genotyps. Die Antikörper sind Antikörper, die bspw. erhalten werden können durch Immunisierung mit dem jeweiligen HBsAg-Subtyp von Versuchstieren, wie z.B. Mäusen, Herstellen von Hybridoma in an sich bekannter Weise und Screening auf Subtyp-spezifische monoklonale Antikörper.

Figurenbeschreibung

[0051] Fig. 1: HBsAg Varianten. (A) Die Aminosäuresequenz des kleinen Hepatitis B Oberflächen-Antigens (HBsAg) ayw (1) und adw2 (2) Subtyp sind gezeigt. (B) HBsAg ayw- und adw2-abgeleitete, K^b-restringierte Epitopsequenzen. Das Epitop 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) wurde nur von den Zellen präsentiert, die exogenes HBsAg prozessieren, wohingegen Epitop 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) nur von den Zellen präsentiert wurde, die endogenes HBsAg prozessieren.

[0052] Fig. 2: Transfer von Epitop 1- oder Epitop 2-spezifischen zytotoxischen T-Zelllinien (CTL) in HBs-transgene (HBs-tg) Wirte führen zytotoxische T-Zelllinien HBs-transgene zu transienter Leberschädigung. Die Milzzellen wurden entnommen aus pCI/S_{ayw} DNA-immunisierten B6-Mäusen und in vitro mit syngenem, RBL5-Zellen restimuliert, wobei die RBL5-Zellen mit K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ Bindungspeptid 1 (ILSPFLPL) oder K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ Bindungspeptid 2 (VWLSVIWM) gepulst waren, oder mit ConA stimuliert wurden. 5 × 10⁶ CD8⁺ CTL/Maus wurden intravenös (i.v.) in HBs-tg Mäuse injiziert und die durchschnittlichen Serum Alanin-Transaminase (ALT)-Spiegel bestimmt.

[0053] Fig. 3: Ex vivo Nachweis von HBsAg-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Leber und Milz immunisierter

Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden intramuskulär durch eine einzelne Injektion von 100 µg pCI/S_{ayw}-DNA immunisiert. Spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden 12 Tage nach der Immunisierung nachgewiesen. Isolierte Leber-mononukleäre Zellen (MNC) und Milzzellen wurden in vitro über vier Stunden (in Gegenwart von Brefeldin A) mit dem K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ Bindungspeptid 1 (ILSPFLPL) oder dem K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ Bindungspeptid 2 (VWLSVIWM) restimuliert. Die Durchschnittsfrequenz von CD8⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen/10⁵ CD8⁺ T-Zellen \pm Standardabweichung von 4–6 Mäusen (aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten) pro Gruppe ist gezeigt.

[0054] Fig. 4: HBsAg-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen das Epitop 1 in HBs-tg-Mäusen. HBs-tg-Mäuse, die HBsAg_{ayw} in der Leber exprimieren, wurden intramuskulär dreimal (in vierwöchigem Abstand) mit DNA-Vakzinen immunisiert, die HBsAg Subtyp ayw(pCI/S_{ayw}) oder adw2 (pCI/S_{adw2}) kodieren, oder mit dem Negativ-Kontrollvektor pCI (Vektor ohne Insert). Die Milzzellen wurden aus den immunisierten Mäusen 12 Tage nach der letzten Immunisierung entnommen und wurden über vier Stunden in vitro (in Gegenwart von Brefeldin A) mit RBL5-Zellen restimuliert, wobei die RBL5-Zellen mit HBsAg-Partikeln des ayw (RBL5/S_{ayw}^P) oder adw2 (RBL5/S_{adw2}^P) Subtyp, oder mit dem K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ Bindungspeptid 1 von HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) oder HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) restimuliert wurden. Die durchschnittliche Anzahl an Milz-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen/10⁵ CD8⁺ T-Zellen \pm Standardabweichung von 4–6 Mäusen (aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten) pro Gruppe ist gezeigt.

[0055] Fig. 5: HBsAg-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen Epitop 2 in HBs-tg Mäusen. Die Milzzellen wurden aus Mäusen entnommen, die wie in Bezug auf die Legende von **Fig. 4** beschrieben, immunisiert waren, und in vitro mit syngenischen RBL5/S_{ayw} oder RBL5/S_{adw2}-Transfektanten, oder dem K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ Epitop 2 von HBsAg_{ayw} (VWLSVIWM) oder HBsAg_{adw2} (VWLSAIWM) restimuliert wurden. Die durchschnittlichen Anzahlen von Milz-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen/10⁵ CD8⁺ T-Zellen \pm Standardabweichung von 4 Mäusen pro Gruppe ist gezeigt.

[0056] Fig. 6: S₂₀₈₋₂₁₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in der Leber von immunisierten HBstg-Mäusen nachgewiesen. Transgene HBs-tg-Mäuse wurden dreimal (im Abstand von 4 Wochen) mit einer DNA-Vakzine immunisiert, die HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) kodiert. Leber- und Milzzellen wurden aus immunisierten Mäusen 12 Tage nach der letzten Injektion entnommen und in vitro mit dem K^b/S₂₀₈₋₂₁₅-Bindungspeptid ILSPFLPL restimuliert. Die durchschnittlichen Anzahl an Milz-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen/10⁵ CD8⁺ T-Zellen \pm Standardabweichung von 4 Mäusen pro Gruppe ist gezeigt.

[0057] Fig. 7: Leberhistopathologie von HBs-tg-Mäusen, die mit dem pCI/S_{adw2} DNA-Vakzin immunisiert wurden. Nicht-pathologische Leber-Histologie wurde in B6-Mäusen (A, B) beobachtet. HBs-tg-Mäuse (C, D) zeigten eine moderate Zellvergrößerung und das Cytoplasma zeigt ein milchglasartiges Aussehen (D). Die Kerne der Leberzellen erscheinen moderat polymorph. Periportale Infiltrationen sind selten. Das wiederholte Immunisieren mit pCI/S_{adw2} DNA induziert schwerwiegende histomorphologische Veränderungen der Leber (E-I), die konsistent sind mit akuter viraler Hepatitis. Inflammatorische Infiltrationen umfassen Kuppfer-Zellen, Lymphozyten und wenige polymorphnukleäre Granulozyten, die im lobulären Parenchym (F) und in den Periportal-Feldern (G) gelegen sind. Die Hepatozyten erscheinen hydropisch und weisen oft pyknotische Kerne auf, welches ein Anzeichen für ein frühes Stadium der Apoptose darstellt (F, Pfeile). Acidophile Körper (H, Pfeile), d.h., apoptotische Leberzellen sind häufig und oftmals umrundet von fokalen inflammatorischen Infiltrationen. Viele Leberzellkerne zeigen deutliche Vakuolisierung (I, Pfeile). H & E-Färbungen von Formalin-fixiertem, Parafin-eingebettetem Gewebe. Ursprüngliche Vergrößerungen: $\times 10$ in A, C, und E; $\times 40$ in B, D, und F; $\times 63$ in G-I.

[0058] Fig. 8: Die Induktion von HBsAg-spezifischen Serumantikörper-Antworten in HBs-tg-Mäusen. B6- und transgene HBs-tg-Mäuse wurden intramuskulär mit DNA-Vakzinen kodiert, die HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) oder HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) kodieren und nach drei Wochen mit den gleichen Vakzinen geboostet. Vier Wochen nach der letzten Injektion wurden Serumproben auf HBsAg-Antigen (A) oder HBsAg-spezifische Antikörper (B) untersucht. Die durchschnittlichen Antikörper-Titer (mIU/ml) und Serum HBsAg-Spiegel (ng/ml) \pm Standardabweichungen von 4–6 Mäusen/Gruppe sind gezeigt.

[0059] Nachstehend wird die Erfindung anhand von Beispielen erläutert. Diese Beispiele sind jedoch nicht beabsichtigt, die Erfindung zu beschränken.

Beispiele:

Material und Methoden

Allgemein

[0060] Der untersuchte HBV Subtyp adw2 entspricht dem Genotyp A. Der HBV Subtyp ayw entspricht dem Genotyp D.

Mäuse

[0061] C57BL/6JBom (B6) Mäuse (H-2^b) wurden unter Standardpathogen-freien Bedingungen gehalten.

[0062] C57BL/6J-TgN(Alb1HBV)44Bri Transgene (HBs-tg) Mäuse, die HBsAg_{ayw} (kodiert durch die HBV-Sequenz mit der Hinterlegungsnummer V01460 J02203, wurden vom The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME) bezogen. Männliche und weibliche Mäuse wurden im Alter von 8–16 Wochen verwendet.

Zellen, rekombinante HBsAg Partikel und antigene HBsAg-Peptide

[0063] Die verwendete H-2^b-Zelllinie RBL5 ist beschrieben in [10]. Stabile RBL5 Transfektanten, die ähnliche Mengen an HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2} exprimierten, wurden hergestellt (Daten nicht gezeigt). Rekombinante HBsAg Subtyp ayw oder adw2 Partikel sind von der Firma Rhein Biotech GmbH (Düsseldorf, Deutschland) erhältlich. Die in dem Hansenula polymorpha Wirtstamm RB10 hergestellten HBsAg Partikel wurden wie beschrieben [3] aufgereinigt. Die synthetischen K^b-bindenden S₂₀₈₋₂₁₅ ILSPFLPL (ayw) oder IVSPFIPL (Subtyp adw2) Peptide, und die K^b-bindenden S₁₉₀₋₁₉₇ VWLSVIWM (ayw) oder VWLSAIWM (adw2) Peptide wurden von Jerini Bio Tools (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Peptide wurden in einer DMSO-Lösung in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und mit Kulturmedium vor der Verwendung verdünnt.

Plasmide und DNA-Immunisierung

[0064] HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2} wurden in die pCI (Promega) und BMGneo-Vektoren wie beschrieben [4; 5] kloniert. Als DNA-Vakzine wurden die Plasmide pCI/S_{ayw} und pCI/S_{adw2} verwendet, die HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2} gleich gut exprimierten. Dies wurde durch Immunpräzipitation von HBsAg aus Zellen, die transient mit der DNA dieser Plasmide transfiziert waren, gezeigt (Daten nicht gezeigt). Unterschiede in der Immunogenizität der HBsAg-Epitope sind daher nicht aufgrund unterschiedlicher Mengen der HBsAg-Expression durch das DNA-Vakzin oder die Transfektanten zu erklären. Zur intramuskulären Nukleinsäureimmunisierung wurden 50 µl PBS (Phosphat gepufferte Saline) enthaltend 1 µg/µl Plasmid-DNA in den Tibialis anterior Muskel wie beschrieben [4] injiziert.

Bestimmung der spezifischen Milz- und Leber-CD8⁺-T-Zell-Frequenzen

[0065] Milzzellsuspensionen [1] und die Herstellung von hepatischen NPZ (Nicht-parenchymaten) Zellen wurde beschrieben [6; 7]. Die Milzzellen und die Leber NPZ (1×10^6 /ml) wurden über 1 Stunde in RPMI-1640 Medium mit 5 µg/µl HBsAg-abgeleiteten Peptiden, oder HBsAg-exprimierenden Transfektanten (10^6 /ml) oder HBsAg Partikel gepulsten Zellen inkubiert. Sodann wurde 5 µg/µl Brefeldin A (BFA) (Katalog Nr. 15870; Sigma) hinzugefügt, und die Kulturen wurden über weitere 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und deren Oberfläche mit anti-CD8 mAb gefärbt, fixiert, permeabilisiert und eine Färbung auf cytoplasmatisches IFN γ durchgeführt. Die Frequenzen von CD8⁺ IFN γ ⁺ CTL wurden durch FACS Analyse. Der Durchschnittswert für CD8⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen/ 10^5 Milz- oder Leber-T-Zellen ist gezeigt.

Transfer von spezifischen CD8⁺-T-Zelllinien

[0066] CD8⁺-T-Zelllinien wurden aus der Milz von B6-Mäusen erhalten, die mit dem pCI/S_{ayw} DNA-Vakzin immunisiert wurden. Die Milzzellen wurden in vitro mit syngenischen RBL5-Zellen restimuliert, die mit dem K^b/S₂₀₈₋₂₁₅-Bindungspeptid 1 (ILSPFLPL) oder dem K^b/S₁₉₀₋₁₉₇-Bindungspeptid 2 (VWLSVIWM) gepulst wurden. In Linien, die über etwa 2 Wochen in vitro expandiert wurden, waren mehr als 80 % der CD8⁺-T-Zellen von der erwarteten Epitop-Spezifität, wie sich aus den spezifischen IFN γ -Expressionsuntersuchungen ergibt. Die Zellen wurden gewaschen, und 5×10^6 Zellen dieser Linien wurden intravenös injiziert. Kontrollzellen waren nicht-spezifische CD8⁺-T-Blasten, die aus 3 Tage ConA-stimulierten Kulturen isoliert wurden.

Bestimmung von Transaminasen, HBsAg und anti-HBsAg Antikörper im Serum

[0067] Serumantikörper wurden wiederholt von einzelnen, immunisierten oder Kontrollmäusen durch Blutentnahme aus der Schwanzvene zu bestimmten Zeitpunkten nach der Injektion erhalten. Die Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT)-Aktivität wurde im Blut unter Verwendung des Reflotron® Tests (Katalog Nr. 745138; Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Die HBsAg-Konzentration im Serum der transgenen Mäuse wurde bestimmt durch den kommerziellen ELISA AUSZYME II (ABBOTT Laborstories, Wiesbaden, Deutschland) Test. Antikörper gegen HBsAg wurden in Mäuseseren unter Verwendung des kommerziellen IMx AUSAB Tests (Katalog Nr. 7A39-20; Abbott, Wiesbaden, Deutschland) nachgewiesen.

[0068] Antikörperspiegel wurden mit Hilfe von 6 Standardseren qualifiziert. Die getesteten Seren wurden so verdünnt, dass die gemessenen OD-Werte zwischen dem Standardserum eins und sechs lagen. Die hier gezeigten Werte wurden bestimmt durch Multiplikation der Serumverdünnung mit dem gemessenen Antikörperspiegel (mIU/ml). Die dargestellten Serumtiter entsprechen dem Mittel von 4 einzelnen Mäusen \pm Standardabweichung.

Histologie

[0069] Dünne Lebergewebeschnitte (<3mm) wurden in 4 % Formalin (pH 7,0) über 24 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. 2 μ m dicke Paraffin-Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt.

Bindung von HBsAg-Peptiden an K^b

[0070] Affinitätsaufgereinigte MHC Klasse I-Moleküle K^b wurden über 48 Stunden bei 18°C mit ansteigenden Konzentrationen von Testpeptid und einer definierten Konzentration (ungefähr 2 nM) radioaktiv markierten VSV NP 52-59 Indikatorpeptid in Gegenwart von 3 μ M humanem β 2m wie beschrieben [8, 9] inkubiert. Nachfolgend wurde die Bindung der Peptide an MHC Klasse I Moleküle durch Sephadex G50 Säulen-Gelfiltration bestimmt [8]. Das radioaktiv markierte VSV NP 52-59 Peptid befand sich im Ausschlussvolumen (MHC-gebundenes Peptid) und Einschlußvolumen (freies Peptid). Dies wurde bestimmt durch Gamma-Radio-Spektrometrie und der Anteil des Test-Peptides, der an das MHC-Molekül relativ zur Gesamtmenge an Test-Peptid gebunden hatte, wurde bestimmt. Die Konzentration des Test-Peptids, die benötigt wurde, um eine 50%ige Hemmung der Bindung des Indikator-Peptides (IC50-Wert) zu erhalten, wurde bestimmt. Je niedriger der IC50-Wert, umso besser ist die Bindung des Test-Peptides. Um die Depletion an Ligand zu verhindern, wurde in sämtlichen Bindungsexperimenten eine MHC-Konzentration verwendet, die ausreichend war, um nicht mehr als 15–25 % Bindung zu erhalten. Unter diesen Bedingungen ist der IC50-Wert eine Näherung zur Dissoziationskonstante (K_d). Sämtliche Bindungsexperimente wurden als Inhibitionsexperimente durchgeführt.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Adoptiver Transfer von K^b restringierten CD8⁺-T-Zelllinien, die spezifisch für das Epitop 1, oder das Epitop 2 sind, induzieren Leberschädigung in HBs-tg B6 Mäusen

[0071] Es wurden kurzzeitige CD8⁺-T-Zelllinien erzeugt, die spezifisch für das Epitop 1 oder Epitop 2 (**Fig. 1B**) von HBsAg aus der Milz von B6 Mäusen sind und die immunisiert waren mit pCI/S_{ayw} Plasmid-DNA. Innerhalb dieser Linien waren >95% der Zellen CD8⁺, und die spezifische IFN γ -Expression konnte in >80% dieser CD8⁺-T-Zellen induziert werden. Der adoptive Transfer von 5×10^6 Zellen dieser Linien in kongene B6-Wirte, die HBsAg_{ayw} in der Leber von einem Transgen exprimierten, induzierte akute Leberschädigung, wie sich durch einen kurzen, jedoch hohen Anstieg an Serum-Transaminase ergab (**Fig. 2**). Die Serum-Transaminasespiegel normalisierten sich 5–6 Tage nach dem Transfer und keine transferierten CD8⁺-T-Zellen waren in dem Wirt zu diesem späten Zeitpunkt nachweisbar. Transfer einer gleichen Anzahl an polyklonalen (mitogen-aktivierten) CD8⁺-T-Blasten zeigte keine Leberschädigung. Daher wurde festgestellt, dass (i) spezifische CD8⁺-T-Zellen wirksam die Leberschädigung in HBs-tg Mäusen induzieren (wie beschrieben in [2]); (ii) die HBsAg-Epitope, die durch Prozessierung von endogenem oder exogenem HBsAg erzeugt wurden, werden in der Transgen-exprimierenden Leber präsentiert; und (iii) adoptiv transferierte CD8⁺-T-Zellen werden rasch aus dem transgenen Wirt entfernt. Transferierte CD8⁺-T-Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten von HBsAg haben daher Zutritt zur Leber und können in situ aktiviert werden, können jedoch nicht stabil aufgenommen werden.

Beispiel 2

K^b-restringierte CTL, die die HBsAg Epitope 1 und 2 erkennen wurden in der Milz und Leber beobachtet

[0072] Es wurde untersucht, ob Vakzin-geprimte HBsAg-spezifische CD8⁺-T-Zellen Zugang zur Leber in normalen oder transgenen HBsAg-exprimierenden (HBs-tg) B6-Mäusen (**Fig. 3**) haben. Milzzellen und nicht-parenchymale Leberzellen (NPZ) wurden aus B6-Mäusen isoliert, die 12–15 Tage zuvor mit dem pCI/S_{ayw} Vakzin immunisiert waren. CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch für Epitop 1 oder Epitop 2 waren, wurden in Milz- und Leber-CD8⁺-T-Zellpopulationen aus normal B6 Mäusen gefunden (**Fig. 3A**). Obwohl die Frequenz an HBsAg-spezifischen CD8⁺-T-Zellen innerhalb der Leber CD8⁺-T-Zellpopulationen hoch war, waren ihre absoluten Zahlen geringer als in der Milz (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu war keine CD8⁺-T-Zellreaktivität in HBsAg_{ayw} tg B6-Mäusen nachweisbar, die mit dem DNA-Vakzin immunisiert waren, das HBsAg_{ayw} kodiert (**Fig. 3B**). Weder 3 Boost-Injektionen (in dreiwöchigem Abstand) mit dem DNA-Vakzin, noch wiederholte Immunisierungen mit HBsAg Antigen-Partikeln und Oligonukleotid-Adjuvanz rief HBsAg-spezifische CD8⁺-T-Zellimmunität in HBs-tg-Mäusen hervor (Daten nicht gezeigt). Somit können Impfprotokolle unter Verwendung der gleichen HBsAg-Variante, gegen die die Maus tolerant ist, keine wirksame anti-virale CD8⁺-T-Zell-Immunität primen.

Beispiel 3

K^b-restringierte T-Zellantworten gegen die Epitope der HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2}-Varianten

[0073] Die 226 Aminosäurereste aufweisenden HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2}-Proteine aus den HBV Isolaten unterscheiden sich in 16 Aminosäureresten (somit eine 93%ige Identität ihrer Aminosäuren). Die Sequenz des HBsAg_{ayw}-Proteins, das verwendet wurde, ist identisch mit der Sequenz des Transgen-kodierten HBsAg_{ayw}, das von den HBs-tg B6-Mäusen exprimiert wurde. Die Sequenzen der K^b-Bindungsepitope 1 und 2 von HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2}, die ausgewählt wurden, unterscheiden sich um 1 bzw. 2 Aminosäurereste innerhalb des Epitops, weisen jedoch identische flankierende Sequenzen auf (**Fig. 1A, B**). Das S₂₀₈₋₂₁₅-Epitop 1 von HBsAg_{ayw} und HBsAg_{adw2} unterscheiden sich in zwei Positionen: in adw2, ist ein Valin (V)-Rest durch ein Leucin (L) an Position 2 substituiert, und ein Isoleucin (I) ist durch einen Leucin (L)-Rest an Position 6 ersetzt (**Fig. 1B**). Die Bindungsaffinität des Epitops 1 von K^b war ziemlich gering; die HBsAg_{adw2}-Variante von Epitop 1 zeigte eine höhere Bindungsaffinität an K^b als die HBsAg_{ayw}-Variante des Epitops (Tabelle 1). Im Gegensatz hierzu war die Bindungsaffinität von Epitop 2 an K^b hoch (Tabelle 1).

Tabelle 1: Bindungsaffinität von immunogenen HBsAg Epitopen an K^b

Epitop	HBsAg Variante	Peptid Sequenz	K ^b -Bindung (nM)
1	ayw	ILSPFLPL	3400
1	adw2	IVSPFIPL	773
2	ayw	VWLSVIWM	54

[0074] B6-Mäuse, die mit dem pCI/S_{ayw} oder pCI/S_{adw2} DNA -Vakzin immunisiert wurden, zeigten eine CD8⁺-T-Zellantwort gegenüber dem K^b-Bindungsepitop 1, die nach einer 5 Stunden ex vivo Restimulation von geprimten Milz CD8⁺-T-Zellen beobachtet wurde, die mit entweder HBsAg_{ayw} oder HBsAg_{adw2}-Partikeln oder Antigen-Peptid S₂₀₈₋₂₁₅ von HBsAg_{ayw} oder HBsAg_{adw2} gepulst waren (**Fig. 4A**), Gruppe 2,3). Die ayw- und adw2-Variante des Epitops 1 waren kreuzreaktiv, da (i) Epitop 1-spezifische CTL durch pCI/S_{ayw} oder pCI/S_{adw2} geprimt wurden; und (ii) Zellen, die mit HBsAg_{ayw} oder HBsAg_{adw2}-Partikeln gepulst waren oder mit Peptid ILS-PFLPL (ayw) oder Peptid IVSPFIPL (adw2) gepulst waren, präsentierten das Epitop 1 gegenüber geprimten CD8⁺-T-Zellen. Somit hemmten die beiden Substitutionen innerhalb des 8mer-Epitops 1 nicht die wirksame Prozessierung, K^b-Bindung oder Präsentation des Epitops.

[0075] CD8⁺-T-Zellen, die mit dem pCI/S_{ayw} DNA -Vakzin geprimt waren, erkannten das Epitop 2(S₁₉₀₋₁₉₇) von HBsAg_{ayw} oder HBsAg_{adw2} (**Fig. 5A**; Gruppe 2). Dies wurde ex vivo nachgewiesen nach einer 5 Stunden-Re-stimulation unter Verwendung von Peptid-gepulsten Zellen oder Transfektanten, die HBsAg_{ayw} exprimierten. Geprimte CD8⁺-T-Zellen erkannten keine Transfektanten, die das endogene HBsAg_{adw2} exprimierten. Die Im-

munisierung mit dem pCI/S_{adw2} DNA-Vakzin primte nicht Epitop-2-spezifische T-Zellen (**Fig. 5A**, Gruppe 3). CD8⁺-T-Zellen, die geprimt waren mit pCI/S_{adw2} (jedoch nicht mit pCI/S_{ayw}) DNA-Vakzin, erkannten ein adw2-spezifisches Epitop unbekannter Epitop/Restriktions-Spezifität, das von den Transfektanten präsentiert wurde, dies wurde nicht weiter untersucht (**Fig. 5**, Gruppe 3). Die Substitution der Aminosäure an Position 5 (Austausch der hydrophoben Aminosäure Valin V gegen die hydrophobe Aminosäure Alanin A) hemmt daher die Herstellung des Epitops 2, jedoch nicht dessen Präsentation durch das K^b-Molekül ([1]).

Beispiel 4

Kreuz-reaktive K^b-restringierte CD8⁺-T-Zellantworten gegen HBsAg Epitop 1 werden in HBs-tg B6-Mäusen geprimt

[0076] HBs-tg B6-Mäuse exprimieren HBsAg_{ayw} von einem Transgen in der Leber. HBs-tg-Mäuse wurden mit HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) oder HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) immunisiert (**Fig. 4**, 5B). Keine CD8⁺-T-Zellantwort wurde durch wiederholtes Immunisieren von HBs-tg B6-Mäusen mit dem pCI/S_{ayw} DNA -Vakzin erhalten (**Fig. 4**, 5B, Gruppe2). Im Gegensatz hierzu erzeugte die Immunisierung von HBs-tg B6-Mäusen mit dem pCI/S_{adw2} DNA-Vakzin eine CD8⁺-T-Zellantwort gegenüber HBsAg (**Fig. 4B**, Gruppe 3). Diese kreuzreaktive CD8⁺-T-Zellantwort erkannte Zellen, die mit HBsAg_{ayw}- oder HBsAg_{adw2}-Partikeln oder mit der ayw- oder adw2-Variante von Epitop 1 in Peptid-Form gepulst waren (**Fig. 4B**, Gruppe 3). Diese CD8⁺-T-Zellen erkannten nicht die RBL5/S_{ayw}-Transfektanten oder das K^b-Bindungsepitop 2 S₁₉₀₋₁₉₇ (**Fig. 5B**, Gruppe 3). Die CD8⁺-T-Zellen zeigten eine Subtyp-spezifische Reaktivität gegen eine unbestimmte Determinante, die durch RBL5/S_{adw2} jedoch nicht von den RBL5/S_{ayw}-Transfektanten präsentiert wurden (**Fig. 5B**, Gruppe 3). Dies zeigt, dass eine natürliche Variante von HBsAg die „Toleranz brechen“ kann durch das Priming einer kreuz-reaktiven T-Zell-Immunität.

[0077] Es wurde untersucht, ob spezifische CD8⁺-T-Zellpopulationen in der Antigen-produzierenden Leber in den transgenen Mäusen nachgewiesen werden können, die mit pCI/S_{adw2} immunisiert wurden. In der Milz und in Leber NPZ aus HBs-tg B6-Mäusen, die mit pCI/S_{adw2} immunisiert waren, konnte spezifische CD8⁺-T-Zellreaktivität über Monate hinweg nachgewiesen werden (**Fig. 6**). Im Gegensatz zu den adoptiv transferierten CD8⁺-T-Zellen (**Fig. 2**), haben Vakzin-geprimte anti-HBV-spezifische CD8⁺-T-Zellen daher Zugang und zeigen stabile Aufnahme in das Antigen-tragende Zielorgan über mehr als 3 Monate.

Beispiel 5

Histopathologie der Leber von immunisierten HBs-tg-Mäusen, die eine spezifische CD8⁺-T-Zellreaktivität gegen das HBsAg-Epitop 1 zeigen

[0078] HBsAg-spezifische CD8⁺-T-Zellen induzierten eine inflammatorische Antwort in der HBsAg-produzierenden Leber. Unbehandelte B6-Mäuse zeigten eine normale Leber-Histologie (**Fig. 7A**, B). Hepatozyten aus HBs-tg B6-Mäusen waren vergrößert und zeigten ein feingranuläres, blaß-eosinophiles Zytoplasma, das charakteristisch ist für „Milchglas-Leberzellen“, das auch bei der humanen HBV-Infektion beobachtet wird (**Fig. 7C**, D). Keine inflammatorischen Infiltrationen wurden beobachtet.

[0079] HBs-tg-Mäuse, die mit pCI/S_{adw2} (jedoch nicht mit pCI/S_{ayw}) DNA-Vakzin immunisiert waren, zeigten eine schwerwiegende Leber-Histopathologie (**Fig. 7E**). Inflammatorische Infiltrate, die in den Parenchym- (**Fig. 7F**) und Periportal (**Fig. 7G**)-Feldern gefunden wurden, bestanden hauptsächlich aus mononukleären Zellen (**Fig. 7F**). Kleine, lymphoide Zellen waren zahlreich verteilt in den Parenchym- und Periportal-Feldern. Umschriebene Herde von inflammatorischen Zellen umgaben die apoptotischen Hepatozyten (**Fig. 7H**). Die Vergrößerung und hydropische Anschwellung von Hepatozyten war stärker in immunisierten als in nicht behandelten HBs-tg Mäusen. Einige mittelgroße bis kleine Kerne zeigten ein kondensiertes Chromatin und einen perinukleären Halo (**Fig. 7F** Pfeile), das auf ein frühes Stadium der Apoptose hinweist. Ferner wurden zahlreiche Councilman bodies, die apoptotische Leberzellen darstellen, beobachtet (**Fig. 7H**, Pfeile). Einige Hepatozyten zeigten nukleäre Vakuolisierung (**Fig. 7**, Pfeile). Eine signifikante Cholestasis war nicht nachweisbar.

Das Priming von HBsAg-spezifischen CD8⁺-T-Zellen in HBs-tg Mäusen korreliert mit einer Reduktion der Antigenämie

[0080] Unbehandelte HBs-tg Mäuse zeigen HBsAg Serumspiegel von 30–50 ng/ml (**Fig. 8A**). Mäuse, die kreuzreaktive CD8⁺-T-Zellantworten gegen Epitop 1 nach der HBsAg_{adw2}-Immunisierung entwickelten, zeigten eine verringerte Antigenämie (mit Spiegeln im Bereich von 5–15 ng/ml), wohingegen Tiere, die mit HBsAg_{ayw}

immunisiert waren, die keine HBsAg-spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunität entwickelten, keine Veränderung der Antigenämiespiegel (**Fig. 8A**) zeigten. Die teilweise Kontrolle der Antigenämie korreliert daher mit dem Auftreten von spezifischen CD8⁺-T-Zellen in den immunisierten transgenen Mäusen.

Anti-HBsAg Serum-Antikörper treten in HBs_{ayw}-tg Mäusen auf, die mit HBsAg_{adw2} immunisiert waren

[0081] Zusätzlich zur T-Zell-Immunität kann die humorale anti-HBsAg-Immunität eine Rolle bei der Kontrolle der Antigenämie spielen. Es wurde das Auftreten von Anti-HBsAg Serum-Antikörpern in vakzinieren normalen und transgenen Mäusen beobachtet. Normale (nicht transgene) B6 Mäuse und kongene HBs-tg B6-Mäuse wurden mit dem pCL/S_{ayw} oder pCL/S_{adw2} DNA-Vakzin zweimal immunisiert. Ihre Serum-Antikörper-Titer, die spezifisch für HBsAg waren, wurden zwei Wochen nach der letzten Immunisierung mit dem ImxAUSAB-Test (Abbott) bestimmt, der HBsAg unterschiedlicher Subtypen bestimmt. Während nicht-transgene Mäuse, die mit pCL/S_{ayw}- oder pCL/S_{adw2}-Plasmid-DNA immunisiert waren, hohe Serum-Antikörperspiegel gegen HBsAg entwickelten, zeigten HBs-tg Mäuse eine anti-HBsAg Serum-Antikörper-Antwort nur nach Immunisierungen mit pCL/S_{adw2} (jedoch nicht mit pCL/S_{ayw}) Plasmid-DNA (**Fig. 8B**). Ähnliche Antikörper-Antworten wurden in Mäusen beobachtet, die mit HBsAg_{ayw}- oder HBsAg_{adw2}-Partikeln immunisiert wurden (Daten nicht gezeigt). Ein Subtyp-spezifischer ELISA (mit HBsAg_{ayw} oder HBsAg_{adw2} Partikel-beschichteten Platten), zeigte, dass in normalen Mäusen >95 % der durch sämtliche Vakzine erzeugten Antikörper-Antwort gegen die ,a'-Determinante von HBsAg gerichtet ist; in HBs-tg-Mäusen ist >90 % der Antikörper-Antwort gegen adw2-spezifische Determinanten (Daten nicht gezeigt) gerichtet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rhein Biotech Gesellschaft für neue biotechnologische Prozesse und Produkte mbH

<120> Zusammensetzung zur Prophylaxe/Therapie von
HBV-Infektionen und HBV-vermittelten Erkrankungen

<130> P34830-01996

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<220>

<223> HBsAg-Polypeptid von HBV Subtyp adw2/Genotyp A

<400> 1

```

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1           5           10           15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
      20           25           30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys
      35           40           45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
      50           55           60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
      65           70           75           80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
      85           90           95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
      100          105          110

Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
      115          120          125

Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
      130          135          140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
      145          150          155          160

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
      165          170          175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
      180          185          190

Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
      195          200          205

Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val

```

210

215

220

Tyr Ile
225

<210> 2

<211> 226

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<220>

<223> HBsAg-Polypeptid von HBV Subtyp ayw/Genotyp D

<400> 2

Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	

Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		

Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Thr	Val	Cys
		35					40					45			

Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser
	50					55					60				

Cys	Pro	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe
65					70					75					80

Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val
				85					90					95	

Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly
			100					105					110		

Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala
		115					120					125			

Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp
	130					135					140				

Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys
145					150					155					160

Phe	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu
				165					170					175	

Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu
			180					185					190		

Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ile
		195					200					205			

Leu	Ser	Pro	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val
	210					215					220				

Tyr Ile
225

<210> 3

<211> 8

<212> PRT
 <213> Hepatitis B virus

 <220>
 <223> HBV Subtyp adw2 HBsAg Epitop 190-197

 <400> 3
 Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met
 1 5

 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus

 <220>
 <223> HBV Subtyp ayw HBsAg Epitop 190-197

 <400> 4
 Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met
 1 5

 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus

 <220>
 <223> HBV Subtyp adw2 HBsAg Epitop 208-215

 <400> 5
 Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu
 1 5

 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus

 <220>
 <223> HBV Subtyp ayw HBsAg Epitop 208-215

 <400> 6
 Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
 1 5

Referenzen

1. Schirmbeck,R., Boehm,W., Fissolo,N., Melber,K., and Reimann,J., Different immunogenicity of H-2 K^b-restricted epitopes in natural variants of the hepatitis B surface antigen. Eur.J.Immunol. 2003. in press: xx-yy.
2. Ando,K.-I., Guidotti,L.G., Wirth,S., Ishikawa,T., Missale,G., Moriyama,T., Schreiber,R.D., Schlicht,H.J., Huang,S.N., and Chisari,F.V., Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. J.Immunol. 1994. 152: 3245-3253.
3. Janowicz,Z.A., Melber,K., Merckelbach,A., Jacobs,E., Harford,N., Comberbach,M., and Hollenberg,C.P., Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. Yeast. 1991. 7: 431-443.
4. Schirmbeck,R., Boehm,W., Ando,K.-I., Chisari,F.V., and Reimann,J., Nucleic acid vaccination primes hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. J. Virol. 1995. 69: 5929-5934.
5. Boehm,W., Kuhröber,A., Paier,T., Mertens,T., Reimann,J., and Schirmbeck,R., DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intra-

muscular injection. J.Immunol. Methods 1996. 193: 29–40.

6. Trobonjaca,Z., Leithäuser,F., Moller,P., Schirmbeck,R., and Reimann,J., Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN γ release by liver NKT cells. J.Immunol. 2001. 167: 1413–1422.

7. Trobonjaca,Z., Kroger,A., Stober,D., Leithäuser,F., Moller,P., Hauser,H., Schirmbeck,R., and Reimann,J., Activating immunity in the liver. II. IFN- β attenuates NK cell-dependent liver injury triggered by liver NKT cell activation. J.Immunol. 2002. 168: 3763–3770.

8. Buus,S., Stryhn,A., Winther,K., Kirkby,N., and Pedersen,L.O., Receptor-ligand interactions measured by an improved spun column chromatography technique. A high efficiency and high throughput size separation method. Biochim.Biophys.Acta 1995. 1243: 453–460.

9. Olsen,A.C., Pedersen,L.O., Hansen,A.S., Nissen,M.H., Olsen,M., Hansen,P.R., Holm,A., and Buus,S., A quantitative assay to measure the interaction between immunogenic peptides and purified class I major histocompatibility complex molecules. Eur.J.Immunol. 1994. 24: 385–392.

10. T. van-Hall, J. van-Bergen, P.A. van-Veelen, M. Kraakman, L.C. Heukamp, F. Koning, C. J. Melief, F. Osendorp, and R. Offringa. 2000. Identification of a novel tumor-specific CTL epitope presented by RMA, EL-4, and MLB-2 lymphomas reveals their common origin. J. Immunol. 165:869–877

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, die wenigstens zwei Hepatitis B Virus Oberflächen-Antigene (HBsAg's), Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthält, wobei sich die HBsAg's im Hepatitis B Virus (HBV) Genotyp und/oder Subtyp unterscheiden, und wobei die Zusammensetzung kein HBV Core Antigen (HBsAg) oder dieses kodierende Nukleinsäure enthält.

2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung wenigstens zwei HBsAg's und/oder wenigstens zwei Fragmente davon enthält.

3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das/die Fragment/Fragmente von HBsAg mindestens 5 Aminosäuren umfasst/umfassen und ein T-Zell Epitop enthält/enthalten, vorzugsweise mindestens 10, besonders bevorzugt mindestens 20, insbesondere mindestens 50 Aminosäuren.

4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Fragment die „A-Determinante“ von HBsAg umfasst.

5. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und das zweite Fragment wenigstens 10, vorzugsweise mindestens 20 Aminosäuren gemeinsam haben, jedoch sich wenigstens durch eine Aminosäure voneinander unterscheiden.

6. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung wenigstens zwei HBsAg's oder Fragmente davon kodierende Nukleinsäuren enthält.

7. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Genotyp ausgewählt ist aus: A, B, C, D, E, F, G oder H.

8. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass

- (i) der HBV Genotyp A die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank X02763, die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AF297621 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;
- (ii) der HBV Genotyp B die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank D00330, die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AB073858 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;
- (iii) der HBV Genotyp C die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AB033556, die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AB048704 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;
- (iv) der HBV Genotyp D die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank X02496 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;
- (v) der HBV Genotyp E die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank X75657 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;
- (vi) der HBV Genotyp F die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank X69798 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist;

(vii) der HBV Genotyp G die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AF160501 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist; und
(viii) der HBV Genotyp H die Referenz-Nukleinsäuresequenz gemäß Genbank AY090454 aufweist oder eine Variante davon, deren Nukleotidsequenz wenigstens 92 % identisch ist.

9. Zusammensetzung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Variante eine Polymerase kodiert, deren Aktivität im wesentlichen der Aktivität der von der Referenz-Nukleinsäuresequenz kodierten Polymerase entspricht und/oder die Variante ein HBsAg kodiert, dessen Immunreaktivität im wesentlichen der Immunreaktivität des von der Referenz-Nukleinsäuresequenz kodierten HBsAg entspricht.

10. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Subtyp ausgewählt ist aus: adw, ayw, adr oder ayr.

11. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung wenigstens 3, vorzugsweise 5 unterschiedliche HBsAg's, Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthält.

12. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung HBsAg's sämtlicher bekannter HBV Genotypen und/oder Subtypen, Fragmente davon und/oder diese kodierende Nukleinsäuren enthält.

13. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die HBsAg oder ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure in einem Vektor unter der Kontrolle eines zur Expression von HBsAg in einer Säugerzelle geeigneten Promotors vorliegt.

14. Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor ausgewählt ist aus: Plasmiden, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, Masernviren und Retroviren.

15. Zusammensetzung gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor ausgewählt ist aus konstitutiven und induzierbaren Promotoren.

16. Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, das den Schritt des Mischens der einzelnen Komponenten umfasst.

17. Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, das das Co-Expressieren von wenigstens zwei HbsAg's oder Fragmente davon kodierende Nukleinsäuren in einer Wirtszelle, vorzugsweise einer Hefezelle, besonders bevorzugt Hansenula polymorpha umfasst.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

19. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur therapeutischen Behandlung einer HBV-Infektion oder einer durch HBV vermittelten Erkrankung.

20. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur prophylaktischen Behandlung einer HBV-Infektion oder einer durch HBV-vermittelten Erkrankung.

21. Verwendung gemäß Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass die HBV-Infektion eine chronisch persistierende Hepatitis B ist.

22. Verwendung gemäß Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass die HBV-vermittelte Erkrankung akute chronische Hepatitis B-Infektion, Leberzirrhose oder primäres Leberzellkarzinom ist.

23. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 19 bis 22 dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung intramuskulär, subkutan, intradermal, intravenös, mucosal oder oral verabreicht wird.

24. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung von Hepatitis B, umfassend:

- a) Bestimmen des HBV-Genotyps oder Subtyps, mit dem der Patient infiziert ist; und
- b) Bereitstellen eines Arzneimittels, das wenigstens ein HBsAg eines HBV Genotyps oder Subtyps, ein Frag-

ment davon oder eine HBsAg kodierende Nukleinsäure enthält, wobei dessen Genotyp oder Subtyp sich vom nach a) bestimmten HBV Genotyp oder Subtyp des Patienten unterscheidet.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Genotyp durch PCR-Verfahren bestimmt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Subtyp unter Verwendung von HBsAg-spezifischen Antikörpern bestimmt wird.

27. Kit zur Diagnostik des Genotyps und/oder Subtyps einer HBV-Infektion, umfassend wenigstens zwei HBsAg-spezifische Bindungsmittel, dadurch gekennzeichnet, dass die zwei HBsAg-spezifischen Bindungsmittel für unterschiedliche HBV-Genotypen und/oder Subtypen spezifisch sind.

28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die zwei HBsAg-spezifischen Bindungsmittel Primer und/oder Antikörper sind.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

(1) MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTPQ SLDSWWTSLN FLGGTTVC LG QNSQSPTS⁶⁰NH
(2) MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTPQ SLDSWWTSLN FLGGSPVCLG QNSQSPTS⁶⁰NH

"a"

(1) SPTSCPP^TTC P GYRWMC^LR RF IIFLFI^LLLC LIFLLV^LLDY QGM^LPVCPLI PGST^TTTSTGP¹²⁰
(2) SPTSCPP^ICP GYRWMC^LR RF IIFLFI^LLLC LIFLLV^LLDY QGM^LPVCPLI PGST^TTTSTGP

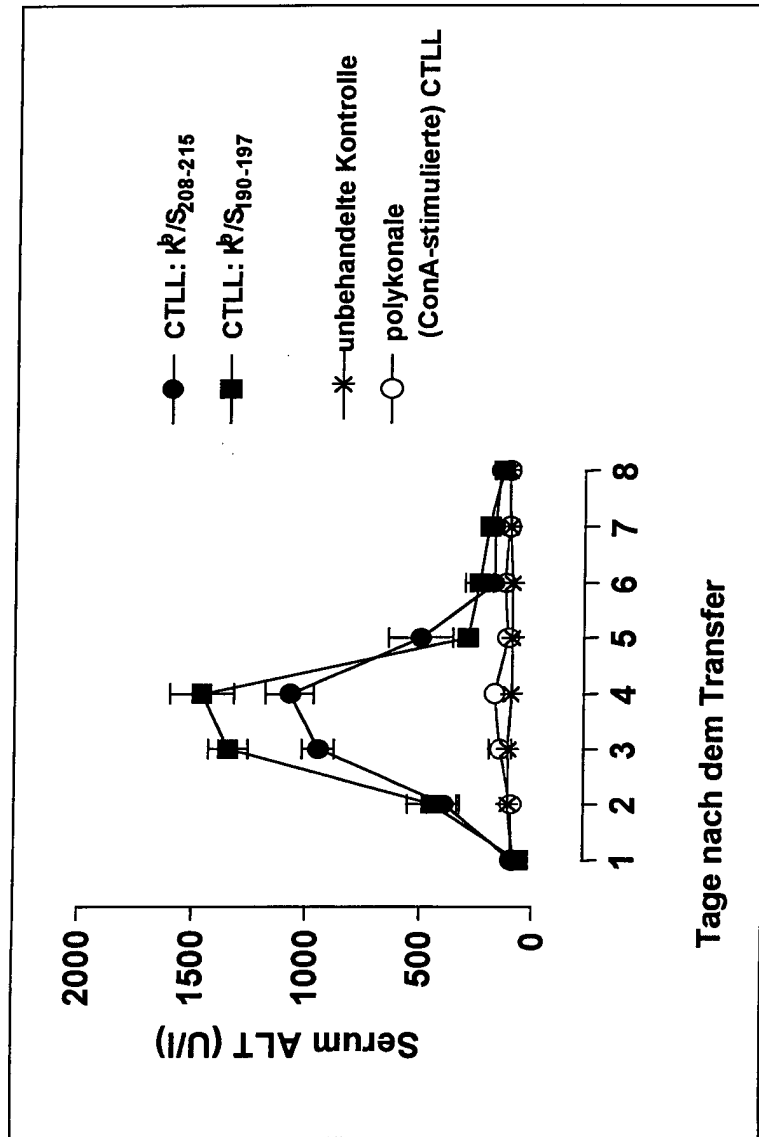
(1) C^RTCTMTTAQG TSMYPSCCCT KP^SDGNCTCI PIPSSWAF GK FLWEWASARF SWLSLLVPFV¹⁸⁰
(2) C^KTCTTTPAQG NSMFPSCCCT KP^TDGNCTCI PIPSSWAF AK YLWEWASVR F SWLSLLVPFV

(1) QWFVGLSPTV WLSVIWMWY WG^PSLYSILS PF^LPLLPIFF CLWVYT²⁶
(2) QWFVGLSPTV WLSAIWMWY WG^PSLYSISVS PF^IPLLPIFF CLWVYT

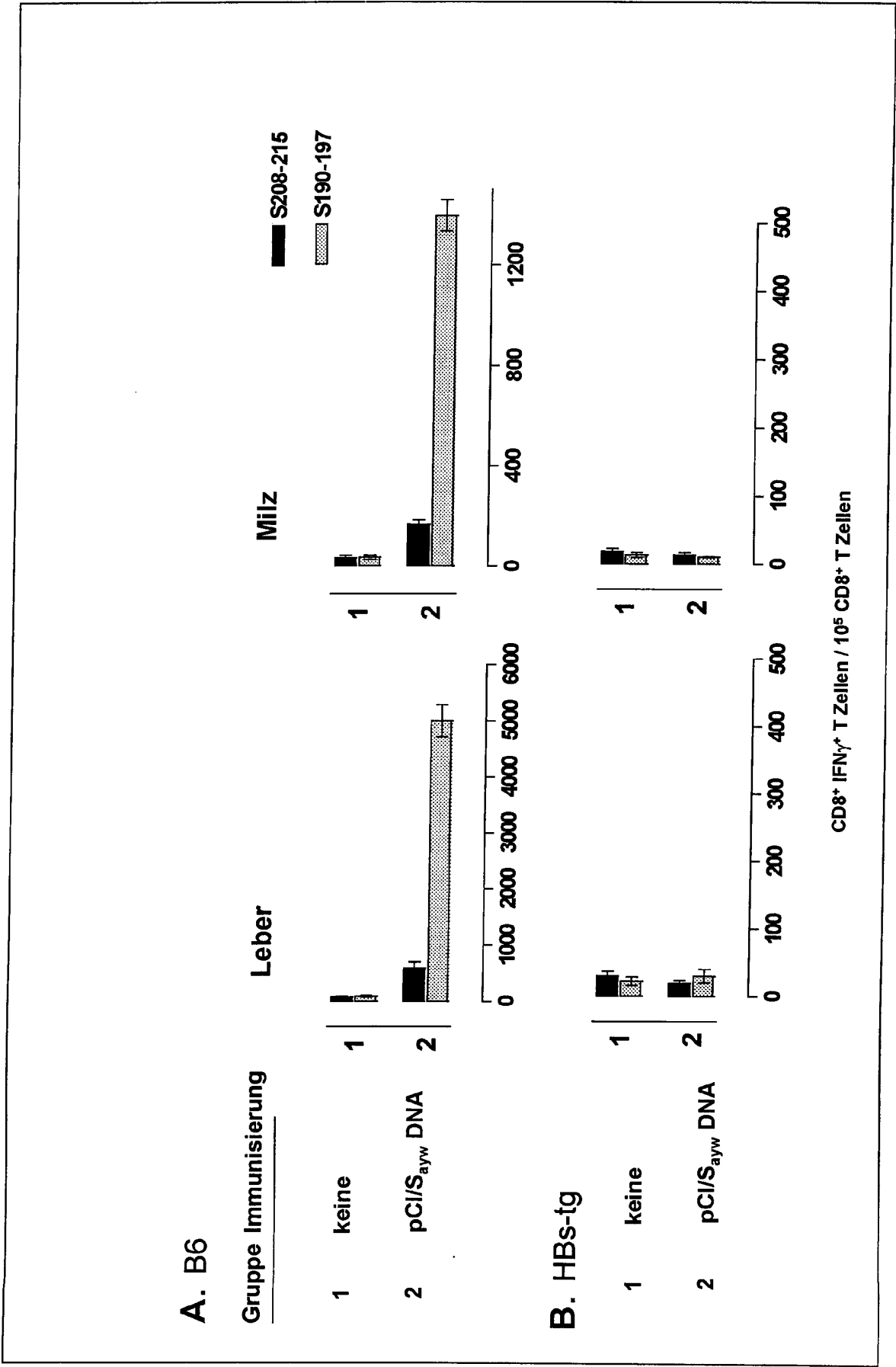


Epitop	Rest	Aminosäuresequenz		Restriktion	Prozessierung
		ayw	adw ₂		
1	208-215	ILSPFLPL	IVSPFLPL	K ^D	Exo
2	190-197	VWLSVIVM	VWLSAIVM	K ^D	endo

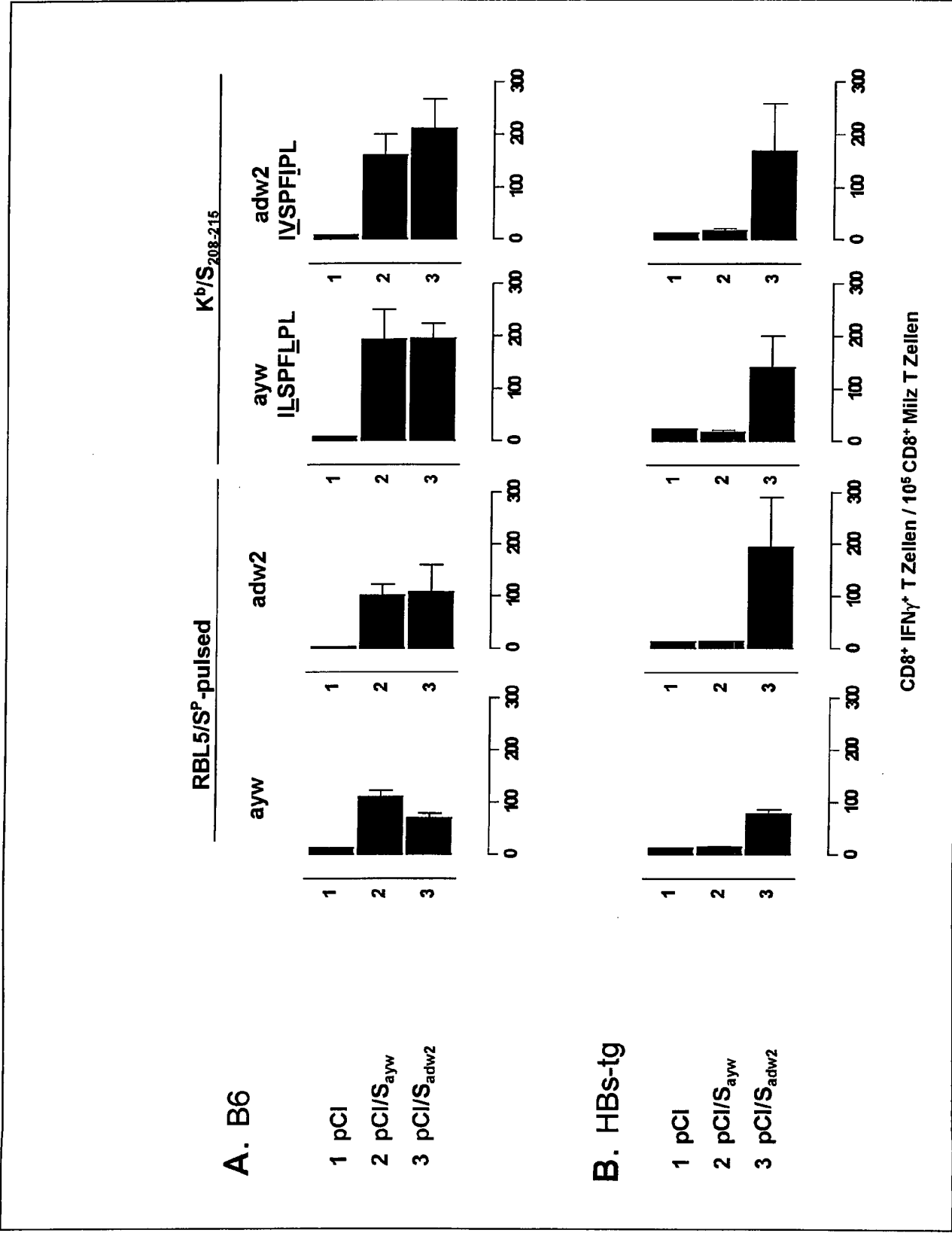
Figur 1



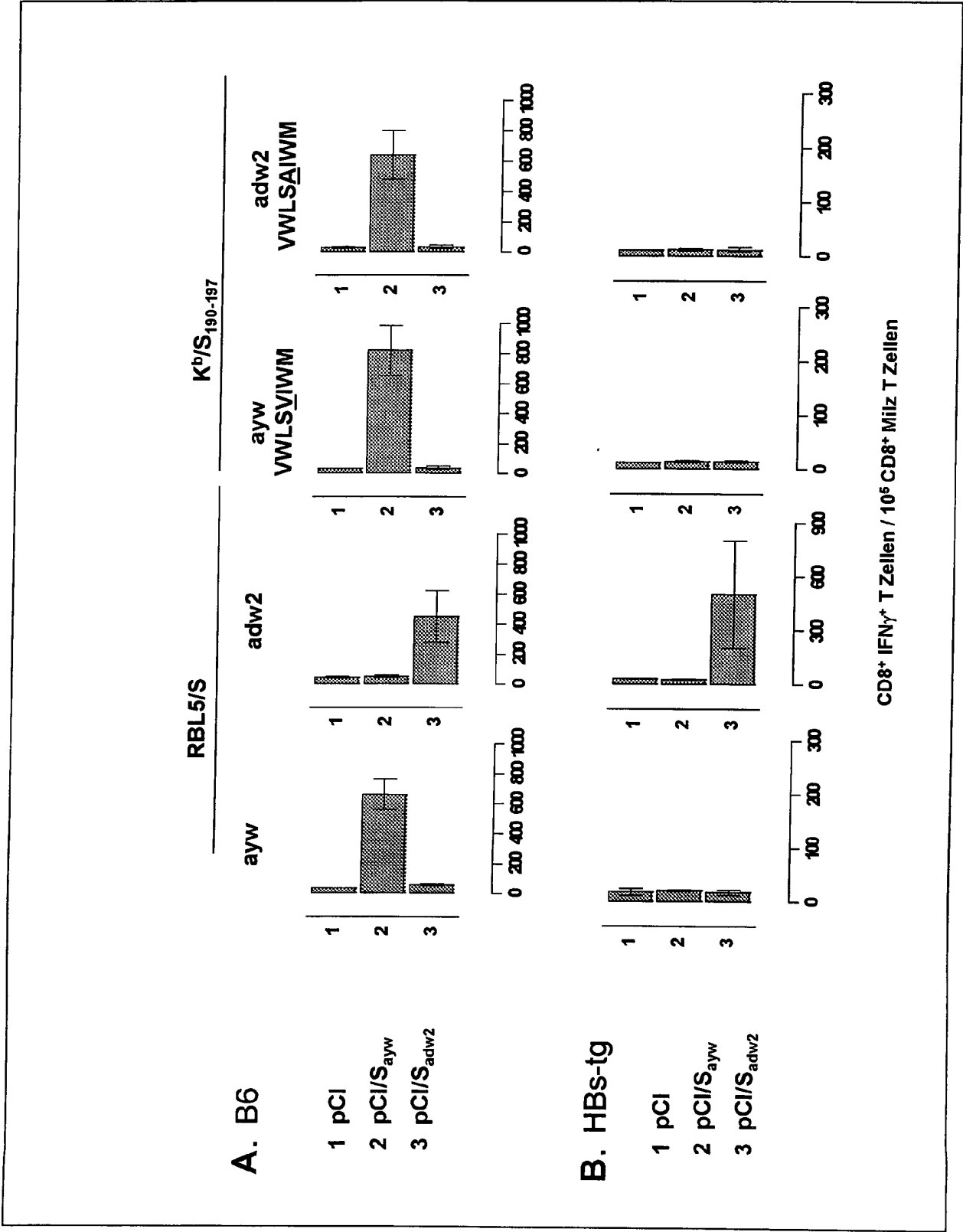
Figur 2



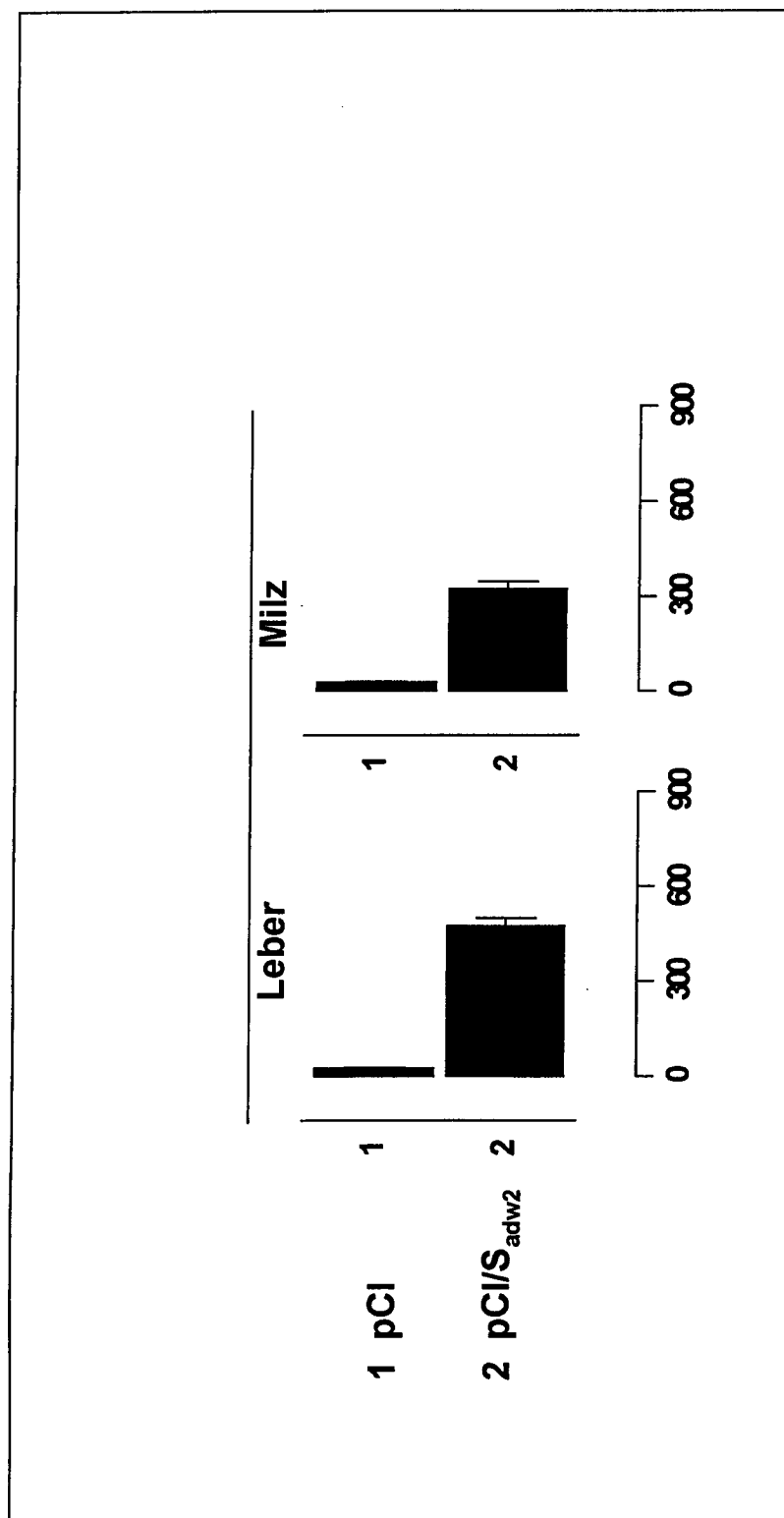
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

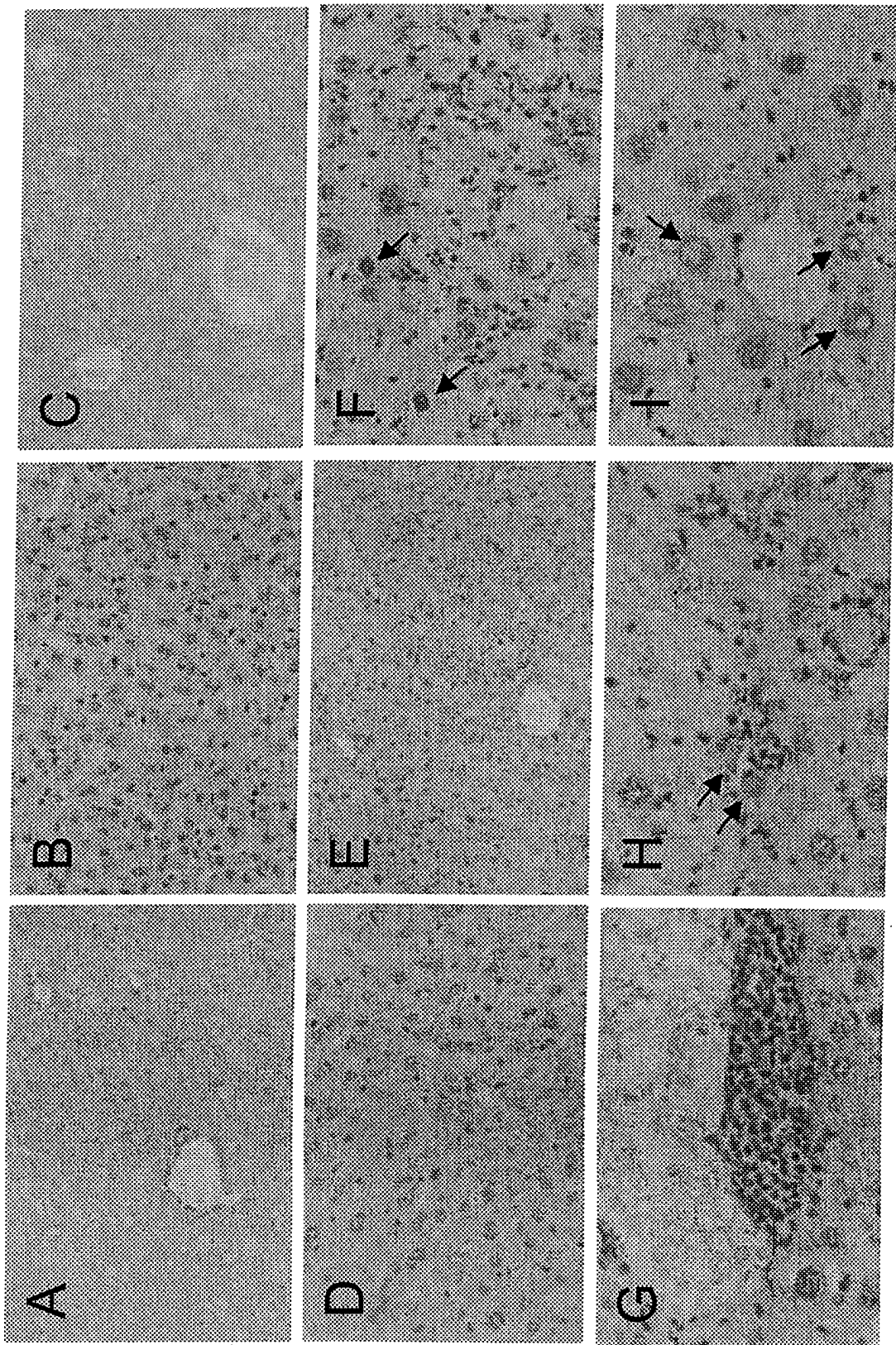


Figure 7

