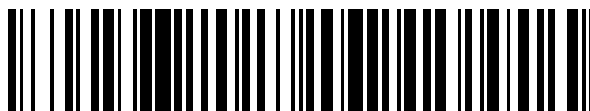


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 123**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2004** **E 04764564 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 1660125**

54 Título: **Composición para la prevención/el tratamiento de infecciones con HBV y de enfermedades mediadas por HBV**

30 Prioridad:

29.08.2003 DE 10339927

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.07.2015

73 Titular/es:

**RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE
BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE UND
PRODUKTE MBH (100.0%)
EICHSFELDER STRASSE 11
40595 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:

MELBER, KARL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 541 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para la prevención/el tratamiento de infecciones con HBV y de enfermedades mediadas por HBV

La presente invención se refiere a composiciones que contienen al menos dos antígenos de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg's), fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican, en las cuales los HBsAg's se distinguen en el genotipo de virus de hepatitis B (HBV) en la región S y/o la región Pre-S1 de HBsAg, en cuyo caso la composición no contiene antígeno de núcleo de HBV (HBcAg) o ácido nucleico que codifique a éste; a composiciones farmacéuticas, principalmente vacunas que contienen estas composiciones y a su uso para la prevención/el tratamiento de una infección con HBV o de una enfermedad mediada por HBV. La presente invención se refiere además a un método para preparar un medicamento específico para un paciente para el tratamiento terapéutico de hepatitis.

Más de 250 millones de personas en todo el mundo están infectadas con el virus de la hepatitis B (HBV). Una parte significativa de los infectados muestra consecuencias patológicas, incluidas la insuficiencia hepática crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC). La razón de porqué determinadas personas desarrollan una infección aguda con HBV mientras que otras no, es poco entendida. Los datos clínicos y la analogía a infecciones crónicas virales han resaltado el significado de una inmunorespuesta mediada por la célula en la lucha de las infecciones virales, principalmente una inmunorespuesta tal que comprenda los linfocitos T citotóxicos. La inducción de una respuesta celular T citotóxica es un factor crítico en la eliminación de la infección aguda con HBV y la prevención de la infección crónica con HBV. El genoma viral codifica, entre otros, la proteína-envoltura pre-S1, pre-S2 y el antígeno S (HBsAg), la polimerasa y la proteína de núcleo (HBcAg).

La hepatitis B crónica representa una inflamación progresiva del hígado que puede tomar un curso crónicamente persistente o crónicamente agresivo. La hepatitis crónicamente persistente exhibe una infiltración limitada a las áreas de portal ampliadas del hígado con elevada fibrosis; clínicamente, las señales de hepatitis persistente permanecen por años (hasta 10 años), y cerca del 80% de los casos son HBsAg-positivos. La patogénesis se basa probablemente en la insuficiencia del sistema inmune celular y la infección viral persistente.

El pequeño antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), una proteína de 226 aminoácidos (p24/gp27 o proteína-S), es un antígeno de HBV prominente, el cual se ensambla incluso en partículas lipoprotéicas de 20-30 nm, en las cuales se reticulan 100-150 subunidades por medio de enlaces múltiples inter- e intra-moleculares de disulfuro. La variabilidad de la proteína S de HBV-aislados de diferentes subtipos y fenotipos es limitada. Los cuatro subtipos estables de HBsAg adw, ayw, adr y ayr se refieren a intercambios individuales de aminoácidos en las posiciones 122 y 160, que están localizadas adyacentes al "determinante-a" inmunodominante (una región hidrofílica que abarca los residuos 124-147). Hasta ahora, en la infección con HBV, para estos subtipos no habían sido relacionadas diferencias biológicas o patogenéticas.

En 1982, en la República Federal de Alemania, fue aprobada por primera vez una vacuna que había sido obtenida a partir del plasma de portadores crónicos de HBsAg. Entretanto, la vacuna se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética y se usa para inmunización activa de grupos de riesgo. El 95% de las personas que son sero negativas antes de la inoculación presentan una reacción inmune después de un año. Todas las vacunas de hepatitis B usadas contienen una alta concentración de proteína de HBsAg purificada, correspondiente a la envoltura no infecciosa del virus de hepatitis B y son libres del ADN viral y se desactivan con formalina.

Una desventaja del estado de la técnica consiste en que al menos el 5% de las personas inmunizadas son las llamadas "no-respondedoras", las cuales no presentan una inmuno-respuesta. Además, hasta hoy no se conoce una vacuna para el tratamiento de hepatitis crónicamente persistente.

WO 01/40279 y WO 01/38498 describen vacunas a base de genotipo G del virus de la hepatitis B. Sin embargo, de ninguna de las dos patentes se desprende una indicación sobre la combinación de fenotipos diferentes.

Michel et al., PNAS 92 (1995), 5307-5311 y Mancini et al., PNAS 93 (1996), 12496-12501 se refieren a vacunas de ADN a base de HBsAg. De los documentos no se desprende indicación alguna sobre el uso de composiciones que contienen combinaciones de genotipos de HBV diferentes de HBsAg.

Por lo tanto, el problema en que se basa la presente invención es proporcionar productos mejorados para la prevención/el tratamiento de una infección con HBV o una enfermedad mediada por HBV. Además, otro problema en que se basa la presente invención es especificar un medicamento específico a un paciente para el tratamiento terapéutico de hepatitis.

El problema que sirve de fundamento a la presente invención se resuelve proporcionando una composición tal como se define en la reivindicación 1.

La presente invención se fundamenta en la siguiente observación sorprendente. Como modelo preclínico para evaluar la eficiencia de protocolos específicos de inmunoterapia para infecciones con HBV crónicas se consideran ratones transgénicos que expresan de manera constitutiva el subtipo ayw de HBsAg en el hígado. Estos ratones producen grandes cantidades de HBsAg, lo cual ocurre debido a una antigenemia persistente, y en esencia son tolerantes frente a HBsAg. Ahora, los inventores han inmunizado a ratones HbsAg-transgénicos con una vacuna que corresponde en su genotipo de HBsAg exactamente al genotipo del ratón transgénico (ayw), y por otra parte con una vacuna que contiene un genotipo de HBsAg, el cual se diferencia de aquel del ratón transgénico. A pesar de la inmunización repetida de los ratones transgénicos con un antígeno de HbsAg, el cual corresponde al propio HBsAg, no pudo observarse una respuesta citotóxica de célula T. En contraste con esto, la inmunización de los ratones transgénicos con un genotipo de HBsAg distinto del genotipo propio, dio lugar a respuestas citotóxicas de células T, específicas del genotipo y de reacción cruzada, frente a HBsAg. Esto muestra que una variante de ocurrencia natural de HBsAg puede romper la "tolerancia" mediante el imprimado de una inmunidad de célula T de reacción cruzada. La activación de la inmunidad citotóxica de célula T conduce en este caso a un decrecimiento del antígeno ayw de HBsAg y además a una sintomatología específica de hígado que corresponde a una hepatitis aguda con un control eficaz de HBV. La inmuno respuesta observada es principalmente notable ya que la secuencia de aminoácidos del antígeno ayw de HBsAg se diferencia solamente en pocas posiciones de la amino-secuencia del antígeno adw2 de HBsAg. En la presente invención se establece que incluso unos pocos intercambios conservadores de aminoácidos en un epítipo de célula T pueden conducir a una reacción modificada de célula T frente a este epítipo.

La especificidad y la eficiencia de la respuesta de célula T frente a un antígeno de proteína se regula a diferentes niveles, principalmente es decisiva (i) la liberación proteolítica del epítipo (o del péptido antigénico); (ii) la afinidad del péptido antigénico para la glicoproteína que se presenta del complejo de histocompatibilidad principal (MHC); y (iii) la interferencia negativa de las respuestas de célula T que se desarrollan de modo competitivo frente a diferentes epítopes del mismo antígeno. Las variantes naturales de un antígeno de proteína pueden inducir (mediante intercambios individuales de aminoácidos en secuencias críticas dentro del epítipo o flanqueando el epítipo, o creando nuevos epítopes) una respuesta específica de célula T de las siguientes 4 maneras:

(i) procesamiento proteolítico más eficiente (liberación) del péptido antigénico desde la proteína;

(ii) enlace de alta afinidad del péptido antigénico a la molécula de MHC que se presenta;

(iii) eliminación de epítopes inmunodominantes (suprimir las respuestas frente a otros epítopes del mismo antígeno de proteína) mediante un proceso análogo, expuesto en (i) y/o en (ii), el cual debilita la inmunogenidad del epítipo;

(iv) pueden generarse nuevos epítopes.

En el contexto de la presente invención se demuestra que las variantes naturales del HBsAg, reflejadas por medio de los genotipos, presentan un espectro más amplio de especificidades en la respuesta de célula T que la estimulan.

En relación con la presente invención, la expresión "genotipo de HBV" significa la totalidad del genoma del virus de hepatitis B. Preferentemente se determina el genotipo de HBV mediante la secuenciación total y el análisis filogenético. En la actualidad se conocen 8 genotipos estándar. Estos 8 genotipos se basan en una variación de nucleótidos de 8% entre sí; véase Bartholomeusz, Rev. Med. Virol. 13 (2003), 1-14. El genotipo A de HBV tiene preferentemente la secuencia de ácido nucleico de referencia del banco de genes X02763 o para el genotipo A_{air} de HBV la secuencia de ácido nucleico de referencia según el banco de genes AF297621. Para el genotipo B_a de HBV Ba está la secuencia de ácido nucleico de referencia del banco de genes D00330 y para el genotipo Bj la secuencia de ácido nucleico de referencia AB073858. Para el genotipo C de HBV está la secuencia de ácido nucleico de referencia banco de genes AY206389, en referencia al genotipo C_{aus} la secuencia de ácido nucleico de referencia según el banco de genes AB048704. Para el genotipo D está la secuencia de ácido nucleico de referencia banco de genes X02496. La secuencia de ácido nucleico de referencia para el genotipo E es X75657. La secuencia de ácido nucleico de referencia para el genotipo F es X69798. La secuencia de ácido nucleico de referencia para el genotipo G es AF160501 y la secuencia de ácido nucleico de referencia para el genotipo H es AY090454.

En referencia a los genotipos previamente mencionados existe cierta correlación entre genotipo y subtipo, tal como sigue: el genotipo A se correlaciona con subtipo adw2, ayw1; el genotipo B se correlaciona con adw2, ayw1, el genotipo C se correlaciona con adw2, adrq+, adrq-, ayr, adr. El genotipo D se correlaciona con ayw2, ayw3, ayw4. El genotipo E se correlaciona con ayw4. El genotipo F se correlaciona con adw4q-, adw2 y ayw4, el genotipo G se correlaciona con adw2 y el genotipo H se correlaciona con adw4.

La determinación del subtipo de HBV de un paciente infectado puede realizarse de modo serológico con ayuda de anticuerpos mono-específicos, por ejemplo anti-d, anti-y, anti-r, anti-a(w). La determinación puede efectuarse como un ensayo de difusión en gel de agar o como un ensayo radio inmune; ("HBs Antigen Subtypes" (Subtipos de

antígeno deHBs), editores: Courouce, A. M., Holland, P.V., Muller, J.Y. y Soulier, J. P., Bibliotheca Haematologica no. 42, S. Karger, Basilea, 1976).

El subtipo también puede determinarse mediante secuenciación del ADN que codifica HBsAg de un suero de paciente. De la determinada secuencia de ácido nucleico se deriva entonces la secuencia de aminoácidos del HBsAg. La clasificación del subtipo se efectúa luego sobre los aminoácidos en las posiciones 122 y 160, tal como se describe en Magnius, L.O. y Norder, H., "Subtypes, Genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene" (Subtipos, genotipos y epidemiología molecular del virus de hepatitis B tal como se refleja por la variabilidad de secuencia del gen S) Intervirology 38(1-2): 24-34.

En relación con la presente invención, la expresión "antígeno de superficie del virus de hepatitis B" (HBsAg) significa el pequeño antígeno de superficie de HBV o la proteína S (p24/gp27). HBsAg puede comprender además en este caso los dominios de la proteína pre-S1. Preferentemente, HBsAg se compone de la proteína S y/o de los dominios de proteína pre-S1.

Con respecto a la numeración de HBsAg, se usa el sistema de acuerdo con Kidd-Ljunggren et al., J. Gen. Virol. 83 (2002), 1267-1280.

La expresión "fragmento" comprende de acuerdo con la invención fragmentos de HBsAg. El fragmento comprende preferiblemente al menos 5 aminoácidos y contiene un epítipo de célula T, preferiblemente al menos 10, particularmente preferible al menos 20, principalmente al menos 50 aminoácidos. De acuerdo con una forma de realización preferida, la composición contiene al menos dos HBsAg's o dos fragmentos de los mismos. Esta composición puede utilizarse principalmente como vacuna a base de polipéptido. En el caso en el cual la composición contiene dos fragmentos que se derivan de HBsAg's con genotipo de HBV diferente, de modo particularmente preferible el primer y el segundo fragmento tienen en común al menos 20 aminoácidos, aunque se diferencian al menos en un aminoácido.

Como se ha expuesto previamente, una comprensión de la presente invención consiste en que incluso diferencias muy pequeñas en un antígeno (HBsAg) debido a genotipos diferentes conducen a epítopos de célula T modificados, los cuales se distinguen solamente uno de otro de manera mínima, aunque conducen a una modificación dramática de la reactividad de la célula T. Ambos fragmentos que se diferencian uno de otro por lo menos en un aminoácido pueden determinarse, por lo tanto, fácilmente mediante una comparación sencilla de secuencias de los genotipos conocidos con respecto al HbsAg. Los fragmentos adecuados que se diferencian uno de otro en al menos un aminoácido pueden utilizarse en la composición de la invención. Los fragmentos contienen preferiblemente al menos un epítipo de célula T, particularmente preferible un epítipo de célula T humana. Se conocen métodos para determinar epítopos de célula T, por ejemplo Lauer et al., J. Virol. 76 (2002), 6104-6113.

Según una forma de realización preferida, la composición contiene al menos dos HBsAg's y/o al menos dos fragmentos de los mismos.

Además se prefieren composiciones que contienen al menos un primer HBsAg o un fragmento del mismo y un ácido nucleico que codifica un segundo HBsAg o un fragmento del mismo, en cuyo caso el primer HBsAg se diferencia del segundo en el genotipo de HBV.

Según otra forma de realización preferida, la composición contiene al menos dos ácidos nucleicos que codifican dos HBsAg's, en cuyo caso los HBsAg's se diferencian en el genotipo de HBV. Los ácidos nucleicos en este caso también pueden ser tales que codifican un fragmento definido como los anteriores. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN viral o ADN sintético, en cuyo caso por secuencias de ADN sintéticos también se entienden los enlaces modificados de inter-nucleósido. Además, los ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ARN, lo cual puede ser necesario para la expresión por medio de sistemas recombinantes de vector. Además, de acuerdo con la invención también se toman en consideración moléculas mixtas de ADN/ARN en calidad de ácidos nucleicos.

Según una forma de realización preferida, el genotipo se selecciona de los genotipos conocidos A, B, C, D, E, F, G o H. En atención a la secuencia de ácido nucleico respectivo de referencia, nos remitimos al párrafo de definición anterior. Usualmente el genotipo se determina en este caso por una variación de nucleótido del 8% en relación con la secuencia de aminoácidos de referencia, es decir que los ácidos nucleicos que presentan al menos 92% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de referencia se entienden asimismo como genotipo de acuerdo con la definición. Particularmente se prefiere la identidad de al menos 95%, principalmente 98% en relación con la secuencia de ácido nucleico de referencia. La "identidad" en relación con la secuencia de ácido nucleico de referencia se determina en este caso con ayuda de métodos conocidos. En términos generales se usan programas particulares de ordenador con algoritmo considerando requisitos especiales.

Métodos preferidos para determinar la identidad generan primero la mayor coincidencia entre las secuencias a comparar. Los programas de ordenador para determinar la entidad comprenden, aunque no se limitan a, el paquete

de programa GCG, incluyendo GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), 387; Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (WI); y BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S., et al. J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410. El programa BLASTX puede obtenerse del National Center For Biotechnology Information (NCBI) y de otras fuentes (manual de BLAST, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al.; citado anteriormente). El algoritmo conocido de Smith-Waterman también puede utilizarse para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de ácido nucleico comprenden los siguientes:

Algoritmo Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453

Matriz de comparación:

Emparejamientos = +10

Discordancias = 0

Penalidad por brecha: 50

Penalidad por longitud de brecha: 3

El programa GAP también es adecuado para usarse con los parámetros anteriormente citados. Los parámetros anteriormente citados son los parámetros de condición básica (default) en la comparación de secuencias de ácido nucleico. Otros ejemplos para algoritmos, penalidades por apertura de brecha (Gap Opening Penalties), penalidades por extensión de brecha (Gap Extension Penalties) y matrices de comparación comprenden aquel paquete en el manual del programa Wisconsin Package, versión 9, septiembre 1997. La elección depende en este caso de la comparación que se está realizando, además, si se realiza la comparación entre pares de secuencias, cuando se usan GAP o Best Fit o entre una secuencia y un gran banco de datos de secuencia, cuando se usan FASTA o BLAST.

Una coincidencia del 92% según el algoritmo previamente citado significa en relación con la presente invención un 92% de identidad. Igual aplica para identidades más altas.

La composición de la invención se caracteriza preferiblemente porque la variante codifica una polimerasa cuya actividad corresponde esencialmente a la actividad de la secuencia de la polimerasa codificada por el ácido nucleico de referencia y/o la variante codifica un HBsAg, cuya inmunorreactividad corresponde esencialmente a la inmunorreactividad del HBsAg codificado por el ácido nucleico de referencia.

La actividad de polimerasa puede determinarse en este caso de acuerdo con Kim et al, Biochem. Mol. Biol. Int. 1999; 47 (2), 301-308. La inmunorreactividad de HBsAg puede determinarse mediante ELISAs de antígeno comercialmente disponibles. Una "en esencia inmunorreactividad del HbsAg codificado por el ácido nucleico de referencia" significa que un anticuerpo se enlaza al HBsAg de referencia esencialmente con la misma afinidad que al HBsAg codificado por la variante.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la composición contiene al menos tres, preferiblemente al menos cinco diferentes HBsAg, fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican.

De manera particularmente preferida, la composición contiene HBsAg de todos los genotipos conocidos de HBV, fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la composición de la invención, el ácido nucleico, que codifica HBsAg o un fragmento del mismo, se encuentra presente en un vector bajo el control de un promotor adecuado para la expresión de HBsAg en unas células de mamífero, preferiblemente una célula humana. Siempre y cuando la composición contenga al menos dos ácidos nucleicos que codifican HBsAg o un fragmento del mismo, estos pueden estar presentes en el mismo vector (vector binario) o separados uno de otro en diferentes vectores. En este caso, vectores adecuados son, por ejemplo, plásmidos, adenovirus, virus vacuna, baculovirus, virus del sarampión y retrovirus. El vector abarca en términos generales una fuente de replicación que efectúa la replicación del vector en la célula transfectada de mamífero.

Promotores adecuados pueden ser tanto promotores constitutivos como también inducibles. Promotores preferidos se derivan de CMV y SV-40.

Las composiciones previamente descritas pueden obtenerse mediante mezcla sencilla de los componentes individuales y por lo tanto son muy fácilmente producibles. Solventes y soportes adecuados dependen en este caso

del tipo de la composición (polipéptido y/o ácidos nucleicos). Fundamentalmente se prefieren los sistemas acuosos. HBsAg o fragmentos del mismo son sintéticos o se obtienen mediante preparación recombinante. Los polipéptidos producidos pueden purificarse mediante métodos cromatográficos.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen una composición de la invención y un soporte farmacéuticamente compatible. Soportes farmacéuticamente compatibles son conocidos por el experto en la materia. Ejemplos son: sales de aluminio, fosfato de calcio, liofilizados del HBsAg con o sin adición de polisacárido, emulsiones de aceite en agua, polo-lactido-co-glicolato. A estos soportes pueden agregarse, en tanto los mismos no tengan ya un efecto adyuvante, otros adyuvantes tales como, por ejemplo, miméticos de lípido A, nucleótidos inmuno estimulantes o toxinas bacterianas.

10 La composición farmacéutica de la invención es principalmente una vacuna. De acuerdo con la invención, se indica que la composición farmacéutica, principalmente la vacuna, es adecuada para el tratamiento terapéutico de una infección con HBV o una enfermedad mediada por HBV. Asimismo, la composición farmacéutica, principalmente la vacuna, es adecuada para el tratamiento profiláctico de una infección con HBV o una enfermedad mediada por HBV. La infección con HBV es preferiblemente una infección con hepatitis B crónicamente persistente. Una enfermedad
15 mediada por HBV puede ser una infección con hepatitis B aguda crónica. Otras enfermedades mediadas por HBV son cirrosis de hígado y el carcinoma primario de células hepáticas. La vacuna es adecuada para administrar a portadores de HBV clínicamente no aparentes, es decir aquellos que todavía no están enfermos en el sentido propio, aunque para el futuro presentan un alto riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por HBV.

20 La composición farmacéutica puede administrarse por vía intramuscular, cutánea, intradérmica, intravenosa, mucosal u oral, en cuyo caso éstas se indican solamente como preferidas y no se restringen a las mismas.

La composición farmacéutica contienen los, al menos dos, HBsAg's o fragmentos de los mismos en el rango de dosis desde 0,1 hasta 1000 µg/ HBsAg o fragmento del mismo, preferentemente 2,5 a 40 µg/HBsAg o fragmento del mismo.

25 Si la composición farmacéutica contiene ácidos nucleicos que codifican HBsAg o fragmentos del mismo, entonces estos se encuentran en el rango de dosis de 10 a 1000 µg / ácido nucleico que codifica HBsAg o fragmento del mismo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se indica un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de hepatitis B, tal como se define en la reivindicación 20.

30 Tal como se ha descrito previamente, un reconocimiento esencial de la presente invención consiste en que en un modelo preclínico de la hepatitis crónicamente persistente pudo lograrse un efecto de tratamiento tratando el animal transgénico con un HBsAg que provenía de un genotipo de HBV, el cual se diferenciaba del genotipo del animal transgénico.

35 El genotipo puede determinarse en este caso mediante los siguientes métodos: secuenciación del genoma completo de HBV o de al menos del segmento que codifica el HBsAg y análisis filogenético, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), PCR-Multiplex.

La provisión del medicamento se realiza formulando al menos un HBsAg, un fragmento del mismo o un ácido nucleico que codifica HBsAg o un fragmento del mismo de una manera conocida per se.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención propone el uso de al menos un HBsAg, tal como se define en la reivindicación 22.

40 Descripción de las figuras

Figura 1: variantes de HBsAg. (A) Se muestra la secuencia de aminoácidos del antígeno pequeño de superficie de la hepatitis B (HBsAg) ayw (1) correspondiente al genotipo D y adw2 (2) correspondiente al genotipo A. (B) secuencias de epítipo derivadas de ayw y adw2 de HBsAg, restringidas. El epítipo 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) fue presentado solamente por las células que procesan HBsAg exógeno, mientras que el epítipo 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) fue presentado solamente por las células
45 que procesan HBsAg endógeno.

Figura 2: Transferencia de líneas de células T citotóxicas (CTL) específicas para el epítipo 1 o el epítipo 2 en hospederos HBs-transgénicos (HBs-tg) conducen líneas de célula T citotóxicas HBs-transgénicas a un daño hepático transitorio. Las células del vaso fueron removidas de ratones B6 inmunizados con ADN de pCl/S_{ayw} y re-estimulados in vitro con células RBL5 singénicas, en cuyo caso las células RBL5 fueron impulsadas con péptido de enlace 1 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ (ILSPFLPL) o péptidos de enlace 2 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ (VWLSVIWM), o se estimularon con ConA. Se
50

inyectaron por vía intravenosa (i.v.) 5×10^6 CD8⁺ CTLL/ratón en ratones de HBs-tg y se determinó un nivel medio de alanina transaminasa (ALT) en el suero.

Figura 3: Detección ex vivo de células T CD8⁺ específicas de HBsAg en el hígado y el bazo de ratones inmunizados. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados intramuscularmente por medio de una única inyección de 100 µg de pCI/ADN de S_{ayw}. Las células T CD8⁺ específicas se detectaron 12 días después de la inmunización. Las células hepáticas mononucleares (MNC) y las células de bazo aisladas fueron re-estimuladas in vitro durante un período de cuatro horas (en presencia de Brefeldin A) con el péptido de enlace 1 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ (ILSPFLPL) o el péptido de enlace 2 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ (VWLSVIWM). Se muestra la frecuencia media de células T CD8⁺ de IFNγ⁺ / 10^5 células T CD8⁺ ± desviación estándar de 4-6 ratones (de dos experimentos independientes entre sí) por grupo.

Figura 4: respuestas de célula T HBsAg-específicas frente al epítipo 1 en ratones HBs-tg. Los ratones HBs-tg que expresan HBsAg_{ayw} en el hígado se inmunizaron tres veces (a intervalos de cuatro semanas) por vía intramuscular con vacunas de ADN que codifica el subtipo ayw (pCI/S_{ayw}) o adw2 (pCI/S_{adw2}) de HBsAg, o con el vector de control negativo pCI (vector sin inserto). Las células de bazo fueron retiradas de los ratones inmunizados 12 días después de la última inmunización y fueron re-estimuladas durante cuatro horas in vitro (en presencia de Brefeldin A) con células RBL5, y las células RBL5 fueron re-estimuladas con partículas HBsAg del subtipo ayw (RBL5/S_{ayw}) o adw2 (RBL5/S_{adw2}), o con el péptido de enlace 1 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) o HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL). Se muestra el número medio de células T CD8⁺ de IFNγ⁺ de bazo / 10^5 células T CD8⁺ ± 6 desviación estándar de 4-6 ratones (de dos experimentos independientes entre sí) por grupo.

Figura 5: respuestas de célula de CD⁸ HBsAg-específicas frente al epítipo 2 en ratones HBs-tg. Se retiraron las células de bazo de los ratones las cuales, tal como se describió con respecto a la leyenda de la Figura 4, estaban inmunizadas y se re-estimularon in vitro con transfectantes RBL5/ S_{ayw} o RBL5/S_{adw2} singénicos, o con el epítipo 2 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ de HBsAg_{ayw} (VWLSVIWM) o de HBsAg_{adw2} (VWLSAIWM). Se muestra el número medio de células T CD8⁺ de IFNγ⁺ de bazo / 10^5 CD8⁺ ± desviación estándar de 4 ratones por grupo.

Figura 6: se detectaron células T CD8⁺ S₂₀₈₋₂₁₅-específicas en el hígado de ratones HBs-tg inmunizados. Los ratones HBs-tg transgénicos fueron minimizados tres veces (a intervalos de 4 semanas) con una vacuna de ADN que codifica HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}). Las células de hígado y de bazo se retiraron de los ratones inmunizados 12 días después de la última inyección y se re-estimularon in vitro con el péptido de enlace K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ ILSPFLPL. Se muestra número medio de células T CD8⁺ de IFNγ⁺ de bazo / 10^5 CD8⁺ ± desviación estándar de 4 ratones por grupo.

Figura 7: histopatología de hígado de ratones HBs-tg que habían sido inmunizados con la vacuna de ADN pCI/S_{adw2}. En los ratones B6 (A, B) no se observó histología patológica de hígado. Los ratones HBs-tg (C, D) mostraron una ampliación celular moderada y el citoplasma muestra una apariencia de tipo vaso de leche (D). Los núcleos de las células de hígado parecían moderadamente polimórficas. Las infiltraciones periportales son raras. La inmunización repetida con ADN de pCI/S_{adw2} induce modificaciones ist o morfológicas graves en el hígado (E-I), que son consistentes con hepatitis viral aguda. Las infiltraciones inflamatorias abarcan células de Kupfer, linfocitos y pocos granulocitos polimorfo-nucleares que están localizados en el parénquima lobular (F) y en los campos periportales (G). Los hepatocitos parecen hidrópicos y presentan con frecuencia núcleos picnóticos, lo cual representa una señal de un estadio temprano de la apoptosis (F, flechas). Los cuerpos acidófilos (H, flechas), es decir, células hepáticas apostólicas son comunes y frecuentemente rodeadas de infiltraciones inflamatorias focales. Muchos núcleos de células hepáticas presentan una clara vacuolización (I, flechas). Tinciones de H & E de formalina fijada, tejidos incrustados en parafina. Ampliaciones originales: x 10 en A, C, y E; x 40 en B, D, y F; x 63 en G-I.

Figura 8: la inducción de respuestas de anticuerpo de suero HBsAg-específico en ratones HBs-tg. Ratones B6 y transgénicos HBs-tg fueron inmunizados vía intramuscular con vacunas de ADN que codifican HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) o HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) y después de tres semanas fueron reforzados con las mismas vacunas. Cuatro semanas después de la última inyección se estudiaron muestras de suero para antígeno de HBsAg (A) o anticuerpos HBsAg-específicos (B). Se muestran los títulos medios de anticuerpo (mIU/ml) y niveles de HBsAg en suero (ng/ml) ± desviaciones estándar de 4-6 ratones/grupo.

Figura 9: respuestas de células T CD8⁺ HBsAg-específicas frente al epítipo 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) y frente al epítipo 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) en ratones normales B6 y HBs_{ayw}-tg.

Los animales fueron inmunizados cada uno tres veces (a intervalos de 21 días) por vía intramuscular, partículas de proteína HBsAg (S^p) del subtipo ayw o adw2. A las vacunas de proteína se adicionaron respectivamente CpG-oligonucleótidos (ODN) o RC-529 en calidad de adyuvantes. Como control de negativo sirvió PBS. 12 días después de la última inmunización se retiró el paso de los animales y a continuación se re-estimularon las células de bazo aisladas durante cuatro horas in vitro (en presencia de Brefeldin A) con células RBL5 que habían sido pulsadas previamente con péptidos HBsAg-específicos. Para esto se usaron respectivamente el péptido de enlace 1 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) o HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) o el péptido de enlace 2 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ de HBsAg_{ayw} (VWLSVIWM) o HBsAg_{adw2} (VWLSAIWM). Se muestra el número de las células T CD8⁺ de IFNγ⁺ de bazo / 10^5 células T CD8⁺ ± desviación estándar de 4 - 6 ratones (de dos experimentos independientes entre sí por grupo).

Figura 10: respuestas de células T CD8⁺ HBsAg- específicas frente al epítipo en 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) en ratones HBs_{ayw}-tg.

A. Los ratones HBs-tg que expresan HBsAg_{ayw} en el hígado fueron inmunizados tres veces (a intervalos de cuatro semanas) por vía intramuscular con vacunas de ADN que solamente codifican el subtipo ayw (pCI/Sayw) de HBsAg o los tres tipos ayw (pCI/Sayw), adw2 (pCI/Sadw2) y adr (pCI/Sadr), o con el vector de control negativo pCI (vector sin inserto). 12 días después de la última inmunización se retiró el bazo de los animales. Las células de bazo aisladas fueron re estimuladas durante un período de 4 horas in vitro (en presencia de Brefeldin A) con células RBL5 que habían sido pulsadas previamente con el péptido de enlace 1 K^b/ S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) o HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL). Se muestra el número de las células T CD8⁺ de IFN γ ⁺ de bazo / 10⁵ células T CD8⁺ $\pm$ desviación estándar de 4-6 ratones (de dos experimentos independientes entre sí) por grupo.

B. Los ratones de HBs_{ayw}-tg fueron inmunizados por vientre muscular tres veces (a intervalos de 21 días) con partículas de proteína HBsAg (S^P) del subtipo ayw o una mezcla de partículas de proteína HBsAg de los subtipos ayw, adw2 y adr. A las vacunas de proteína se adicionaron respectivamente oligonucleótidos de CpG (ODN) o RC-529 (mostrados solamente para la mezcla de subtipos) en calidad de adyuvantes. Como control negativo sirvió PBS. 12 días después de la última inmunización se retiró el paso de los animales. Las células de bazo aisladas se re estimularon durante un período de 4 horas in vitro (en presencia de Brefeldin A) con células RBL5, las cuales previamente habían sido pulsadas con el péptido de enlace 1 K^b/ S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) o HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL). Se muestra el número de las células T CD8⁺ de IFN γ ⁺ de bazo / 10⁵ células T CD8⁺ $\pm$ desviación estándar de 4-6 ratones (de dos experimentos independientes entre sí) por grupo.

Figura 11: inducción de respuestas a anticuerpo de suero HBsAg -específicos en ratones HBs-tg. Ratones B6 y transgénicos HBs-tg fueron inmunizados por vía intramuscular con vacunas de partículas de proteína HBsAg (S^P) del subtipo ayw o del subtipo adw2 o con una mezcla de los subtipos ayw, adw2 y adr y después de tres semanas fueron reforzados con la misma vacuna. Las vacunas de proteína contenían como aditivo CpG-oligonucleótidos (ODN) en calidad de adyuvantes. Cuatro semanas después de la inyección de refuerzo, se estudiaron las muestras de suero con relación a anticuerpos de HBsAg (A) y HBsAg-específicos (B). Se muestran los títulos medios de anticuerpo (mIU/ml) y el nivel de HBsAg en suero (ng/ml) $\pm$ desviaciones estándar de 4-6 ratones/grupo.

A continuación, la invención se ilustra por medio de ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar la invención.

Ejemplos:

Material y métodos

Generalidades

El subtipo adw2 de HBV estudiado corresponde al genotipo A. El subtipo ayw de HBV corresponde al genotipo D. El subtipo adr de HBV corresponde al genotipo C.

Ratones

Ratones (B6) C57BL/6JBom (H-2^b) fueron mantenidos en condiciones estándar libres de patógenos.

Ratones transgénicos (HBs-tg) C57BL/6J-TgN(Alb1 HBV)44Bri, HbsAg_{ayw} (codificado por la secuencia de HBV con el número de depósito V01460 J02203) fueron obtenidos del laboratorio The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME). Se usaron ratones machos y hembras en una edad de 8-16 semanas.

Células, partículas recombinantes de HBsAg y péptido antigénico de HBsAg

La línea celular H-2^b RBL5 utilizada se describe en [10]. Fueron preparados transfectantes estables RBL5 que expresaron cantidades semejantes de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2}, (datos no mostrados). Las partículas recombinantes de HBsAg de los subtipos ayw, adw2 y adr se encuentran disponibles en la empresa Rhein Biotech GmbH (Düsseldorf, Alemania). Las partículas de HBsAg preparadas en la cepa hospedera de *Hansenula polymorpha* RB10 se purificaron tal como se describe en [3]. Los péptidos sintéticos ILSPFLPL (ayw) o IVSPFIPL (subtipo adw2) de S₂₀₈₋₂₁₅ K^b-enlazantes, y los péptidos VWLSVIWM (ayw) o VWLSAIWM (adw2) de S₁₉₀₋₁₉₇ K^b-enlazantes se obtuvieron de Jerini BioTools (Berlin, Alemania). Los péptidos se disolvieron en una solución de DMSO a una concentración de 10 mg/ml y se diluyeron con un medio de cultivo antes de uso.

Plásmidos e inmunización con ADN

HBsAg_{ayw}, HBsAg_{adw2} y HBsAg_{adr} se clonaron en los vectores pCI (Promega) y BMGneo tal como está descrito en [4; 5]. Como vacunas de ADN se usaron los plásmidos pCI/S_{ayw}, pCI/S_{adw2} pCI/S_{adr}, que expresaron HBsAg_{ayw}, HBsAg_{adw2} y HBsAg_{adr} igualmente bien. Esto se mostró mediante inmunoprecipitación de HBsAg de células que fueron transfectadas transitoriamente con el ADN de estos plásmidos (datos no mostrados). Por lo tanto, las diferencias en la inmunogenicidad de los epítomos de HbsAg no pueden ser aclaradas debido a las cantidades diferentes de la expresión de HbsAg por la vacuna de ADN o los transfectantes. Para la inmunización intramuscular de ácido nucleico se inyectaron 50 µl de PBS (solución salina amortiguada con fosfato) que contenía 1 µg/µl de ADN de plásmido en cada músculo tibial anterior, tal como está descrito en [4]. La inmunización con mezclas de tipos de HBsAg se efectuó mediante inyección de 50 µl de PBS que contenía respectivamente 1 µg/µl de pCI/S_{ayw}, 1 µg/µl de pCI/S_{adw2} y 1 µg/µl de pCI/S_{adr}.

Inmunización con partículas de proteínas de HBsAg

Se inyectaron 5 µg de partículas de proteína de HBsAg por vía subcutánea conjuntamente con 30 µg de oligonucleótido CpG (ODN1826, MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) u 8 µg de RC-529 (Corixa Corp. Seattle, WA, Estados Unidos) en 100 µl de PBS (solución salina amortiguada con fosfato) o ratón. Para la inmunización con una mezcla de sus tipos de HbsAg se inyectaron por vía subcutánea respectivamente 5 µg de partículas de proteína de HBsAg_{ayw}, 5 µg de HBsAg_{adw2} y 5 µg de HBsAg_{adr} conjuntamente con 30 µg de adyuvante de oligonucleótido CpG u 8 µg de RC-529 en 100 µl de PBS.

Determinación de las frecuencias de células T CD8⁺ específicas en bazo e hígado

Suspensiones de células de bazo [1] y la preparación de células hepáticas NPC han sido descritas [6; 7]. Las células de bazo y las de hígado NPC (1×10^6 /ml) fueron incubadas durante un período de una hora en el medio RPMI-1640 con 5 µg/µl de péptidos derivados de HBsAg, o transfectantes que expresan HBsAg (10^6 /ml) o células pulsadas por partículas de HBsAg. Luego se adicionaron 5 µg/µl de Brefeldin A (BFA) (catálogo No. 15870; Sigma), y los cultivos se incubaron por otras 4 horas. Las células fueron recogidas y su superficie fue teñida con anti-CD8 mAb, fijadas, permeabilizadas y se realizó una tensión con relación a IFN γ citoplasmático. Las frecuencias de CD8⁺ IFN γ ⁺ CTL fueron determinadas mediante análisis de FACS. Se muestra el valor medio para células T CD8⁺ con IFN γ ⁺ / 10^5 células T de bazo o de hígado.

Transferencia de líneas de células T CD8⁺ específicas

Las líneas de células T CD8⁺ fueron obtenidas a partir de bazo de ratones B6, los cuales fueron inmunizados con vacuna de ADN de pCI/S_{ayw}. Las células de bazo se re-estimularon in vitro con células RBL5 sin génicas que fueron pulsadas con el péptidos de enlace 1 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ (ILSPFLPL) o el péptido de enlace 2 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ (VWLSVIWM). En líneas que fueron expandidas in vitro durante un período de cerca de 2 semanas, más del 80% de las células T CD8⁺ tenían la especificidad de epítome esperada, tal como fue revelado a partir de las investigaciones de expresión específica de IFN γ . Las células se lavaron y 5×10^6 células de estas líneas se inyectaron por vía intravenosa. La célula de control fueron blastos de CD8⁺T no específicos que fueron aislados de cultivos estimulados con ConA de 3 días.

Determinación de transaminasas, anticuerpos de HBsAg y anti-HBsAg en suero

Anticuerpos de suero fueron obtenidos repetidamente a partir de ratones individuales, inmunizados o de control, mediante toma de sangre de la vena caudal en determinados intervalos de tiempo después de la inyección. La actividad de alanina aminotransferasa (ALT) de suero fue realizada en la sangre usando el ensayo Reflotron® (catálogo No. 745138; Roche Diagnostics GmbH). La concentración de HBsAg en el suero de los ratones transgénicos se determinó mediante el ensayo comercial ELISA AUSZYME II (ABBOTT Laboratories, Wiesbaden, Alemania). Los anticuerpos contra HBsAg fueron detectados en suero de ratón usando el ensayo comercial IMxAUSAB (catálogo No. 7A39-20; Abbott, Wiesbaden, Alemania).

Los niveles de anticuerpos fueron calificados con la ayuda de 6 sueros estándar. Los sueros ensayados fueron diluidos de modo que los valores de OD medidos se encontraron entre uno y seis del suero estándar. Los valores aquí mostrados fueron calculados mediante multiplicación de la dilución de suero con el nivel de anticuerpos medido (mIU/ml). Los títulos de suero representados corresponden al medio de 4 ratones individuales $\pm$ desviación estándar.

Histología

Secciones finas de tejido de hígado (< 3mm) se fijaron en formalina al 4% (pH 7,0) durante 24 horas y se incrustaron en parafina. Secciones de parafina con un espesor de 2 µm fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E).

Enlazamiento de péptidos de HbsAg a K^b

Las moléculas de MCH de clase I purificadas por afinidad K^b se incubaron por un período de 48 horas a 18 °C con concentraciones crecientes de péptido de prueba y una concentración definida (aproximadamente de 2 nM) de péptido indicador VSV NP 52-59 marcado radiactivamente en presencia de $\beta 2m$ humano de 3 μM , tal como se describe en [8, 9]. Después se determinó un enlazamiento de los péptidos a moléculas de MHC de clase I mediante filtración de gel en columna de Sephadex G50 [8]. El péptido VSV NP 52-59 marcado radiactivamente fue localizado en el volumen de exclusión (péptido enlazado a MHC) y en el volumen de inclusión (péptido libre). Esto se determinó mediante gama-radio-espectrometría y se calculó una proporción del péptido de prueba, que se había enlazado a la molécula de MHC con relación a la cantidad total de péptido de prueba. Se determinó la concentración del péptido de prueba que se necesitó para obtener 50% de inhibición de enlazamiento del péptido indicador (valor de IC50). Cuanto menor es el valor de IC50, mejores el enlazamiento del péptido de prueba. A fin de impedir el agotamiento del ligando, en todos los experimentos de enlazamiento se usó una concentración de MHC que fue suficiente para no tener más de 15-25 % de enlazamiento. En estas condiciones, el valor de IC50 es una aproximación a la constante de disociación (K_d). Todos los experimentos de enlazamiento se realizaron como experimentos de inhibición.

Ejemplo 1

Transferencia adoptiva de líneas de células T $CD8^+$ K^b -restringidas que son específicas para el epítotope 1 o el epítotope 2 inducen un daño hepático en ratones B6 HBs-tg

Se produjeron líneas de células T $CD8^+$ de corto plazo que son específicas para el epítotope 1 o el epítotope 2 (Figura 1B) de HBsAg a partir del paso de ratones B6 y que fueron inmunizados con el ADN del plásmido pCI/S_{ayw}. Dentro de estas líneas, >95% de las células eran $CD8^+$, y la expresión específica de IFN γ pudo inducirse en >80% de estas células T $CD8^+$. La transferencia adoptiva de 5×10^6 células de esta línea en hospederos B6 congénicos que expresaron HBsAg_{ayw} en el hígado de un transgénico indujo un daño hepático agudo tal como fue revelado por un corto, aunque elevado incremento en la transaminasa en suero (Figura 2). Los niveles de transaminasa en suero se normalizaron 5-6 días después de la transferencia, tiempo en el cual no fue detectada ninguna célula T $CD8^+$ transferida en el hospedero. La transferencia del mismo número de blastos T $CD8^+$ policlonales (mitógeno-activados) no mostró daño hepático. Por lo tanto, se verificó que (i) células T $CD8^+$ específicas efectivamente inducen el daño hepático en ratones HBs-tg (tal como fue descrito en [2]); (ii) los epítotos de HBsAg que fueron producidos mediante procesamiento de HBsAg endógeno o exógeno, se presentan en el hígado que expresa el transgén; y (iii) las células T $CD8^+$ transferida de modo adoptivo se retiran rápidamente del hospedero transgénico. Las células T $CD8^+$ transferidas con especificidades diferentes de HBsAg, tienen, por tanto, acceso al hígado y pueden activarse *in situ*, mas no pueden ser absorbidas establemente.

Ejemplo 2: CTL K^b -restringidas que reconocen los epítotos 1 y 2 de HBsAg, se observaron en el bazo y en el hígado

Se investigó si las células T $CD8^+$ HBsAg-específicas, imprimadas por vacuna tienen acceso al hígado en ratones B6 (HBs-tg) normales o transgénicos que expresan HBsAg (Fig. 3). Se aislaron células de bazo y células de hígado no parénquimal (NPC) de ratones B6 que habían sido inmunizados 12-15 días antes con la vacuna de pCI/S_{ayw}. Las células T $CD8^+$ que eran específicas para el epítotope 1 o el epítotope 2, fueron encontradas en poblaciones de células T $CD8^+$ del vaso y del hígado de ratones B6 normales (Fig. 3A). Aunque la frecuencia de células T $CD8^+$ HBsAg-específicas dentro de poblaciones de células T $CD8^+$ del hígado era alta, sus cantidades absolutas eran más bajas que en el bazo (datos no mostrados). En contraste, no fue detectable una reactividad de células T $CD8^+$ en ratones B6 HBsAg_{aywtg}, que habían sido inmunizados con la vacuna de ADN que codifica HBsAg_{ayw} (Fig. 3B). Ni las 3 inyecciones de refuerzo (a intervalos de tres semanas) con la vacuna de ADN, ni las inmunizaciones repetidas con partículas de antígeno de HBsAg y el adyuvante de oligonucleótido provocaron inmunidad de células T $CD8^+$ HBsAg-específicas en ratones HBs-tg (datos no mostrados). De esta manera, los protocolos de inoculación usando la misma variante de HBsAg, contra la cual el ratón es tolerante, no producen inmunidad antiviral efectiva de células T $CD8^+$.

Ejemplo 3: Respuestas de células T K^b -restringidas frente a los epítotos de las variantes de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2}

Las proteínas de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2} de aislados de HBV que presentan 226 residuos de aminoácidos se diferencian en 16 residuos de aminoácidos (por lo tanto un 93% de identidad de sus aminoácidos). La secuencia de la proteína de HBsAg_{ayw}, que fue usada, es idéntica a la secuencia del HBsAg_{ayw} codificado de modo transgénico, que fue expresado por los ratones B6 HBs-tg. Las secuencias de los epítotos 1 y 2 de enlace K^b de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2}, que fueron seleccionados, difieren en 1 o 2 residuos de aminoácido dentro del epítoto, aunque tienen idénticas secuencias flanqueantes (Fig. 1A, B). Los epítotos 1 de S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2} difieren en dos posiciones: en adw2, un residuo de valina (V) es sustituido por una leucina (L) en posición 2, y una isoleucina (I) es sustituida por un residuo de leucina (L) en posición 6 (Fig. 1 B). La afinidad de enlazamiento del epítoto 1 de K^b fue bastante baja; la variante de HBsAg_{adw2} del epítoto 1 mostró una más alta afinidad de enlazamiento a K^b que las variantes de HBsAg_{ayw} del epítoto (tabla 1). En contraste con esto, la afinidad de enlace del epítoto 2 a K^b fue alta (tabla 1).

Tabla 1: Afinidad de enlazamiento de epítopes inmunogénicos de HBsAg a K^b

Epítopo	Variante de HBsAg	Secuencia de péptido	Enlace a K ^b (nM)
1	ayw	ILSPFLPL	3400
1	adw2	IVSPFIPL	773
2	ayw	VWLSVIWM	54

Los ratones B6 inmunizados con vacuna de ADN de pCI/S_{ayw} o pCI/S_{adw2}, mostraron una respuesta de célula T CD8⁺ frente al epítopo 1 de enlazamiento a K^b, que fue observada después de una red estimulación ex vivo de 5 horas de células T CD8⁺ imprimadas de bazo, que fueron pulsadas con partículas de HBsAg_{ayw} o de HBsAg_{adw2} o péptido de antígeno S₂₀₈₋₂₁₅ de HBsAg_{ayw} o HBsAg_{adw2} (Fig. 4A), grupo 2,3). Las variantes ayw y adw2 del epítopo 1 tuvieron reacción cruzada porque (i) las CTL específicas de epítopo 1 fueron imprimadas por pCI/S_{ayw} o pCI/S_{adw2}; y (ii) las células que habían sido pulsadas con partículas de HBsAg_{ayw}, o HBsAg_{adw2} o pulsadas con péptido ILSPFLPL (ayw) o péptido IVSPFIPL (adw2), presentaron el epítopo 1 frente a células T CD8⁺ imprimadas. Por consiguiente, las dos sustituciones dentro del epítopo 1 mero-8 no inhibieron el procesamiento efectivo, el enlace a K^b o la presentación del epítopo.

Las células T CD8⁺ que fueron imprimadas con la vacuna de ADN de pCI/S_{ayw}, reconocieron el epítopo 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) de HBsAg_{ayw}, o HBsAg_{adw2} (Fig. 5A; grupo 2). Esto fue detectado ex vivo después de red estimulación de 5 horas usando células pulsadas por péptido o transfectantes que expresan HBsAg_{ayw}. Las células T CD8⁺ imprimadas no reconocieron transfectantes que expresaran el HBsAg_{adw2} endógeno. La inmunización con la vacuna de ADN de pCI/S_{adw2} no imprimó células T específicas del epítopo 2 (Fig. 5A, grupo 3). Las células T CD8⁺, que fueron imprimadas con la vacuna de pCI/S_{adw2} (aunque no con la de pCI/S_{ayw}), reconocieron un epítopo adw2-específico de especificidad desconocida de epítopo/restricción que fue presentada por los transfectantes; esto no fue investigado posteriormente (Fig. 5, grupo 3). La sustitución del aminoácido en posición 5 (intercambio del aminoácido hidrófugo valina V por el aminoácido hidrófugo alanina A) inhibe por lo tanto la producción del epítopo 2, aunque no su presentación por la molécula de K^b [1].

Ejemplo 4: Respuestas de reactividad cruzada de células T CD8⁺ K^b-restringidas frente al epítopo 1 de HBsAg se impriman en ratones B6 HBS-tg

Los ratones B6 HBS-tg expresan HBsAg_{ayw} a partir de un transgénico en el hígado. Los ratones HBS-tg fueron inmunizados con HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) o HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) (Fig. 4, 5B). No se obtuvo respuesta de células T CD8⁺ por inmunización repetida de ratones B6 HBS-tg con la vacuna de ADN de pCI/S_{ayw} (Fig. 4, 5B, Grupo 2). En contraste con esto, la inmunización de ratones B6 HBS-tg con la vacuna de ADN de pCI/S_{adw2} produjo una respuesta de célula T CD8⁺ frente a HBsAg (Fig. 4B, Grupo 3). Esta respuesta de reacción cruzada de célula T CD8⁺ reconoció células que habían sido pulsadas con partículas de HBsAg_{ayw} o HBsAg_{adw2} o con la variante ayw o adw2 del epítopo en 1 en forma de péptido (Fig. 4B, grupo 3). Estas células T CD8⁺ no reconocieron los transfectantes de RBL5/S_{ayw} o el epítopo 2 de enlace a K^b S₁₉₀₋₁₉₇ (Fig. 5B, Grupo 3). Las células T CD8⁺ mostraron una reactividad específica del subtipo en relación con un determinante no determinado que fue presentado por RBL5/S_{adw2} aunque no por los transfectantes RBL5/S_{ayw} (Fig. 5B, Grupo 3). Esto muestra que una variante natural de HBsAg es capaz de "romper tolerancia" mediante el imprimado de una inmunidad de reacción cruzada de célula T.

Se investigó si las poblaciones específicas de célula T CD8⁺ en el hígado que produce antígeno pueden ser detectadas en los ratones transgénicos que han sido inmunizados con pCI/S_{adw2}. En el paso en el hígado NPC de ratones B6 HBS-tg, que han sido inmunizados con pCI/S_{adw2}, pudo detectarse reactividad específica de célula T CD8⁺ durante meses (Fig. 6). En contraste con las células T CD8⁺ transferidas de modo adoptivo (Fig. 2), las células T CD8⁺ anti-HBV-específicas, imprimadas con vacuna, tienen acceso y presentan absorción estable en el órgano objetivo portador del antígeno durante un período de más de 3 meses.

Ejemplo 5: Histopatología de hígado de ratones HBS-tg que presentan una reactividad específica de células T CD8⁺ frente al epítopo 1 de HBsAg

Las células T CD8⁺ HBsAg-específicas indujeron una respuesta inflamatoria en el hígado productor de HBsAg. Los ratones B6 no tratados mostraron una histología hepática normal (Fig. 7A, B). Los hepatocitos de ratones B6 HBS-tg fueron ampliados y exhibieron un citoplasma eosinofílico pálido, granular fino, el cual es característico de "células hepáticas tipo vaso de leche", que también se observa en el caso de la infección por HBV en humanos (Figura 7C, D). No se observaron infiltraciones inflamatorias.

Los ratones HBS-tg que fueron inmunizados con vacuna de ADN de pCI/S_{adw2} (aunque no con pCI/S_{ayw}), presentaron una histopatología hepática grave (Fig. 7E). Los infiltrados inflamatorios que fueron encontrados en las áreas de parénquima (Fig. 7F) y periportal (Fig. 7G) consistían principalmente de células mononucleares (Fig. 7F). Numerosas

células linfoides pequeñas estaban distribuidas en las áreas de parénquima y periportal. Los grupos localizados de células inflamatorias circundaban los hepatocitos apoptóticos (Fig. 7H). El agrandamiento e hinchamiento hidrópico de hepatocitos fue mayor en ratones inmunizados HBs-tg que en no tratados. Algunos núcleos, de medianos a pequeños, presentaron una cromatina condensada y un halo perinuclear (Fig. 7F flechas), que indica un estadio temprano de la apoptosis. Además, fueron observados numerosos cuerpos de Councilman que representan células hepáticas apoptóticas (Fig. 7H, flechas). Algunos hepatocitos presentaron vacuolización nuclear (Fig. 7, flechas). No fue detectable una colestasis significativa.

Ejemplo 6: El imprimado de células T CD8⁺ HBsAg-específicas en ratones HBs-tg se correlaciona con una reducción en la antigenemia

Los ratones HBs-tg no tratados presentan niveles de HBsAg en suero de 30-50 ng/ml (Fig. 8A). Los ratones que desarrollaron respuestas de reacción cruzada de células T CD8⁺ frente al epítipo 1 después de la inmunización con HBsAg_{adw2}, presentaron una antigenemia reducida (con niveles en el rango de 5-15 ng/ml), mientras que los animales que habían sido inmunizados con HBsAg_{ayw}, que no desarrollaron una inmunidad de célula T CD8⁺ HBsAg-específica, no presentaron modificación de los niveles de antígeno (Fig. 8A). Por lo tanto, el control parcial de la antigenemia se correlaciona con la ocurrencia de células T CD8⁺ específicas en los ratones transgénicos inmunizados.

Ejemplo 7: Anticuerpos anti-HBsAg en suero se presentan en ratones HBs_{ayw}-tg que han sido inmunizados con HBsAg_{adw2}

En adición a la inmunidad de célula T, la inmunidad humoral anti-HbsAg puede desempeñar un papel en el control del antigenemia. Se observó la ocurrencia de anticuerpos anti-HBsAg en suero en ratones vacunados normales y transgénicos. Los ratones B6 normales (no transgénicos) y los ratones B6 HBs-tg congénicos se inmunizaron dos veces con la vacuna de ADN de pCL/S_{ayw} o pCL/S_{adw2}. Sus títulos de anticuerpo en suero, que fueron específicos para HBsAg, se determinaron dos semanas después de la última inmunización con el ensayo ImxAUSAB (Abbott), el cual determina HBsAg de diferentes subtipos. Mientras que los ratones no transgénicos, que estaban inmunizados con ADN de plásmido pCL/S_{ayw} o pCL/S_{adw2}, desarrollaron altos niveles de anticuerpos en suero frente a HBsAg, los ratones HBs-tg mostraron una respuesta de anticuerpo en suero anti-HBsAg solamente después de las inmunizaciones con ADN de plásmido de pCL/S_{adw2} (aunque no con pCL/S_{ayw}) (Fig. 8B). Respuestas a anticuerpos similares se observaron en ratones que habían sido inmunizados con partículas de HBsAg_{ayw} o HBsAg_{adw2} (datos no mostrados). Un ELISA específico para el subtipo (con placas recubiertas de partículas de HBsAg_{ayw} o HBsAg_{adw2}), mostró que en ratones normales >95 % de la respuesta de anticuerpo producida por todas las vacunas se direcciona contra el determinante 'a' de HBsAg; en ratones HBs-tg >90 % de la respuesta de anticuerpos esta direccionada contra determinantes adw2-específicos (datos no mostrados).

Ejemplo 8: Imprimado eficiente de respuestas de reacción cruzada de células T CD8⁺ K^b-restringidas contra el epítipo 1 de HBsAg en ratones B6 HBs-tg mediante inmunización con partículas de proteína de HBsAg

La inmunización de ratones B6 normales con partículas de proteína de HBsAg del subtipo ayw o. adw2 da lugar a una inmunorespuesta mediada por células T CD8⁺ contra el epítipo 1 de enlazamiento K^b (S₂₀₈₋₂₁₅) (Figura 9A). Por consiguiente, pudo mostrarse que independientemente del tipo de la vacuna (partículas de proteína o ADN), los epítopos pueden imprimir con diferentes secuencias respuestas de acción cruzada de células T. De manera análoga, las inmunizaciones con vacunas de ADN (Figura 5) mostraron que la vacunación de ratones B6 con partículas de proteína de HBsAg del subtipo ayw imprima una respuesta de célula CD8⁺ contra el epítipo 2 de enlazamiento K^b de HBsAg (S₁₉₀₋₁₉₇), aunque no la vacunación con partículas de proteína de HBsAg del subtipo adw2 (Figura 9A).

Los ratones HB_{sayw}-tg fueron inmunizados con vacunas de partículas de proteína de HBsAg, las cuales correspondían al subtipo ayw o al subtipo adw2. Mientras que ninguna respuesta de célula T CD8⁺ fue generada después de inmunizar varias veces con la vacuna de proteína de HBsAg_{ayw}, la inmunización con el antígeno de proteína heteróloga de HBsAg_{adw} generó una respuesta de célula T CD8⁺ HBsAg-específica frente al epítipo 1 (Figura 9B). Por consiguiente, se muestra que una variante natural de HBsAg también puede romper una tolerancia existente por un imprimado de una respuesta de reacción cruzada de célula T, incluso por medio de una vacunación de subunidad de proteína.

Ejemplo 9: Imprimado eficiente de respuestas de reacción cruzada de células T CD8⁺ K^b-restringidas contra el epítipo 1 de HBsAg en ratones B6 HBs-tg por inmunización con mezclas de variantes naturales de HBsAg

Los ratones HB_{sayw}-tg fueron inmunizados tanto con una vacuna de ADN, que codificaba los tres subtipos de HBsAg ayw (pCL/S_{ayw}), adw2 (pCL/S_{adw2}) y adr (pCL/S_{adr}) (Figura 10A), como también con una vacuna de partículas de proteína de HBsAg, que contenía una mezcla de subtipos ayw, adw2 y adr (Figura 10 B). La mezcla de las variantes

naturales de HBsAg imprimó respuestas de reacción cruzada de células T CD8⁺ K^b-restringidas frente al epítipo 1, después de la inmunización tanto con ADN como también con partículas de proteína.

Ejemplo 10: Reducción de la antigenemia en ratones HBs-tg después de inmunizar con mezclas de variantes naturales de HBsAg

- 5 En ratones HBs-tg no tratados se observa un nivel de suero de 30 - 50 ng/ ml. Los animales que después de la inmunización con una vacuna heteróloga de HBsAg (HBsAg_{adw2}) o una mezcla de variantes naturales de HBsAg (HBsAg_{ayw} + HBsAg_{adw2} + HBsAg_{adr}) desarrollan una respuesta de reacción cruzada de células T CD8⁺ frente al epítipo 1, muestran una antigenemia reducida (con niveles de HBsAg de 5-17 ng/ml). En animales que fueron inmunizados solamente con el HBsAg_{ayw} homólogo y, por tanto, no pudieron generar inmunidad de célula T HBsAg-específica, no se observó una modificación de la cantidad de antígeno. La inmunización con una mezcla de
10 variantes naturales de HBsAg puede efectuar de manera correspondiente una reducción de la antigenemia.

Ejemplo 11: Inducción de anticuerpos anti-HBsAg en suero en ratones HBs-tg después de inmunización con mezclas de variantes naturales de HBsAg

- 15 Los ratones B6 normales presentan una respuesta sobresaliente de anticuerpos después de la inmunización con HBsAg_{ayw}, HBsAg_{adw2}, HBsAg_{adr} (no mostrada) así como con una mezcla de los tres subtipos. Se investigó la formación de anticuerpos HBsAg-específicos en suero en ratones HBs-tg después de la inmunización. Los ratones HBstg mostraron una respuesta de anticuerpos en suero solamente después de inmunizar con una mezcla de variantes naturales de HBsAg o con el subtipo heterólogo adw2. Después de inmunizar con el subtipo homólogo ayw no se indujeron respuestas anti-HBsAg. Un ELISA específico del subtipo (placas de microtitulación recubiertas con
20 partículas de proteína de HBsAg_{ayw} y HBsAg_{adw2}) mostró que en ratones HBs-tg >90 % de la respuesta HBsAg-específica de anticuerpos está dirigida contra determinantes adw2 específicos (no se muestran datos).

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Sociedad Rhein Biotech para nuevos procesos biotecnológicos y productos mbH Melber, Karl

<120> Composición para la prevención/el tratamiento de infecciones con HBV y enfermedades mediadas por HBV

25 <130> PCT-2069HVTF

<140>

<141>

<150> DE10339927.5

<151> 2003-08-29

30 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

35 <213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> Polipéptido de HBsAg de HBV subtipo adw2/genotipo 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

5 <213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> Polipéptido de HBsAg de HBV subtipo ayw/genotipo D

<400> 2

ES 2 541 123 T3

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

5 <213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> HBV subtipo adw2 HBsAg epítotope 190-197

<400> 3

Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met
 1 5

10 <210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> HBV Subtipo ayw HBsAg Epitope 190-197

5 <400> 4

Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> HBV subtipo adw2 HBsAg epítape 208-215

<400> 5

Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu
1 5

15 <210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Virus de Hepatitis B

<220>

20 <223> HBV Subtipo ayw HBsAg epítape 208-215

<400> 6

Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
1 5

<210> 7

<211> 225

25 <212> PRT

<213> Virus de Hepatitis B

<220>

<223> Polipéptido de HBsAg de HBV Subtipo adr/genotipo C

<400> 7

```

Met Glu Asn Thr 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 Ala Pro Ala Cys
      35           40           45

Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Leu 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 Thr 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 Leu Pro Gly
      100          105          110

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

Gln Gly Thr Ser Met Phe 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 Ala Arg
145          150          155          160

Phe 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 Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn 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

```

Referencias

- 5 1. Schirmbeck,R., Boehm,W., Fissolo,N., Melber,K., and Reimann,J., Different immunogenicity of H-2 Kb-restricted epitopes in natural variants of the hepatitis B surface antigen. Eur.J.Immuno/. 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.
- 10 3. S. Schaefer, M. Piontek, S.J. Ahn, A. Papendieck, Z. Janowicz, I. Timmermans, and G. Gellissen. 2002. Recombinant hepatitis B vaccines - disease characterization and vaccine production in *Hansenula polymorpha* – Biology and Applications. G. Gellissen (ed.) pp 175 - 210, Wiley-VCH, Weinheim, Alemania
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.
- 15 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 intramuscular 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 10. T. van-Hall, J. van-Bergen, P.A. van-Veelen, M. Kraakman, L.C. Heukamp, F. Koning, C. J. Melief, F. Ossendorp, 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.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición, que contiene al menos dos antígenos de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg's), fragmentos de los mismos, que contienen un epítipo de célula T, en cuyo caso los fragmentos de los al menos dos HBsAgs tienen conjuntamente al menos 10 aminoácidos, aunque en se diferencian uno de otro al menos por un aminoácido, y/o estos ácidos nucleicos codificantes, en cuyo caso los HBsAgs se componen de la proteína S (pequeño antígeno de superficie de HBV) y en cuyo caso los HBsAgs se diferencian en el genotipo del virus de hepatitis B (HBV) en la región S de HbsAg, y en cuyo caso la composición no contiene antígeno de núcleo de HBV (HBcAg) o este ácido nucleico codificante, para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico de una infección con HBV o una enfermedad mediada por HBV.
- 10 2. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la composición contiene al menos dos HBsAg's y/o al menos dos fragmentos de los mismos.
3. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el/los fragmento/fragmentos de HBsAg contienen al menos 20, principalmente al menos 50 aminoácidos.
- 15 4. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el fragmento comprende el "a-determinante" de HBsAg.
5. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el primer fragmento y el segundo fragmento tienen en común al menos 20 aminoácidos, aunque difieren uno de otro en al menos un aminoácido.
- 20 6. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la composición contiene al menos dos ácidos nucleicos que codifican HBsAgs o fragmentos de los mismos.
7. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el genotipo se selecciona de: A, B, C, D, E, F, G o H.
8. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la composición contiene al menos 3, preferentemente 5 diferentes HBsAgs, fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican.
- 25 9. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la composición contiene HBsAgs de los genotipos A, B, C, D, E, F, G y H, fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican.
10. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el ácido nucleico que codifica HBsAg o un fragmento del mismo se encuentra presente en un vector bajo el control de un promotor adecuado para la expresión de HBsAg en unas células de mamífero.
- 30 11. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el vector se selecciona de: plásmidos, adenovirus, virus de vacuna, baculovirus, virus del sarampión y retrovirus.
12. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque el promotor se selecciona de promotores constitutivos e inducibles.
- 35 13. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la infección con HBV es hepatitis B crónicamente persistente.
14. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la enfermedad mediada por HBV es una cirrosis hepática o un carcinoma primario de células hepáticas.
15. Uso de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 14 caracterizado porque la composición se administra por vía intramuscular, cutánea, intradérmica, intravenosa, mucosal u oral.
- 40 16. Método para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de hepatitis B, el cual comprende:
 - a) determinar el genotipo de HBV, con el cual está infectado el paciente; y
 - b) proporcionar un medicamento que contiene al menos un HBsAg de un genotipo de HBV, donde el HBsAg se compone de la proteína S (pequeño antígeno de superficie de HBV) o de la proteína S y de los dominios de proteína Pre-S1, para el tratamiento del paciente cuyo genotipo de HBV ha sido determinado en el paso del método a),
- 45

caracterizado porque el genotipo del HBsAg contenido en el medicamento se diferencia en un epítipo de célula T del genotipo HBV del paciente, determinado de acuerdo con a).

17. Método según la reivindicación 16, caracterizado porque el genotipo se determina mediante el método de PCR.

- 5 18. Uso de al menos un HBsAg de un genotipo de HBV, en el cual el HBsAg se compone de la proteína S (pequeño antígeno de superficie de HBV) o de la proteína S y del dominio de proteína Pre-S1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que está infectado con un HBV de un genotipo, el cual se diferencia del genotipo de HBV del HBsAg en un epítipo de célula T, en cuyo caso el genotipo de HBV del paciente ha sido determinado antes del tratamiento.

A.

- (1) MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTPQ SLDSWWTSLN FLGGTTVCLG QNSQSPTS⁶⁰NH
 (2) MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTPQ SLDSWWTSLN FLGGSPVCLG QNSQSPTS⁶⁰NH
- 1) SPTSCPPTCP GYRWMCLRRF IIFLILLC LIFLLVLDY QGMLPVCPLI PGSSITTSTGP¹²⁰
 (2) SPTSCPPICP GYRWMCLRRF IIFLILLC LIFLLVLDY QGMLPVCPLI PGSTTTSTGP
 „a“
- (1) CRTCMITTAQG TSMYPSCCCT KPSDGNCTCI PIPSSWAFGK FLWEWASARF SWLSLLVPFV¹⁸⁰
 (2) CKTCITPAQG NSMFPSCCCT KPTDGNCTCI PIPSSWAFK YLWEWASVRF SWLSLLVPFV
- (1) QWFVGLSPTV WLSVIWMMWY WGPSLYSILS PFIPLPIFF CLWVYI²²⁶
 (2) QWFVGLSPTV WLSAIWMMWY WGPSLYSIVS PFIPLPIFF CLWVYI

B.

Secuencia de aminoácidos					
Epítipo	Residuo	ayw	asw2	Restricción	Procesamiento
1	208-215	ILSPFLPL	ISPFILPL	K ^b	Exo
2	190-197	VWLSVWMM	VWLSANMM	K ^b	endo

Figura 1

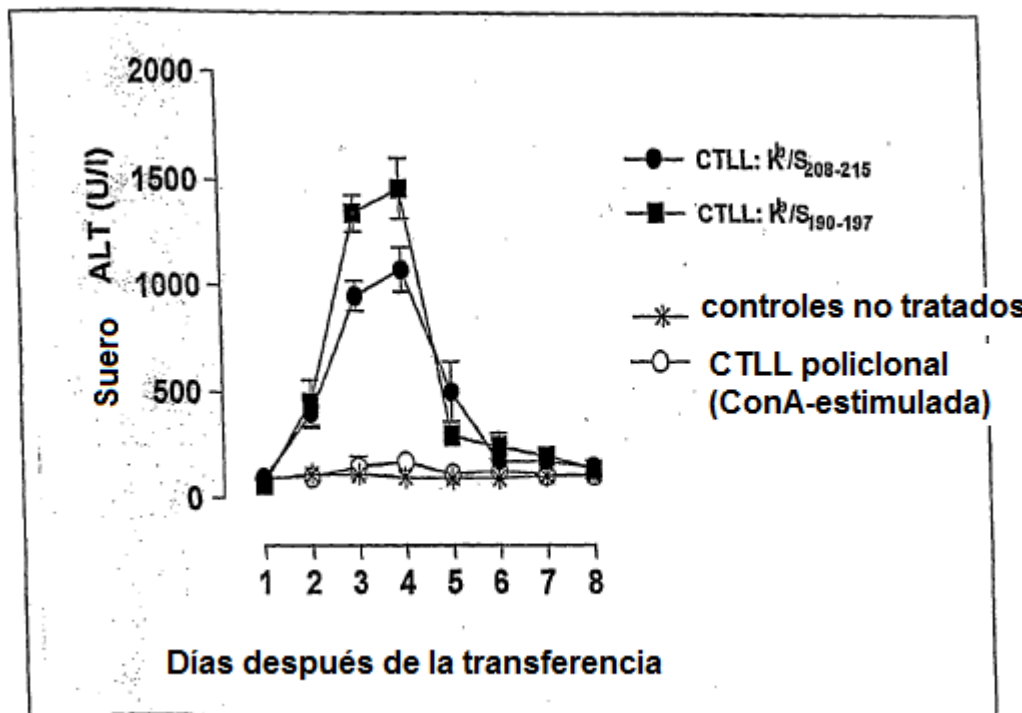


Figura 2

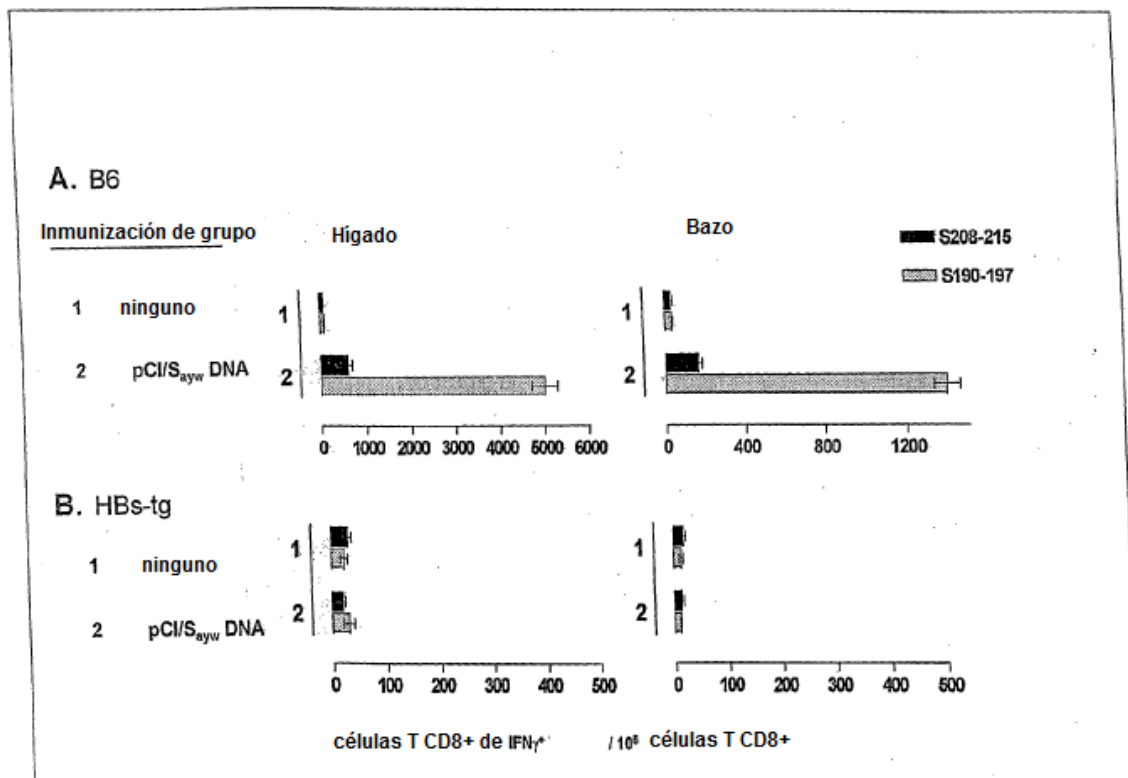


Figura 3

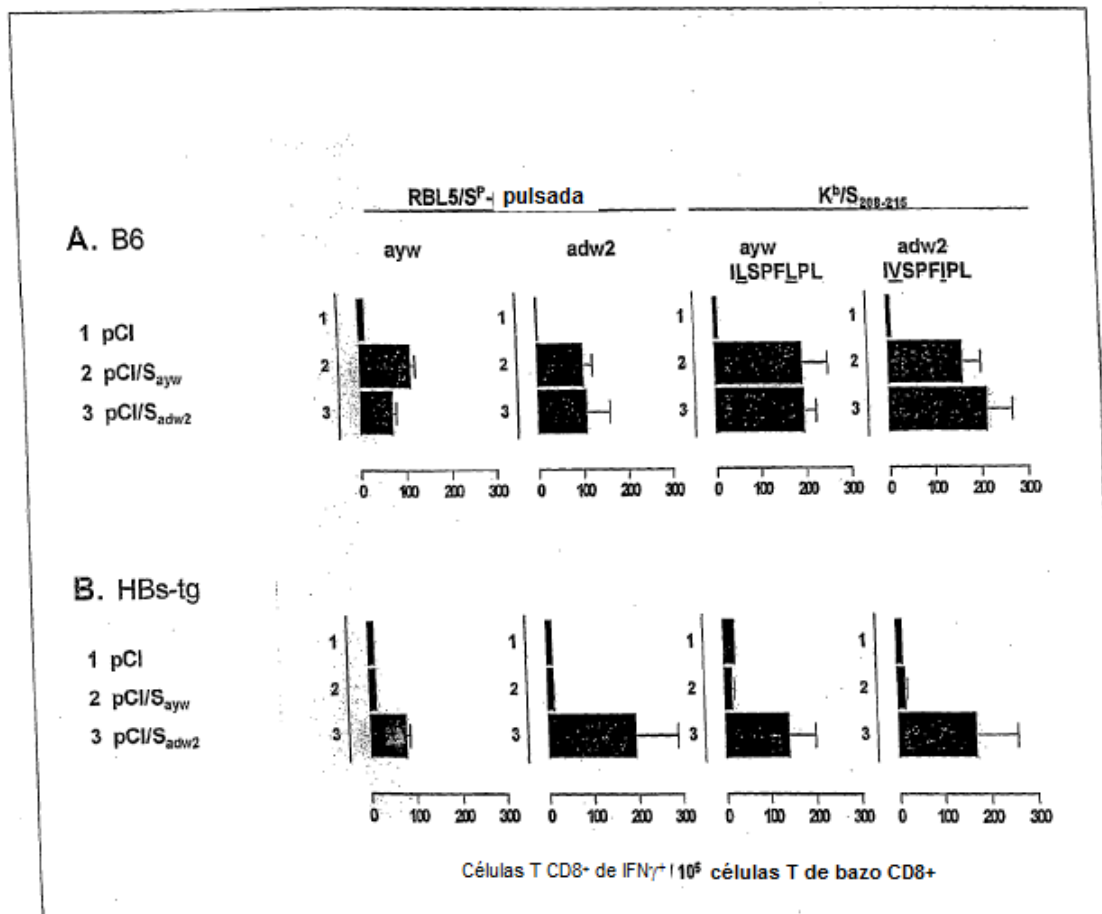


Figura 4

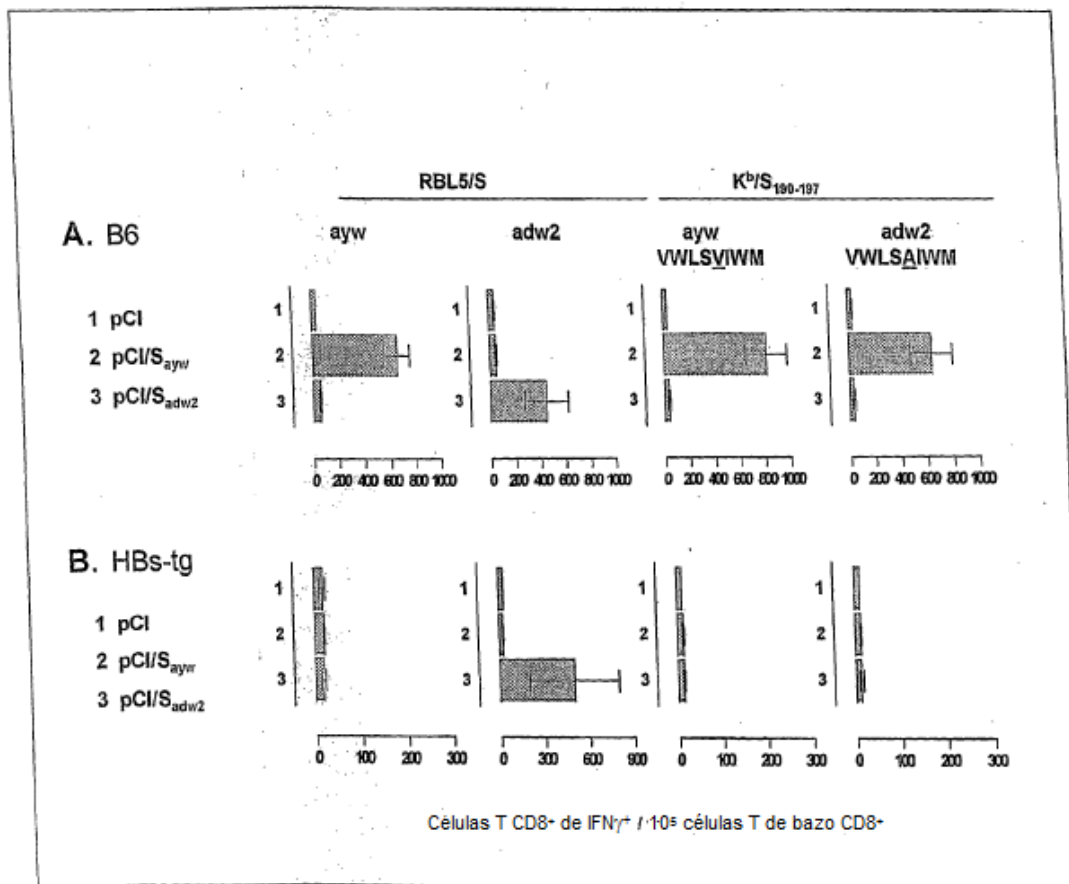


Figura 5

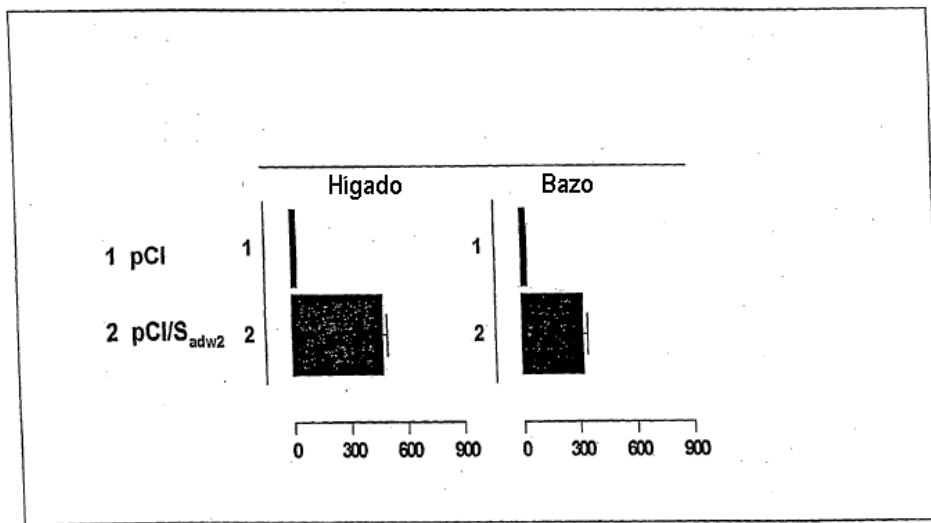


Figura 6

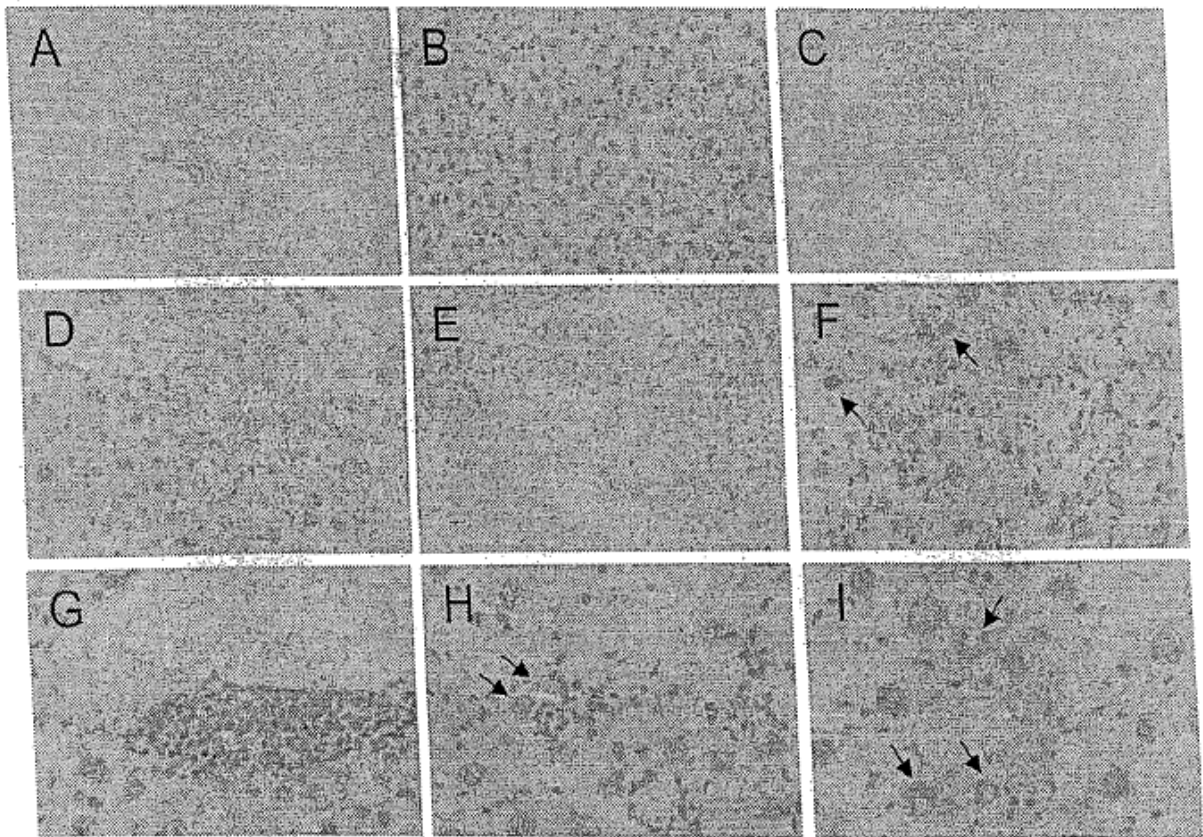


Figura 7

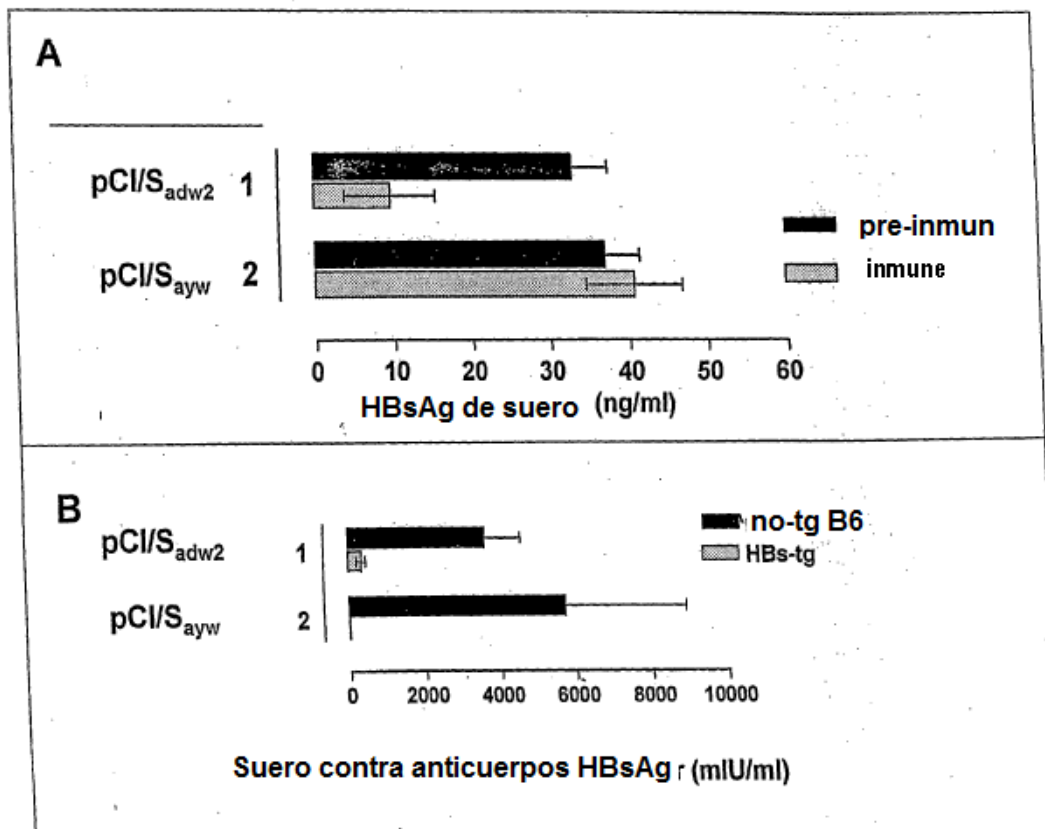


Figura 8

Re-estimulación de células RBL5 pulsadas con

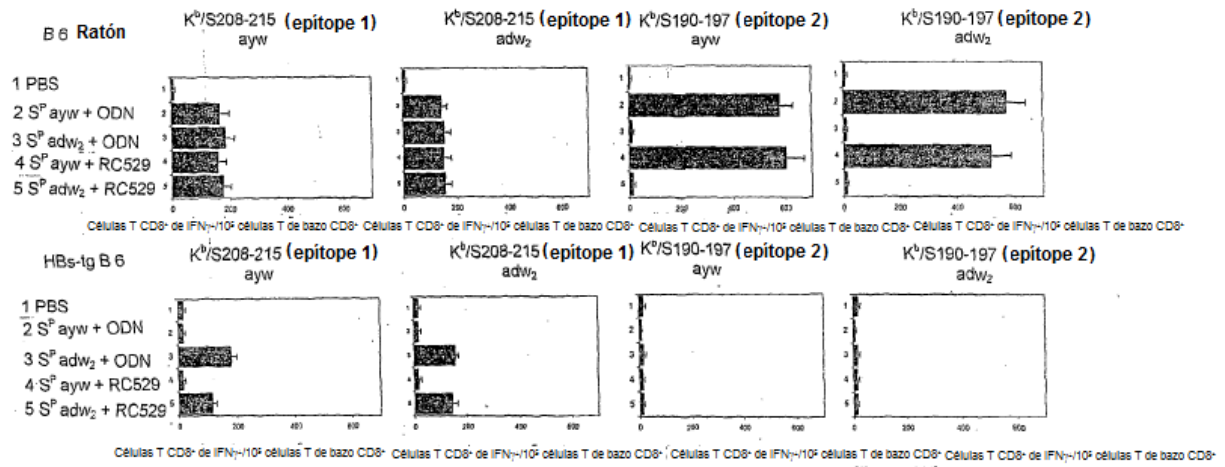


Figura 9

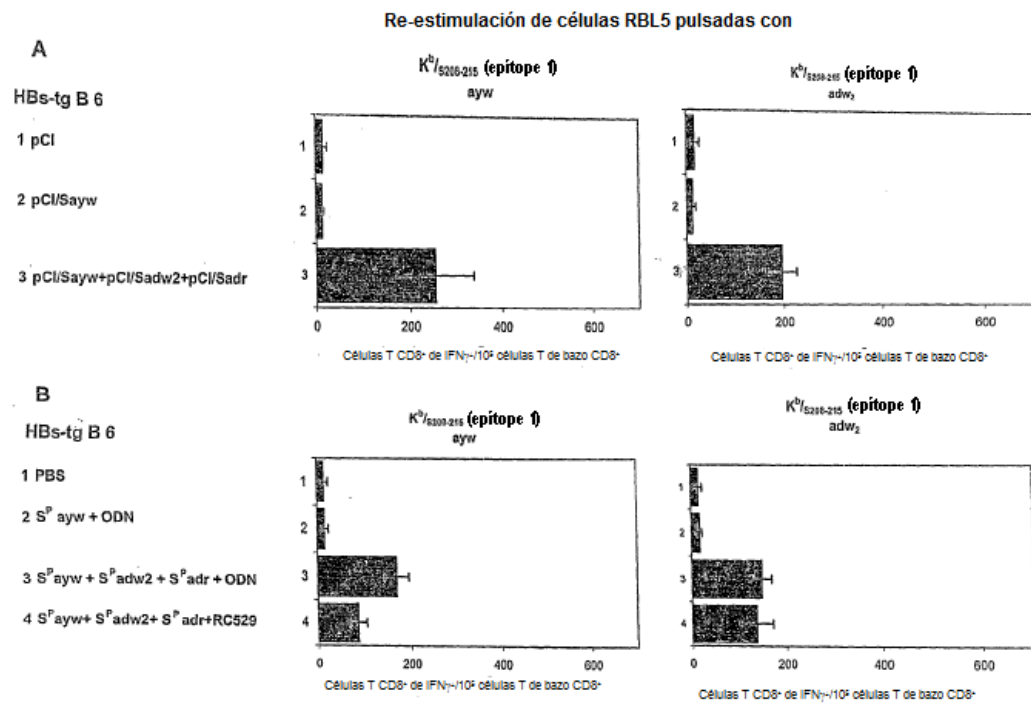


Figura 10

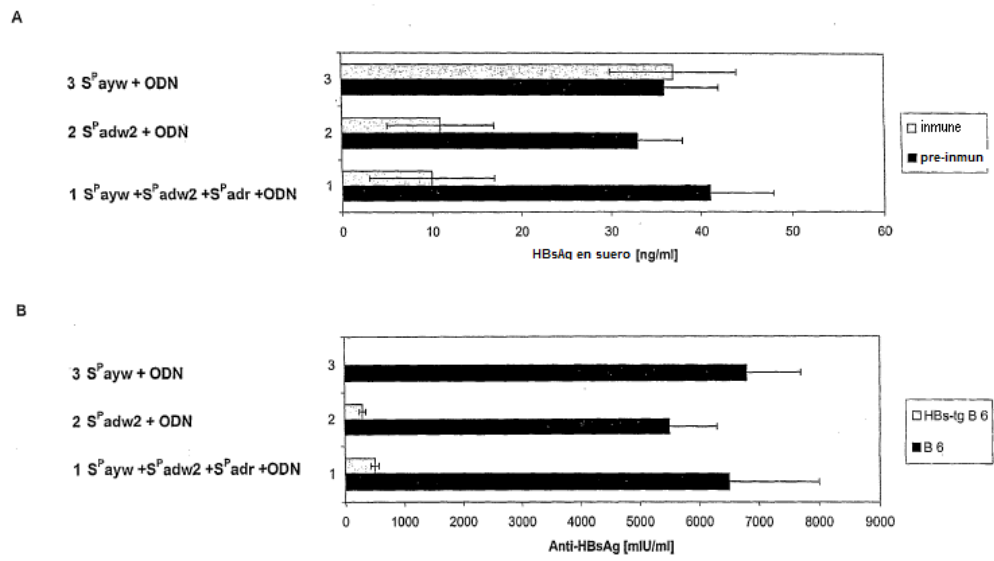


Figura 11