

## **Abschlussbericht Teilprojekt 14.1**

**Projekttitlel:** Etablierung eines horizontalen Netzwerks für Tiermodelle

**Projektleiter:** Prof. Dr. med. F. von Weizsäcker  
Albert-Ludwigs-Universität  
Innere Abteilung II  
Hugstetter-Str. 55  
79106 Freiburg

**Telefon:** +49-(0) 761-270 3260

**Fax:** +1-(0) 761-270 3610

**E-Mail:** [weiz@ukl.uni-freiburg.de](mailto:weiz@ukl.uni-freiburg.de)

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

Das Projekt 14.1 ist ausschließlich der Förderung von Vernetzungsaktivitäten gewidmet. Konkretes Ziel des Projektes war die Etablierung eines Netzwerks von Arbeitsgruppen, die sich mit Tiermodellen der Virushepatitis beschäftigen. Hierdurch sollte das "horizontal networking" verbessert und somit die Umsetzung neuer antiviraler Strategien in präklinische Studien beschleunigt werden.

Um diese Ziel zu erreichen, wurde erstmals ein HepNet-Workshop zum Thema "Modelle der Virushepatitis" organisiert. Der Workshop fand im Februar 2003 in Elmau statt, die Teilnehmerliste sowie das wissenschaftliche Programm sind in den Midterm-Report 2003/2004 integriert. Als ein Ergebnis des Workshops wurden neue Kollaborationen initiiert, wie z.B. die Transduktion dendritischer Zellen (Böcher, Mainz) mit neuen Genvehikeln (Protzer, Köln) sowie die Nutzung primärer Tupaiahepatozyten für Studien zur HBV-Aufnahme (Glebe, Gerlich, Giessen), HBV-Replikation (Köck, Baumert, von Weizsäcker, Freiburg) und zur Repopulierung von UPA/ RAG-2 Mäusen (Petersen, Hamburg).

Die Ergebnisse des Workshops wurden in Buchform zusammengefasst. Das Buch befindet sich beim Karger Verlag im Druck und erscheint in der Reihe "Monographs in Virology", Vol. 25 unter dem Titel "Models of Viral Hepatitis (Editors: Fritz von Weizsäcker, Freiburg, and Michael Roggendorf, Essen).

Für dieses Buchprojekt konnten auch die international renommierten Wissenschaftler A. Jilbert (Adelaide, Australien) und L. Guidotti (Milano, Italien und La Jolla, SD, USA) gewonnen werden.

Nicht verbrauchte Mittel wurden u.a. für Reisestipendien verwendet, die der Verbesserung von Technologietransfers im Netzwerk dienen. In der nächsten Förderperiode soll ein Workshop mit internationaler Beteiligung organisiert werden. Dies würde einen externen Review ermöglichen und der Auslotung von Möglichkeiten für internationale Netzwerke dienen.

**Publikationen:**

Technical Comment:

Rösler C, Köck J, Malim MH, Blum HE, von Weizsäcker F. Comment on „Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G. Science 305, 3, September 2004.

Monographs of Virology Vol 25. "Models of Viral Hepatitis (Editors: Fritz von Weizsäcker, Freiburg, and Michael Roggendorf, Essen).

## **Abschlussbericht Teilprojekt 14.2**

**Projekttitlel:** Evaluation einer therapeutischen Vakzine für die chronische HCV-Infektion im trimären Mausmodell

**Projektleiter:** PD Dr. med. W. O. Böcher  
Johannes-Gutenberg-Universität  
I. Medizinische Universitätsklinik  
Langenbeckstr. 1  
55101 Mainz

**Telefon:** +49-(0) 6131-172 666

**Fax:** +49-(0) 6131-176 621

**E-Mail:** boecher@mail.uni-mainz.de

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

## I. Aufgabenstellung, Planung, Voraussetzungen und Ablauf des Vorhabens

Als Ursache für die Viruspersistenz bei chronischer Hepatitis C wird ein Virus-spezifischer B- und T-Zelldefekt angenommen [1]. Eine effiziente Steigerung dieser Immunantwort durch eine therapeutische Vakzinierung könnte also zur Virus-Elimination führen. Bisherige klinische Untersuchungen mit einer rekombinanten E1-Vakzine [2] oder einer Peptidvakzine [3] waren nur von begrenzter immunologischer und antiviraler Effizienz. Ziel des Projektes war daher die Etablierung und Nutzung des HCV-trimären Mausmodells als präklinisches Screening-Modell, um Vakzinekandidaten wie Modifizierte HCV-Vakzinia-vektoren (Typ Ankara; i.e. MVA), Protein-Antigene oder Peptide auf ihre therapeutische Wirksamkeit hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck bestand eine Vereinbarung mit der Fa. Bavarian Nordic, die die MVA-Vektoren konstruieren sollten, später aber aufgrund geänderter Firmeninteressen aus diesem Projekt ausgestiegen sind. Allerdings ist von einer britischen Arbeitsgruppe zwischenzeitlich eine klinische Studie zur Wirksamkeit einer Vakzination mit HBs-kodierenden MVA-Vektoren bei Patienten mit chronischer Hepatitis B durchgeführt worden, die zwar eine gewisse Immunstimulation belegt hat, aber keine nennenswerten virologische Ansprechraten [4]. Auch wenn eine direkte Übertragung auf die Situation bei der HCV-Infektion sicher nicht möglich ist, scheinen doch MVA-Vektoren nur von begrenzter therapeutischer Effizienz zu sein.

Zunächst mussten die administrativen Voraussetzungen geschaffen werden, um unter Gültigkeit von Infektionsschutzgesetz, Biostoffverordnung und Gentechnikgesetz in Tierstall und Labor mit diesem Infektionsmodell eines S3\*-Organismus arbeiten zu dürfen. Zudem mussten zusätzliche Gelder für Versuchstiere und Verbrauchsmittel eingeworben werden. Inzwischen sind all diese Voraussetzungen erfüllt, ein ärztlicher Mitarbeiter und die MTA sind in alle Techniken in vitro und in der Maus eingearbeitet und das Modell ist in Mainz bestens etabliert, so dass bereits einige experimentelle Ergebnisse vorliegen. Dabei profitierte das Projekt sehr von den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auf dem Gebiet der chronischen HBV-Infektion. Zudem besteht eine enge Kooperation mit Kollegen der Universitäten Freiburg (PD Dr. M. Geissler, PD Dr. T. Baumert) und Bonn (Prof. U. Spengler), die verschiedene Impfstoffkandidaten zur Verfügung stellen wie Virus-like-Particles (VLP) [5], Lipopeptide [6] oder Plasmide zur Transfektion in Zelllinien. Die Leberimplantate werden am Pathologischen Institut der Uniklinik Mainz (Prof.

Biesterfeld) beurteilt.

## **II. Ergebnisse, Nutzen und Fortschritt des Vorhabens**

Es sollen im Rahmen dieses Projektes zwei Ansätze in der trimären Maus zunächst getrennt etabliert und dann schliesslich in denselben Experimenten zusammengeführt werden: Das HCV-Infektionsmodell soll durch subrenokapsuläre Implantation von bioptisch gewonnenem humanem HCV-infiziertem Lebergewebe die Induktion einer zumindest passageren HCV-Replikation und damit -Virämie ermöglichen. In dem zweiten Ansatz sollen nach adoptivem Transfer humaner PBMC verschiedene Impfansätze auf ihre Immunogenität hin untersucht werden. Schliesslich soll die Vakzine mit der stärksten Immunogenität in dem kombinierten Ansatz auf ihre antivirale Effizienz hin untersucht werden.

Bezüglich des ersten Ansatzes wurden in ersten Experimenten je 4 bis 19 Mäuse von drei verschiedenen Spendern mit chronischer Hepatitis C implantiert. Zwischen 5 und 30 Tage nach Implantation konnte in 30 - 100% der Versuchstiere mittels real time PCR eine HCV-Virämie nachgewiesen werden. Die höchsten Virämie-Level und die meisten HCV-positiven Mäuse wurden dabei an den Tagen 15-25 gefunden. Da sich die Quantifizierung der HCV-RNA mittels rtPCR als schwierig gestaltete, wurden verschiedene quantitative Detektionsassays verglichen, wobei sich der bDNA-Assay der Firma Bayer Diagnostics als am zuverlässigsten und sensitivsten herausgestellt hat. Eine weitere Verbesserung des Infektionsmodells wurde durch Thymektomie der Empfängertiere erreicht, wodurch ein deutlich verbessertes und stabileres Engraftment sowie eine höhere Virämie erwartet werden. Auch erscheint die Architektur der Implantatleber besser erhalten. Die ersten Ergebnisse unter diesen optimierten Konditionen stehen derzeit aus.

Dem zweiten Ansatz folgend wurden von bisher drei chronischen HCV-Patienten und einer gesunden Kontrolle durch Leukapherese ausreichende Mengen an PBMC gewonnen, um jeweils ca. 40 Mäuse implantieren zu können. In solchen Tieren wurden dann verschiedene Vakzinationen getestet: Virus-like-Particles, die für die strukturellen Gene des HCV kodieren (i.e. E1, E2 und Core), rekombinantes NS3-Protein und eine Mischung aus Core-, E1-, E2- und NS3-Nonapeptiden, die bekannten HLA A2-restringierten CTL-Epitopen entsprechen. Dabei konnten v.a.

durch die Peptidvakzine hohe Frequenzen an E1/2-, Core- und NS3-spezifischen CTL induziert werden, die mittels Tetramer-Analysen wie auch IFN $\gamma$ -Elispot in den Zellen der Peritoneallavage nachweisbar waren. Auch der Impfansatz mit VLPs brachte eine Steigerung der Strukturprotein-spezifischen CTL-Frequenzen um Faktor 3 bis 4 im Vergleich zu den Kontroll-VLPs.

In den aktuellen Untersuchungen sollen weitere Impfansätze (HCV-Lipopeptide, Exosomen-beladene autologe Dendritische Zellen etc.) untersucht und quantitativ und qualitativ miteinander verglichen werden. Gegebenenfalls soll die Immunantwort durch verschiedene Adjuvantien (i.e. CpG-Oligonukleotide, IL-12, GM-CSF) modifiziert werden. Der Impfansatz mit der stärksten Th1- und CTL-induzierenden Potenz soll dann in dem Infektionsmodell auf seine antivirale Wirksamkeit hin untersucht werden. Durch Depletionsexperimente sollen die beteiligten Zellpopulationen und durch RNA-Array-Analysen die regulierten Gene herausgefunden werden, um die Mechanismen einer effizienten antiviralen Immunantwort in diesem Modell weiter zu charakterisieren.

Der Nutzen dieses Projektes könnte also in der Identifizierung klinisch weiter zu testender Impfstoffkandidaten sowie allgemein der an der Viruskontrolle beteiligten Mechanismen bestehen, woraus sich neue biologische HCV-Therapien ergeben könnten.

#### Literaturangaben

1. Bertoletti, A. and C. Ferrari, Kinetics of the Immune Response During HBV and HCV Infection. *Hepatology*, 2003. 38: p. 4-13.
2. Nevens, F., et al., A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003. 38: p. 1289-1296.
3. Manns, M., et al., Immunization with the therapeutic HCV peptide vaccine IC41 in 66 chronic hepatitis C non-responder patients. *Hepatology*, 2004. 40(S1): p. 251A.

4. McConkey, S., et al., Safety, immunogenicity and efficacy results of a phase II trial of therapeutic vaccines for chronic HBV in the Gambia. *Hepatology*, 2004. 40 (S1): p. 676A.
5. Baumert, T., et al., Hepatitis C virus like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology*, 1999. 117: p. 1397-1407.
6. Langhans, B., et al., Hepatitis C virus-derived lipopeptides differentially induce epitope specific immune responses in vitro. *J Infect Dis*, 2004. 189: p. 248-253.

### **Publikationen im Zusammenhang mit dem Projekt**

W.O. Böcher, Y. Reisner. The trimera mouse model of HBV and HCV infection. *Monogr Virol* 2005, in press.

M. Ali, C. Grimm, M. Ritter, L. Mohr, H.P. Allgaier, R. Weth, W.O. Böcher, K. Endrulat, H.E. Blum, M. Geissler. Activation of dendritic cells by local ablation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatology*, 2004, in press.

S. Tavakoli, W. Schwerin, A. Rohwer, S. Hoffmann, S. Weyer, R. Weth, H. Meisel, H. Diepolder, M. Geissler, P.R. Galle, H. F. Löhr and W.O. Böcher. Phenotype and Function of Monocyte derived Dendritic Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Gen Virol* 2004, 85: 2829-2836