

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 219–225

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. G. Wiedermann) (1)

Institut für Virologie der Universität Wien (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Ch. Kunz) (2)

Smith-Kline RIT, Rixensart, Belgien, Biological Division (3)

Aktive Immunisierung gegen Hepatitis B mit Hilfe eines gentechnologisch hergestellten Impfstoffes

F. Ambrosch¹, P. Kreamsner¹, Ch. Kunz², A. Safary³, G. Wiedermann¹

Einleitung

Die Infektion mit dem Hepatitis B-Virus kann nicht nur zu schweren akuten Verlaufsformen mit einer beträchtlichen Letalität führen, sondern auch zu gefährlichen Spätmanifestationen, wie der chronischen Hepatitis, der Leberzirrhose und dem primären Leberzellkarzinom.

In Westeuropa, in Nordamerika sowie in Australien beträgt die durchschnittliche Durchseuchung der Bevölkerung etwa 5%, wobei bestimmte Risikogruppen, vor allem Personen im Medizinalbereich, besonders betroffen sind.

In Osteuropa, den Mittelmeerländern, im Mittleren Osten und in Südamerika steigt die Durchseuchung auf etwa 50%, in Südostasien und Zentralafrika auf über 90%. Weltweit rechnet man mit 200 Millionen Trägern von HBs-Antigen. Mindestens 3 Millionen Menschen erkranken jährlich an Hepatitis B, etwa eine Million sterben entweder im akuten Stadium oder an chronischen Lebererkrankungen (SOBESLAVSKY 1978; AMBROSCH 1984).

Zur aktiven Immunisierung gegen die Hepatitis B wurde ein Impfstoff entwickelt, der das Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus (HBs-Antigen) enthält. Er führt zur Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern. Das HBs-Antigen wird aus dem Plasma von HBs-Trägern gewonnen und nach Reinigung mit verschiedenen Methoden inaktiviert. Anschließend erfolgt eine sorgfältige Prüfung am Schimpansen. Der Impfstoff hat sich bei zahlreichen Studien als sicher und wirksam erwiesen (MAUPAS et al. 1976; SZUMNESS et al. 1981; KUNZ et al. 1984).

Allerdings wirft der Plasmainpfstoff auch einige Fragen und Probleme auf. So gibt es trotz zum Teil mehrfacher Inaktivierung des HBs-Antigens und sorgfältiger Prüfung immer wieder Diskussionen über die potentielle Infektiosität des Impfstoffes, z. B. im Zusammenhang mit dem LAV/HTLV III-Virus. Die Kosten für die Herstellung und Prüfung sind naturgemäß sehr hoch, was sich im Preis des Impfstoffes niederschlägt. Schließlich ist die Quelle für die Gewinnung des HBs-Antigens, nämlich das Spenderreservoir, begrenzt und wird durch die Hepatitis B-Impfung auf Dauer gesehen sogar langsam trocken gelegt.

Man hat deshalb versucht, das HBs-Antigen mit gentechnologischen Methoden durch Einschleusung des entsprechenden Gens in prokaryonthe oder eukaryonthe Zellen zu gewinnen. Als besonders geeignet hat sich dabei die Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* erwiesen, die HBs-Antigen in ausreichenden Mengen exprimieren kann (HARFORD et al. 1983; McALEER et al. 1984; DeWILDE et al. 1985).

Ein auf diese Weise aus Hefezellen gewonnener Hepatitis B-Impfstoff, der sich im Tierversuch verträglich und wirksam erwiesen hat, wurde uns von Smith Kline-RIT (Rixensart, Belgien) zur weiteren Untersuchung übergeben. Wir führten mit diesem Impfstoff zunächst eine Pilotstudie zum Nachweis der Sicherheit und Immunogenität des Impfstoffes durch. Anschließend wurde in der Hauptstudie die Beziehung zwischen Antigendosis und Wirksamkeit im Vergleich mit dem Plasmainpfstoff untersucht.

Aufbau der Studie

Impflinge

Als Impflinge hatten sich Studenten der Medizinischen Fakultät Wien beiderlei Geschlechts zur Verfügung gestellt. Die Probanden waren entsprechend der Deklaration von Helsinki über den verwendeten Impfstoff und den Zweck der Studie informiert worden und hatten sich schriftlich zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt.

Vor Beginn der Studie wurden alle Probanden einer klinischen, laborchemischen und serologischen Untersuchung unterzogen. Personen mit akuten oder chronischen Erkrankungen, mit einer positiven Hepatitis B-Serologie (HBs, anti-HBs und/oder anti-HBc) sowie mit erhöhten Werten der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) wurden zurückgestellt. Die weiblichen Teilnehmer an der Studie führten ein kontrazeptives Programm durch.

Pilotstudie

Die Pilotstudie hatte den Zweck, die Unschädlichkeit und die Wirksamkeit des Impfstoffes beim Menschen prinzipiell zu untersuchen und zu sichern. Zur Untersuchung der Unschädlichkeit wurde an insgesamt 45 Personen zunächst ein Prick-Test durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Tröpfchen der Impfstoffpräparation mit einem HBs-Gehalt von 5 mcg/ml auf die Haut des linken Unterarms aufgebracht und die Haut durch das Tröpfchen mit einer sterilen Lanzette geritzt. Dieselbe Prozedur wurde vergleichsweise mit Histamin (1 mcg/ml) und physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Der Prick-Test wurde nach 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten abgelesen. Anschließend erfolgte eine intradermale Applikation von 0,1 ml Impfstoff mit 2 mcg bzw. 10 mcg HBs-Antigen/ml, wieder im Vergleich mit Histamin (0,01 mcg/ml) und Kochsalz. Die Reaktionen wurden nach 15, 30 und 60 Minuten sowie nach 24 und 48 Stunden kontrolliert.

Die Kontrolle der Verträglichkeit nach der intramuskulär durchgeführten Impfung mit 7 bzw. 28 mcg/ml erfolgte durch Selbstbeobachtung mit Hilfe eines Fragebogens.

Die Immunogenität wurde an insgesamt 61 Personen untersucht. Eine Gruppe von 7 Personen erhielt zunächst eine Impfung mit einer Impfdosis von 28 mcg, eine Gruppe von 30 Personen wurde dreimal mit einer Dosis von 7 mcg in den Monaten 0, 1 und 2 und eine weitere Gruppe von 24 Personen erhielt drei Impfungen in den Monaten 0, 1 und 6.

Hauptstudie

In der anschließenden Hauptstudie wurden insgesamt 262 Personen mit verschiedenen Dosen des Impfstoffes (5, 10, 20 und 40 mcg), verschiedenen Impfstoffpräparationen sowie zum Vergleich mit einem 20 mcg HBs-Antigen pro Impfdosis enthaltenden

Plasmainpfstoff (HB-Vax®) geimpft. Das angewandte Impfschema sah drei Impfungen im Abstand von jeweils 4 Wochen sowie eine abschließende Impfung im Monat 12 vor. Die Überprüfung der lokalen und allgemeinen Verträglichkeit erfolgte mittels Fragebögen durch Selbstbeobachtung der Impflinge. Blutabnahmen erfolgten 4 Wochen nach jeder Impfung. Die Bestimmung der HBs-Antikörper wurde mittels eines Festphasen-Radioimmunoassays (AUSAB Abbot) durchgeführt.

Ergebnisse

Pilotstudie

Bei keiner der 45 getesteten Personen kam es zu einer Reaktion auf den Impfstoff oder die Kochsalzlösung, während 30 Personen auf Histamin positiv reagierten.

Die interdermale Applikation von Histamin führte wie erwartet bei allen untersuchten Personen zu einer Erythembildung. Nach Anwendung des Impfstoffes oder des Placebos trat eine solche Reaktion jedoch nur in Einzelfällen auf (Tab. 1). Dabei zeigten sich innerhalb von einer Stunde keine Unterschiede zwischen Impfstoff und Placebo. Nach 24 und 48 Stunden fanden sich vereinzelt Rötungen in der Impfstoffgruppe.

TABELLE 1: **Intradermaltest**

Zeitpunkt der Ablesung	Anzahl der beobachteten Reaktionen			
	0,2 mcg (n = 23)		1,0 mcg (n = 22)	
	Impfstoff	Placebo	Impfstoff	Placebo
15 Minuten	2	2	1	1
30 Minuten	1	2	1	0
1 Stunde	0	0	0	0
24 Stunden	3	0	6	1
48 Stunden	1	0	4	0

Die Überprüfung der Immunogenität an Hand der Serokonversion (Tab. 2) ergab eine gute Antikörperbildung nach allen untersuchten Impfschemata, sogar nach einer einzigen Injektion von 28 mcg HBs-Antigen.

TABELLE 2: **Immunogenität** (Serokonversion > 1 mIU/ml)

Gruppe 1	4 / 5	80,0 Prozent
Gruppe 2	28 / 29	96,6 Prozent
Gruppe 3	20 / 24	83,3 Prozent

Hauptstudie

Zur genauen Feststellung der lokalen Verträglichkeit wurden die Symptome Schmerzhaftigkeit, Induration, Rötung und Schwellung über drei Tage registriert und mittels

eines Punktescores bewertet. Die maximale Punktezahl (TLSS) betrug 48 (Tab. 3). Es fanden sich insgesamt nur sehr geringfügige Reaktionen. Signifikante Unterschiede zwischen dem untersuchten Hefezellimpfstoff und dem Vergleichsimpfstoff traten nicht auf, ebensowenig Unterschiede zwischen den einzelnen Teilimpfungen.

TABELLE 3: Lokale Verträglichkeit

Gruppe	Präparation	Dosis	Personen	durchschnittlicher TLSS* nach		
				1. Impfung	2. Impfung	3. Impfung
1	B	5 mcg	40	2,28	2,90	1,97
2	C	5 mcg	16	0,81	1,70	1,47
3	B	10 mcg	40	1,54	1,75	4,44
4	C	10 mcg	18	3,72	3,61	2,27
5	B	20 mcg	29	2,39	3,30	2,57
6	C	20 mcg	19	2,10	1,89	1,89
7	H	10 mcg	9	2,88	3,77	1,62
8	B	40 mcg	19	5,42	5,31	3,63
9	H	20 mcg	13	1,76	2,69	0,90
10	MSD	20 mcg	59	0,97	1,23	1,51

*) TLSS = Total Local Symptoms Score (max. TLSS = 48)

Allgemeinreaktionen traten ebenfalls nur selten auf (Tab. 4), auch hier fanden sich weder zwischen den einzelnen Impfstoffgruppen noch hinsichtlich der einzelnen Teilimpfungen signifikante Unterschiede.

TABELLE 4: Allgemeine Verträglichkeit

Gruppe	Präparation	Dosis	Personen	Häufigkeit v. Allg.-Symptomen (%) n.		
				1. Impfung	2. Impfung	3. Impfung
1	B	5 mcg	40	15,0	10,0	5,1
2	C	5 mcg	16	37,5	5,9	17,6
3	B	10 mcg	40	15,0	12,8	10,5
4	C	10 mcg	18	0,0	5,6	5,6
5	B	20 mcg	29	17,2	13,8	10,7
6	C	20 mcg	19	15,8	10,5	15,8
7	H	10 mcg	9	11,1	22,2	0,0
8	B	40 mcg	19	5,3	5,3	5,3
9	H	20 mcg	13	15,4	15,4	0,0
10	MSD	20 mcg	59	33,9	19,0	10,3

Zur Beurteilung der Immunogenität wurde die Konversionsrate, das ist der Anteil der Impflinge mit einem protektiven Antikörpertiter von mindestens 10 IU/ml (FRISCH-NIGGEMEYER et al. 1986) sowie der mittlere geometrische Titer in den einzelnen Impfgruppen 4 Wochen nach der dritten Impfung berechnet (Tab. 5). Die Konversionsrate zeigte praktisch keine Abhängigkeit von der verwendeten Impfstoffdosis, aber offenbar von der jeweiligen Präparation. Am besten schnitt dabei die Präparation H ab.

TABELLE 5: Immunogenität

Gruppe	Präparation	Dosis	Personen	1 Monat nach der 3. Impfung (0, 1, 2)	
				Konversionsrate (>10mIU/ml)	mittlerer geometr. Titer
1	B	5 mcg	40	92,3%	94,1
2	C	5 mcg	16	87,5%	52,1
3	B	10 mcg	40	94,3%	98,2
4	C	10 mcg	18	87,5%	38,5
5	B	20 mcg	29	93,7%	189,1
6	C	20 mcg	19	87,5%	91,5
7	H	10 mcg	9	100,0%	194,4
8	B	40 mcg	19	87,5%	314,0
9	H	20 mcg	13	100,0%	297,1
10	MSD	20 mcg	59	94,4%	1.012,0

Hingegen hatten sowohl die Impfstoffdosis als auch die jeweilige Präparation einen deutlichen Einfluß auf den mittleren geometrischen Antikörpertiter. Am besten schnitt hier wiederum die Präparation H in der Dosierung von 20 mcg ab, die dem Vergleichs-impfstoff am nächsten kam.

Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß dieser erste mit Hilfe von gentechnologischen Methoden aus Hefezellen gewonnene Impfstoff eine ausgezeichnete und dem Plasmaimpfstoff vergleichbare lokale und allgemeine Verträglichkeit aufweist. Beim Vergleich verschiedener Teilimpfungen ergab sich keine Zunahme der beobachteten Lokal- und Allgemeinreaktionen, was das Fehlen von allergisierenden Substanzen bestätigt.

Auch die Immunogenität des untersuchten Impfstoffes ist der des Plasmaimpfstoffes durchaus vergleichbar, was sich in einer durchschnittlichen Konversionsrate von 92,3% gegenüber jener des Vergleichs-impfstoffes von 94,4% zeigt. Lediglich der mittlere geometrische Antikörpertiter nach der dritten Impfung ist mit rund 300 mIU/ml bei einer Impfstoffdosis von 20 mcg der Präparation H etwas niedriger als der des Vergleichs-impfstoffes mit rund 1000 mIU/ml. Es ist aber anzunehmen, daß sich die Titer nach der abschließenden 4. Impfung im Monat 12 einander annähern werden. Außerdem soll in einer weiteren Studie untersucht werden, ob sich die Immunogenität durch spezielle Präparationsmethoden über die des Plasmaimpfstoffes hinaus verbessern läßt.

Zusammenfassung

Eine von Smith Kline-RIT durch gentechnologische Methoden aus Hefezellen (*Sacharomyces cerevisiae*) gewonnener Impfstoff gegen die Hepatitis B, der HBs-Antigen in gereinigter Form enthält, wurde auf Verträglichkeit und Immunogenität untersucht.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Pilotstudie an 61 Probanden durchgeführt. Dabei zeigte sich eine gute lokale und allgemeine Verträglichkeit sowie eine ausreichende Immunogenität des Impfstoffes.

In der anschließenden Hauptstudie wurden 262 Probanden in den Monaten 0, 1, 2 und 12 mit verschiedenen Dosen (5, 10, 20 und 40 mcg) und Präparationen des Hefezellimpfstoffes sowie vergleichsweise mit 20 mcg eines aus Plasma gewonnenen Impfstoffes (HB-Vax[®], Merck Sharp und Dohme) immunisiert. Die lokale und allgemeine Verträglichkeit entsprach der des aus Plasma hergestellten Impfstoffes, ebenso die Konversionsrate. Der mittlere HBs-Antikörpertiter in den einzelnen Gruppen vier Wochen nach der dritten Impfung war von der verwendeten Impfstoffdosis sowie von der jeweiligen Präparation abhängig. Dem Plasmainpftstoff am nächsten kam die Präparation H mit einer Impfstoffdosis von 20 mcg. Die Untersuchungen sollen fortgesetzt werden.

Summary

Active immunization against hepatitis B with a recombinant DNA vaccine

A recombinant DNA hepatitis B vaccine produced from yeast cells (*Sacharomyces cerevisiae*) by Smith Kline-RIT containing purified HBs antigen was investigated with respect to tolerability and immunogenicity. As a first part of the investigation a pilot study was conducted on 61 volunteers showing that the vaccine induced only a few and minor local or generalised reactions and was found to be immunogenic.

In the following main study 262 volunteers were immunized with different doses (5, 10, 20, 40 mcg) and different preparations of the vaccine and "comparatively" with 20 mcg of plasma derived vaccine (HB-Vax[®] Merck, Sharp and Dohme). Local and generalised reactions as well as seroconversion rates were comparable to the plasma derived vaccine. The geometric mean of anti-HBs Titer was dependant on the dose and on the particular lot of the vaccine. Lot H with a dose of 20 mcg HBs antigen was approaching very near to the values of the plasma derived vaccine. The further investigation of the vaccine is to be pursued.

Literatur

- McALEER, W. J., BUYNAK, E. B., MAIGETTER, R. Z., WAMPLER, D. E., MILLER, W. J., HILLEMANN, M. R. (1984): Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307, 178–180.
- AMBROSCH, F. (1984): Active and passive immunization against viral hepatitis. *Symp. Viral Hepatitis, Baghdad* (im Druck).
- FRISCH-NIGGEMEYER, W., AMBROSCH, F., HOFMANN, H. (1986): The assessment of immunity against hepatitis B after vaccination. *J. Biol. Stand.* (im Druck).
- HARDFORD, N., CABEZON, T., CRABEEL, M., SIMOEN, E., RUTGERS, A., DE WILDE, M. (1983): Expression of hepatitis B surface antigen in yeast. *Develop. biol. Stand.* 54, 125–130.
- KUNZ, Ch., HOFFMAN, H., FRISCH-NIGGEMEYER, W. (1984): Erfahrungen mit der Impfung gegen Hepatitis B., *Wien. Klin. Wschr.* 96, 158–161.

- MAUPAS, Ph., GOUDEAU, A., COURSAGET, P. (1978): Hepatitis B-vaccine. Efficacy in a high risk setting, a two year study. *Intervirology* 10, 196–208.
- SOBESLAVSKY, O. (1980): Prevalence of markers of hepatitis B virus infection in various countries: a WHO collaborative study. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 58, 621–628.
- SOBESLAVSKY, O. (1978): HBV as a global problem, in VYAS, G. N., COHEN, S. N., SCHMID, R. (Hsgb): *Viral Hepatitis*, Franklin Institute Press, Philadelphia, 1978.
- SZMUNESS, W., STEVENS, C. E., ZANG, E. A., HAREY, E. J., KELLNER, A. (1981): A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis b vaccine (Heptavax B): A final report. *Hepatology* 1, 377–385.
- DE WILDE, W., CABEZON, T., HARFORD, N., RUTGERS, T., SIMOEN, E., Van WIJNENDALE, F. (1985): Production in yeast of hepatitis B surface antigen by R-DNA technology. *Develop. biol. Stand.* 59, 99–107.

KORRESPONDENZADRESSE

Univ.-Doz. Dr. Franz Ambrosch
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin
Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1986

Band/Volume: [8](#)

Autor(en)/Author(s): Ambrosch Franz, Kreamsner Peter Gottfried, Kunz Ch., Safary A., Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Aktive Immunisierung gegen Hepatitis B mit Hilfe eines gentechnologisch hergestellten Impfstoffes. 219-225](#)