

Fan Yang

Dr. sc. hum

**Re-engineering a Nanoparticle Human Papillomavirus Prophylactic Vaccine
Antigen Based on the Minor Capsid Protein L2**

Fach/ Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvator: Professor. Dr. Frank Rösl

Über 200 verschiedene Arten von humanen papillomaviren (HPV) wurden anhand ihrer DNA-Sequenzen identifiziert. Einige von ihnen sind in hohem Maße mit der Entstehung von Krebs verbunden, wie HPV16 und 18, die für 70% der Gebärmutterhalskrebses auf der Welt verantwortlich sind. Dreizehn weitere onkogene HPVs sind ebenfalls mit Gebärmutterhalskrebs verbunden. HPV-Infektionen sind auch in hohem Maße mit Analkrebs, Peniskrebs und anderen Krankheiten (z.B. Kopf- und Halskrebs) assoziiert. Es gibt derzeit drei prophylaktische HPV-Impfstoffe, die alle aus virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) auf Basis des HPV major capsid protein L1 bestehen. Sie sind nachweislich sicher und hoch immunogen, aber sie sind HPV-typenspezifisch. Sie benötigen alle mindestens zwei oder drei Verabreichungen, was zu einer geringen Impfungskonformität führt. Außerdem sind die Impfstoffe hochpreisig, was bedeutet, dass die meisten Entwicklungsländer nur schwer von ihnen profitieren könnten. All diese Mängel trieben die Entwicklung der zweiten Generation des prophylaktischen HPV-Impfstoffs voran. Das Nebenkapsidprotein L2 enthält im Gegensatz zum major capsid protein L1 Kreuzneutralisationsepitope, die Kreuzschutzreaktionen hervorrufen können, aber die Immunogenität von L2 ist gering, da das Kreuzneutralisationsepitop linear ist. Ehemalige Kollegen zeigten, dass die Einführung des Kreuzneutralisationsepitops (aa20-38) von L2 in *Pyrococcus furiosus* Thioredoxin (Pf Trx) die Immunogenität von L2 stark erhöht

und die Produktion von neutralisierenden Antikörpern induzieren kann. Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von kreuzschützenden L2-basierten HPV-Nanopartikel-Impfstoffen. Zu diesem Zweck haben wir 1) das beste Adjuvans für die Nanopartikelantigene überprüft; 2) die Rolle von Pf Trx im Nanopartikelantigen identifiziert; 3) den besten Nanopartikelantigenkandidaten bestimmt; 4) den Einfluss der durch die Nanopartikelplattform induzierten Antikörper auf die Produktion neutralisierender Antikörper bestimmt; 5) die effektive Nanopartikel-Antigendosis definiert; 6) die Immunogenität von Nanopartikel-Antigenen *in vivo* nachgewiesen; und (7) die Immunrelation zwischen Pf-ferritin und menschlichem ferritin bewertet.

Pyrococcus furiosus ferritin und encapsulin wurden als Nanopartikelplattformen eingesetzt, um die trimeren und multimeren L2-Epitope mit/ohne Trx zu tragen und darzustellen. Es wurden korrekt zusammengesetzte und uniformierte Nanopartikelantigene hergestellt, mit Ausnahme der multimeren L2-Epitope, in die Pf-Kapsulin eingesetzt wurden.

Das beste Adjuvans für Pf-Kapsulin ist Alum-MPLA, das beste Adjuvans für Pf-ferritin ist AddaVax, aber wir konnten auch ohne Adjuvans nachweisen, dass Pf-ferritin-basierte L2-Prophylaxe-Impfstoffe selbst-adjutant wirken. Und die Nanopartikel-Antigene mit Pf thioredoxin stellten eine wichtig funktionell für die beiden Nanopartikel-Antigene da, indem sie bei Mäusen viel höhere Reaktionen hervorriefen als bei Konstrukten, die kein Pf Trx enthielten. Das Nanopartikel Pf-ferritin, das mit acht verschiedenen durch Pf Trx angezeigten HPV L2-Epitopen (Pf-ferritin-Trx-HPVL2(aa20-38)*8) fusioniert ist, wurde als bester Kandidat identifiziert. Es konnte hohe Titer zur Neutralisierung von Antikörpern gegen 13 hoch riskante HPVs und HPV6 induzieren die in einer PBNA getestet wurden. Darüber hinaus wurde die Kapazität der neutralisierenden Antikörper, die durch das Nanopartikelantigen Pf ferritin-Trx-HPVL2(aa20-38)*8 induziert wurden, in einem *in vivo* zervikal-vaginalen Challenge-Tiermodell überprüft. Durch Verfolgung der Antikörperveränderungen entlang der Impfungen fanden wir

heraus, dass die drei Dosen effizient sein würden, um hohe Titer von Antikörpern zu induzieren.

Experimente, die den Einfluss der Pf-ferritin-Plattform auf die Immunantwort untersuchten, zeigten, dass bereits vorhandene Anti-Pf-ferritin-Antikörper die Induktion der L2-spezifischen neutralisierenden Antikörperproduktion behinderten. Behinderten serologische Experimente bestätigten, dass die von den Nanopartikel-L2-Antigenen produzierten Antikörper das menschliche ferritin nicht angreifen konnten.

Insgesamt erwies sich Pf ferritin-Trx-HPVL2(aa20-38)*8 als hervorragender Kandidat für die Präsentation von Epitopen, die hohe Titer neutralisierender Antikörper hervorrufen konnten, die *in vitro* und *in vivo* wirksam waren.