

Narges Seyfizadeh

Dr. sc. hum.

## **Immunotherapy Development to Target Herpes Simplex Virus Infections**

Fach/Einrichtung: Immunologie/NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Jurgen Krauss

Die klinische Manifestation und Pathogenese von Herpes Simplex Virus (HSV) Infektionen hängt hauptsächlich von Faktoren wie dem primären Ort der Infektion, dem Alter und Immunstatus des Wirts sowie dem HSV Typ ab. In der Regel nimmt die Inzidenz und Schwere der Infektion bei immunkompetenten Populationen mit antiviralen Standardtherapien (z.B. Acyclovir/Valacyclovir oder Penciclovir/Famciclovir) ab. Allerdings werden bei immungeschwächten Patienten, Empfängern von Stammzell-Transplantationen und HIV/HSV Co-Infizierten, durch herkömmliche Therapien die mit zunehmender Dauer der Therapie resistente HSV Stämme zu induziert. Daher ist die Erforschung neuer anti-HSV Therapien, denen neue Wirkmechanismen zugrunde liegen, dringend nötig. Hinzu kommt, dass das Ergebnis konventioneller Standardtherapien oftmals weder lang anhaltend noch sehr effektiv ist. Antikörper Immuntherapien haben gezeigt, dass sie sowohl zur Behandlung als auch zur Vorbeugung viraler Infektionen geeignet sind. Vieles deutet darauf hin, dass neutralisierende Antikörper sowohl vor Herpes Simplex Viren schützen, als auch den Krankheitsverlauf in in vivo Experimenten verbessern. Dies verspricht eine potenzielle Zukunft der Antikörper als Therapie bei HSV Infektionen. In Anbetracht der Tatsache, dass stets die Möglichkeit einer HSV Resistenzbildung gegenüber einer bestimmten Therapie besteht, gibt es auch weiterhin Bedarf an neuen monoklonalen Antikörpern mit erhöhter Effektivität und längerem Schutz. Das Ziel dieser Arbeit war es, komplett humanisierte therapeutische IgGs gegen Glykoprotein B des HSV als neue Antikörper Therapie zu entwickeln.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden komplett humane gB-spezifische single chain Fv Fragmente (scFv) aus Antikörper Libraries, welche aus Lymphknoten von Kopf- und Nacken-Krebs Patienten generiert worden waren, selektiert. In diesem Projekt sollte das Potential einer Auswahl an Antikörpern als zukünftige Therapiemöglichkeit für Patienten mit HSV Infektionen getestet werden. Dazu wurden die ausgewählten scFv Fragmente in IgG Moleküle re-formatiert und produziert, um in Folge dessen durch funktionelle in vitro und in vivo Experimente charakterisiert zu werden.

Die Antigen Spezifität der Antikörper gegen HSV-1/2 wurde mittels Zell-assoziiierter HSV-Glykoproteine (in Form infizierter Vero Zellen) bestimmt. Die EC50 Werte der Bindung von H4 und H28 an HSV-1 F- bzw. HSV-2 G-infizierte Vero Zellen betrug 8,5 und 6,7 nM (HSV-1 F) bzw. 10,9 und 9,95 nM (HSV-2 G), respektive. Darüber hinaus wurden die neutralisierenden

Eigenschaften der Antikörper bezüglich freiem Virus und der viralen Zell-zu-Zell Transmission getestet. Hierbei ergab die Analyse mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine komplette Inhibition der Zell-zu-Zell Transmission für die gB (HSV) spezifischen monoklonalen Antikörper H4 und HDIT101 (bei 75µg/ml). Im Gegensatz zu IgG H4 zeigte IgG H28 für keine der getesteten Konzentrationen bis 75µg/ml eine effektive Reduktion von Plaques, was die limitierte neutralisierende Wirkung dieses Antikörpers auf freien Virus bestätigt.

Um die Epitope der untersuchten Antikörper zu bestimmen, wurden Antikörper-resistente Mutanten *in vitro* gezüchtet und mit Hilfe dieser, die Antikörper auf ihre Bindungsfähigkeit an die Mutanten und ihre neutralisierende Wirkung in Bezug auf freien Virus sowie die Zell-zu-Zell Transmission hin untersucht. Die ausgebildeten Resistenzen des HSV-1 F gegen die Antikörper H4 und HDIT101 zeigten sich in Form von Mutationen der Aminosäuren R335Q im Fall des H4 Antikörpers und R304Q für HDIT101. Anhand der Daten aus kompetitiven Bindungs-Assays und den unterschiedlichen Aminosäure Substitutionen der resistenten Virus Stämme lässt sich schließen, dass H4 und H28 unterschiedliche Epitope auf gB besitzen, welche sich auch von den Epitopen des IgG HDIT101 unterscheiden. R304Q und R335Q stellen jeweils essentielle Aminosäuren der Epitope für HDIT101 bzw. H4 dar. Um die Antikörper weiter zu charakterisieren, wurde außerdem mit Hilfe infizierter Vero Zellen und stabil gB-exprimierender HEK293T Zellen die Fc Effektor Funktionen (ADCC, CMC und ADCP) getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass alle gB-spezifischen Antikörper H4, H28 und HDIT101 in der Lage sind, ADCP Aktivität zu induzieren, während ADCC oder CMC Aktivität nicht festgestellt werden konnten. Die beiden gB(HSV)-spezifischen monoklonalen Antikörper H4 und HDIT101 neutralisieren HSV-1F/2G mit vergleichbarer Effektivität und zudem unabhängig vom Komplementsystem.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die hohe Affinität, Spezifität und eine hohe neutralisierende Wirkung der gB(HSV)-spezifischen monoklonalen Antikörper (HDIT, H4) *in vitro* und *in vivo*, diese als vielversprechende Kandidaten für eine HSV Therapie auszeichnen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine potenzielle Translation der charakterisierten vollhumanen Antikörper in die Klinik und somit für einen neuen Weg HSV Infektionen zu bekämpfen.