

Blutgerinnungsfaktor X vermittelte Vektor-Wirt-Interaktionen von PEGylierten Adenovirus Typ 5 basierten Genvektoren

Daniel Pembaur, Georgia Koukou, Natascha Schmidt, Franziska Jönsson, Florian Kreppel

Einleitung

Adenovirus-basierte Genvektoren sind die derzeit am häufigsten verwendeten Genvektoren in klinischen Studien und nehmen auch eine Schlüsselrolle in der Impfstoffentwicklung zur Bekämpfung der SARS-CoV-2-Pandemie ein. Trotzdem müssen noch herausfordernde Barrieren überwunden werden. Neben der starken Immunogenität ist ebenfalls der durch den Blutgerinnungsfaktor X vermittelte Hepatotropismus eine der Hauptbarrieren, die überwunden werden müssen, um Adenoviren als effiziente Genvektoren zu verwenden. Um diese ungewollten Vektor-Wirt-Interaktionen zu vermeiden, wurden die Vektoren in dieser Arbeit mit einem geneti-chemischen Ansatz spezifisch am Hexon-Protein PEGyliert. Die PEGylierung soll als Schutzschild gegen die unerwünschten Vektor-Wirt-Interaktionen wirken und eine Bindung von Faktor X an das Viruskapsid verhindern.

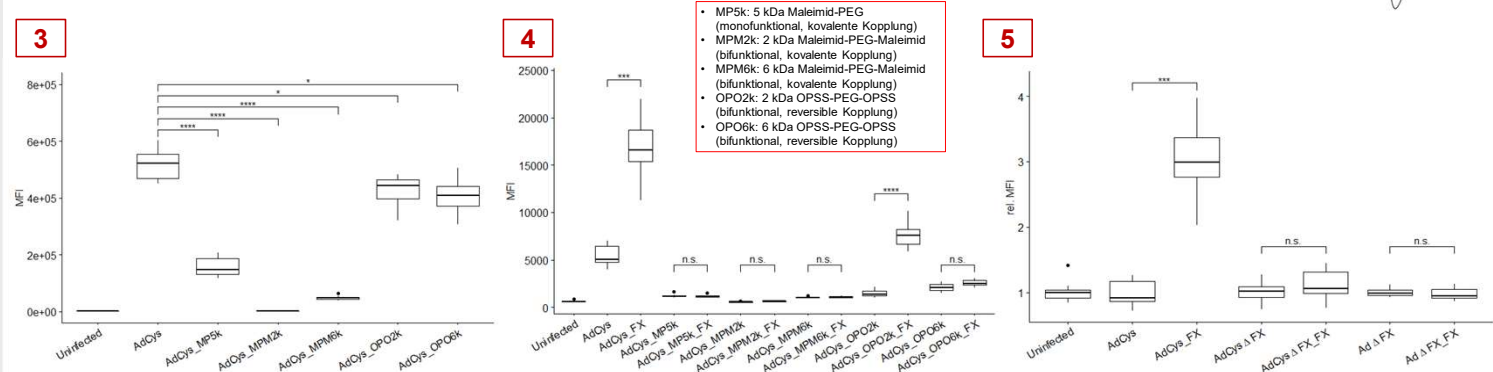
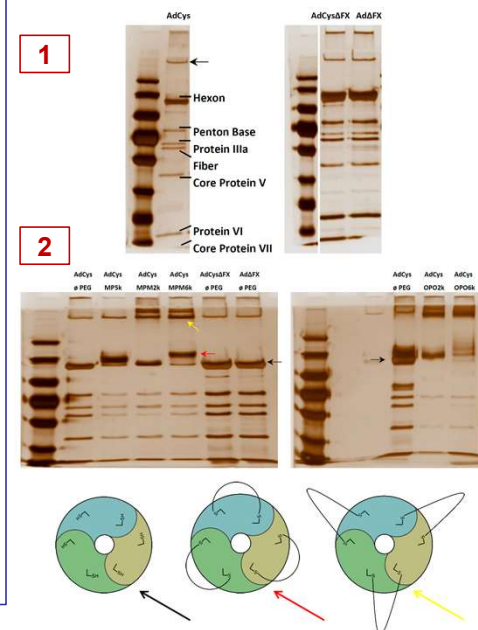
Zielsetzung

- Herstellung und Polyethylenglykol-Kopplung (PEGylierung) von Adenovirus-basierten Genvektoren zum Schutz vor unerwünschten Vektor-Wirt-Interaktionen
- Chemische (SDS-PAGE) und biologische (*in vitro*) Analyse der Vektoren
- Analyse der Faktor X vermittelten Transduktionseffizienz (*in vitro*) und Vergleich zwischen PEGylierten und Faktor-X-Bindungsdefizienten Vektoren

Ergebnisse

Alle Vektoren enthalten eine EGFP-Expressionskassette, wodurch die Transduktionsrate in den *in vitro* assays per Durchflusszytometrie bestimmt werden konnte.

- (1) Δ FX Vektoren konnten durch Bacmid-Klonierung und Transfektion der Vektor-DNA in HEK293 Zellen hergestellt werden. Durch serielle Amplifikation und Aufreinigung via CsCl-Stufengradient konnten Vektor-Titer von bis zu $1,23 \cdot 10^9 \frac{VP}{\mu l}$ bzw. $9.225 \frac{VP}{Produktionszelle}$ erreicht werden. Die Reinheit der Vektoren wurde mittels SDS-PAGE gezeigt.
- (2) Übernacht PEGylierung der Vektoren resultierte in Kopplungseffizienzen $> 90\%$. Die PEGylierung mit bifunktionalen PEGs resultierte in einem heterogenen Bandenmuster, das auf potentielle Monomere und Dimeren hinweist. Sowohl kovalente (MP5k/MPM2k/MPM6k) als auch reversible (OPO2k/OPO6k) Kopplungen waren erfolgreich.
- (3) Die Transduktionseffizienz der Vektoren in A549 Zellen zeigte stark verringerte Effizienzen bei kovalent PEGylierten Vektoren, während bei reversibel PEGylierten Vektoren $\sim 80\%$ der Transduktionseffizienz erhalten blieb.
- (4) Eine Faktor X-abhängige Transduktion der PEGylierten Vektoren in SKOV-3 Zellen zeigte im Gegensatz zur nicht-PEGylierten Kontrolle keine Unterschiede in An- bzw. Abwesenheit von Faktor X (außer bei OPO2k).
- (5) Ebenso wiesen die Δ FX-Vektoren keine Faktor X abhängigen Unterschiede auf.



Zusammenfassung

- Adenovirus-basierte Genvektoren wurden zu hohen Titern bis zu $1,23 \cdot 10^9 \frac{VP}{\mu l}$ bzw. $> 8.000 \frac{VP}{Produktionszelle}$ hergestellt und mit Effizienzen von $> 90\%$ PEGyliert
- Je nach PEGylierung wurden 0,4 - 82 % der generellen Transduktionseffizienz beibehalten
- *In vitro* assays zeigten, dass PEGylierung (bis auf OPO2k-PEGylierung) vor Faktor X vermittelter Transduktion ebenso schützt wie eine genetische Faktor X-Bindungsdefizienz.

Ausblick

Analyse weiterer Vektor-Wirt Interaktionen. Diese beinhalten: Erythrozytenbindungen, Inaktivierung durch Komplement und IgMs und Neutralisierung durch IgGs. Es wird erwartet, dass die PEGylierten Vektoren dort bessere Eigenschaften aufweisen als die Faktor X-Bindungsdefiziente Vektorvariante.