

## DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG

### Wirksamkeit verschiedener gängiger Carrier für die Immunogenität synthetischer Peptide

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bereitstellung einer umfassenden Studie zur effizienten Erzeugung von Anti-Peptid-Antikörpern für Forschung und Diagnostik.

Gestern “Genomics”, heute “Proteomics” - so könnte man die derzeitige biowissenschaftlichen Forschung überschreiben. Im Rahmen einer Vielzahl von Genomprojekten wurden und werden riesige Mengen von Sequenz-Informationen gesammelt. Der Forschungsfokus bewegt sich dabei weg von der reinen Informationsammlung hin zur Funktionsaufklärung. Die “Information”, also die DNA-Sequenz, codiert für eine “Funktion”, in der Regel ein Protein. Ein wichtiges Instrument für diese Funktionsaufklärung sind Anti-Peptid-Antikörper.

Hochspezifische mono- oder polyklonale Antikörper finden Verwendung in einem sich ständig verbreiternden Spektrum von Fragestellungen: zelluläre Lokalisation von Peptiden und Proteinen; Charakterisierung und Identifizierung funktionsverwandter Proteine; Identifikation der Aktivitätszentren in Enzymen und Aufklärung von Rezeptorfunktionen; expressionsseitiger Nachweis von Frame-Shift- oder Mutationsereignissen und Analyse des “Exon-Usage”; Differenzierung von Protein-Domänen oder Isoenzymen; Aufklärung proteolytischer oder post-translationaler Prozesse.

Neben ihrer Verwendung in der Funktionsaufklärung von Proteinen, spielen Peptid-spezifische Antikörper eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Impfstoffen und Immunoassays oder ermöglichen “catch purifications” in der Immunoaffinitäts-Chromatographie.

Die Erzeugung von Antikörpern mittels synthetischer Peptide hat eine Reihe von Vorteilen. So lassen sich Antikörper spezifisch für Proteine erzeugen, von denen die DNA-Sequenz lediglich ganz oder teilweise bekannt ist, die aber selbst noch nicht isoliert bzw. aufgereinigt wurden. Sequenzpolymorphismen lassen sich im Handumdrehen durch synthetische Peptide nachmodellieren. Synthetische Peptide können Antikörper gegen Protein-Epitope stimulieren, die bei Immunisierung mit dem ganzen, nativen Protein nicht induziert werden. Toxische Proteine können in Form nicht-toxischer Peptidfragmente eingesetzt werden. Und schließlich geht die Erzeugung synthetischer Peptide und ihrer korrespondierenden Antikörper schlicht und einfach sehr schnell.

Synthetische Peptide sind in der Regel nur schwach immunogen, d.h sie eignen sich nur bedingt zur Induktion von Antikörpern. Um die Immunogenität von Peptid-Antigenen zu erhöhen, werden üblicherweise Adjuvantien und Trägerstrukturen ("Carrier") eingesetzt. Die Wirkung letzterer beruht vor allem auf Komplexierung des Antigens und - bei Protein-Carriern - auf der Bereitstellung von T-Zell-Epitopen. Auffallend ist aber, daß eine befriedigende vergleichende Gegenüberstellung der gängigen Methodik nicht existiert.

Im Rahmen dieser Studie wurden 3 Epitope aus Pathogenitätsfaktoren von *Neisseria meningitidis* als synthetische Peptid-Antigene dargestellt und die Wirksamkeit verschiedener Trägerstrukturen ("Carrier") bzw. Immunogen-Formulierungen für die immunostimulatorische Potenz dieser Peptide vergleichend untersucht.

Die Peptidantigene, ein 20 Aminosäuren langes Motiv aus Opc Invasin, sowie ein 20- und ein 50-mer aus Serogruppe C bzw. Serogruppe A IgA1-Protease, wurden durch Festphasen-Peptidsynthese erzeugt. C- bzw. N-terminal Cystein-modifizierte Peptide wurden an die Protein-Carrier Bovines Serumalbumin, Ovalbumin, Keyhole Limpet Hämocyanin, Thyroglobulin und Tetanus Toxoid gekoppelt. Aminoxyacetyl-Derivate der Peptide wurden mit Hilfe ringförmiger aktivierter "Templates" zu Tetra-Oximen kondensiert. Als Trägerstruktur kamen ferner Liposomen zum Einsatz und die beiden 20-meren wurden als "Multiple Antigenic Peptides" (MAPS) dargestellt.

Die Synthese dieser Peptid-Immunogene wurde durch ihre molekulare Charakterisierung begleitet. Hierbei wurden Massenspektrometrie, Amino Acid Analysis (AAA) und chromatografische Methoden herangezogen. Die Sekundärstruktur des 50-mers wurde zudem mittels Circular Dichroism (CD) analysiert.

Die Immunogenität der verschiedenen Peptid-Formulierungen wurde im Balb/c Maus-Modell evaluiert. Hierzu wurden die Tiere 3 mal in Abständen von 14 Tagen mit hinsichtlich ihrer Antigen-Konzentration normalisierten Peptid-Formulierungen immunisiert. Mit Ausnahme der Liposomen, wurden die Injektionen als Emulsionen in 50% Freund's Complete bzw. Incomplete Adjuvants und PBS appliziert. In drei ausgewählten Formulierungen wurden darüber hinaus die Cytokine IL-4 und GM-CSF als Adjuvantien getestet.

Die murine Immunantwort wurde durch die Messung zweier immunologischer Parameter erfaßt: i) Subklassen-spezifische Konzentration der Serum-Antikörper (ELISA) und, auf zellulärer Ebene, ii) Stimulation von B-Lymphozyten in der Milz (ELISPOT). Abhängig von der Art der Immunogen-Formulierung wurden dabei erhebliche Unterschiede in der Immunogenität der verschiedenen Peptid-Immunogene beobachtet.

Die getesteten Protein-Carrier untermauerten ihren Ruf als unkomplizierte und verlässliche Methode zur Steigerung der Immunogenität synthetischer Peptide. Peptid/Protein-Konjugate erwiesen sich in den verwendeten niedrigen Dosierungen von 200 pmol Peptid bzw. ab 2.2 µg Konjugat pro Injektion als durchweg immunogen. Bereits eine statistische Kopplungsrate von 1,4 Peptiden pro Carrier-Molekül zeigte eine starke immunostimulatorische Wirkung, wie an einem Ovalbumin-Konjugat gezeigt werden konnte. Allerdings wiesen die Protein-Carrier Unterschiede in ihrer

immunostimulatorischen Potenz auf. Ein hohes Molekulargewicht des Carrier-Proteins, resultierend in hohen Peptid-Kopplungsraten, erwies sich als günstig: Limpet Hämocyanin, Thyroglobulin und Tetanus Toxoid waren wesentlich immunogener als Bovines Serum Albumin oder Ovalbumin. Vor diesem Hintergrund erscheint eine kritische Neubewertung des Einsatzes von BSA und Ovalbumin als Standard-Reagenzien in Peptid-Immunisierungen notwendig.

In der vergleichenden Analyse der verschiedenen Protein-Carrier offenbarten die untersuchten Peptid-Antigene unterschiedliche Carrier-Präferenzen. Bedingt durch diese kontextabhängige Immunogenität empfahl sich keiner der untersuchten Protein-Carrier als "Methode der Wahl".

Der Einsatz Protein-freier Carrier (Liposomen, MAPs, Tetra-Oxime) führte nur dann zu einer Verstärkung der immunostimulatorischen Potenz des Peptid-Antigens, wenn das Peptid bereits *per se* immunogen war. Im Falle des 50 aa langen Peptides IgA1-PA50, das bereits als freies Peptid eine starke IgG-Antwort stimulierte, bewirkte der Einsatz von Liposomen und Tetra-Oximen eine deutliche Immunogenitätssteigerung. Dabei erzielte in Form synthetischer Tetra-Oxime verabreichtes 50-mer eine mit Ovalbumin- und BSA-Konjugaten vergleichbare immunostimulatorische Wirkung. Der auffallenden intrinsischen Immunogenität des 50 aa Peptids wurde mit Strukturaufklärung und einem "T cell epitope mapping" nachgegangen. In CD-Studien wurden in wässriger Lösung hohe Anteile stabiler  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -Turn Strukturen beobachtet, die sich mit 100% Reversibilität aufschmelzen ließen. Zwar konnten potentielle humane T-Zell Epitope identifiziert werden, murine Balb/c T-Zell Epitope ließen sich aber nicht bestätigen.

Interleukin-4 (IL-4) und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) wurden als Adjuvantien getestet. Sie hatten aber nur geringe und auch keine einheitliche Wirkung auf die Immunogenität der getesteten Peptid-Antigene.