This project has received funding from the Eurostars-2 joint programme with co-funding from the European Union Horizon 2020 research and innovation programme

Sachbericht zum Vorhaben

„Identifizierung und Validierung von Vakzin-Epitopen“

im Rahmen des Eurostars Projekts

E! 114695 SVEET

„Exploration und Translation modifizierter, glykosylierter Vakzine Epitope“

Nicolas Delaroque

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI
Perlickstr. 1, 04103 Leipzig

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Förderkennzeichen: 01QE2109C
Projektlaufzeit: 01.04.2021 – 30.04.2024

Das finale Ziel des EUROStars Projekts ist ein Impfstoff auf Basis spezieller Herstellungsmethoden des Partners GlyProVac (P1) für gezielt glykosylierte Impf-Antigene am Beispiel von Harnwegsinfektionen durch Darmbakterien (*E. coli*). Das Fraunhofer IZI (P2) wird zusammen mit der epitopic GmbH (P3) einen Nachweis von Antikörpern selektiv gegen Glykosylierungen bzw. deren im Falle der Abwesenheit zugänglichen Peptid-Epitope etablieren. Dabei sollen Verfahren entwickelt werden, die die gezielte und routinemäßige Identifizierung erlauben.

Durchgeführte Arbeiten

Das Fraunhofer IZI ist verantwortlich für das Arbeitspaket 3 „Charakterisierung von Seren mit Epitop-Mapping Datensätzen und Peptid-Arrays“.

1. Beschreibung des Arbeitspakets:

Das Arbeitspaket 3 umfasst die Optimierung der eigentlichen Phage Display Selektionsexperimente, deren Daten P3 zur Identifizierung von Epitopen benötigt, die Validierung der Peptid-Epitope und -Mimotope, sowie die Charakterisierung der Seren aus Experimenten von P1. Das Arbeitspaket ist in zwei Teile gegliedert.

2. Aufgabe 3.1: Optimierung subtraktiver Selektionen

Die Identifizierung von Epitopen direkt aus Seren ist eine etablierte Routine. Ein am IZI entwickeltes Phage Display Verfahren kann über Next-Generation-Sequencing-Daten mit einer speziellen Software der epitopic GmbH über statistische Methoden bei Vorliegen der Antigensequenzen unmittelbar viele potentielle Epitope identifizieren. Dieses wird im Rahmen des Projekts für die Routinearbeiten im Rahmen der Validierung der Vakzinierungen und Testung von Patientenseren eingesetzt. Für Peptide die an Antikörpern angereichert werden, ohne dass sie der Antigensequenz entsprechen, können bisher, wenn überhaupt nur mit großem Aufwand identifiziert werden. Diese werden Mimotope genannt, weil sie ein strukturelles Abbild einer vom Antiköper erkannten chemischen Struktur sind. Analog zu Peptiden die Epitopen entsprechen, werden auch sie in dem etablierten Verfahren angereichert. P3 will nun versuchen einen Algorithmus zu finden, der das ermöglicht. Für die Tests werden allerdings die Ergebnisse aus sogenannten „subtraktiven“ Selektionen benötigt, in denen die Mimotope selektiv angereichert und abgereichert werden. Dazu werden die Selektionen alternierend oder nacheinander auf Seren mit bzw. ohne die entsprechenden Antikörper durchgeführt. Diese kann P1 mit seiner speziellen Methode zur Herstellung von Impfantigenen in Tierexperimenten (Kaninchen) erzeugen.
Diese Verfahren sind bisher in der Literatur nur wenig und rein empirisch beschrieben. Erste Vorversuche unter Einbindung des hier verwendeten Verfahrens mit großen Datensätzen sind vielversprechend, es fehlt aber an einer echten Validierung der Techniken. Ziel dieses Teils des Arbeitspakets ist es daher entsprechende Selektionen in verschiedensten Varianten zu testen.

3. Aufgabe 3.2 Peptid-Arrays von Epitopen und Mimotopen

Zur Validierung der gefundenen Epitope und Mimotope, sowie für die Routineanalyse von Selektionsexperimenten werdenden Peptidarrays eingesetzt. Diese Methodik ist gut etabliert. Seren für diese Tests wurden von Partner P1 und Patientenseren geliefert. Damit werden zum einen nach Etablierung eines optimalen Peptidarray Routinemessungen zur

Kontrolle der Eigenschaften der verschiedenen Impfversuche während ihrer gesamten Laufzeit vorgenommen.

4. Durchgeführte Arbeiten der Aufgabe 3.1

    a. Optimierung des Phage Display Verfahrens

Das Phagen Display ist ein Verfahren bei dem z.B. Peptide, Antikörperfragmente oder Enzyme auf der Oberfläche von Phagen präsentiert werden können. Anwendung findet es u.a., um spezifische Antikörper nachzuweisen und so einen Antikörper-Schnelltest zu entwickeln.
Innerhalb dieses Forschungsprojektes wird das Peptid Phagen Display angewendet, bei dem verschiedenste Peptidsequenzen auf den Phagen präsentiert werden. Peptide sind Ketten von Aminosäuren (AS), die durch eine Peptidbindung miteinander verbunden sind. Diese Ketten können aus verschiedenste AS aufgebaut sein, wobei hier die 20 natürlichen AS, eine zentrale Rolle spielen.
Zum Einsatz kommt die Peptid-Phagemidgenbibliothek (ENTE-1) des Fraunhofer IZI. Die Bibliothek besteht aus Phagemiden mit der einklonierten Genbibiliothek eines randomisierten 16-mer Peptids, die als > 10^9 verschiedene Phagenpartikel verpackt sind. Das Peptidsequenz-Gen wurde mit Hilfe der Trinukleotidsynthese hergestellt, bei der für jede der 20 essenziellen AS maximal ein Codon pro Position in der Bibliothek zugelassen wird.

Die Serumproben durchlaufen zwei Selektionsrunden. Die Antikörper in den Serumproben wurden an paramagnetische Protein A Beads immobilisiert. Protein A bindet mit hoher Affinität spezifisch IgG durch Interaktion mit der Fc-Region des Antikörpers. In der ersten Selektionsrunde wurden die Phagemide der ENTE-1 Bibliothek zu den immobilisierten Antikörpern gegeben, wodurch die Antikörper über die Peptidsequenzen, die auf den Phagemide präsentiert werden, binden können. Das anschließende Waschen entfernt die nicht gebundener Phage. Die verbleibenden werden amplifiziert und in der zweiten Selektionsrunde mit den immobilisierten Antikörpern der Serumproben inkubiert. Durch das anschließende Waschen werden im Idealfall solche Peptidsequenzen angereichert, die spezifisch die Antikörper binden (Abbildung 1). Die Peptide Sequenz wird impliziert durch PCR, sequenziert und analysiert.

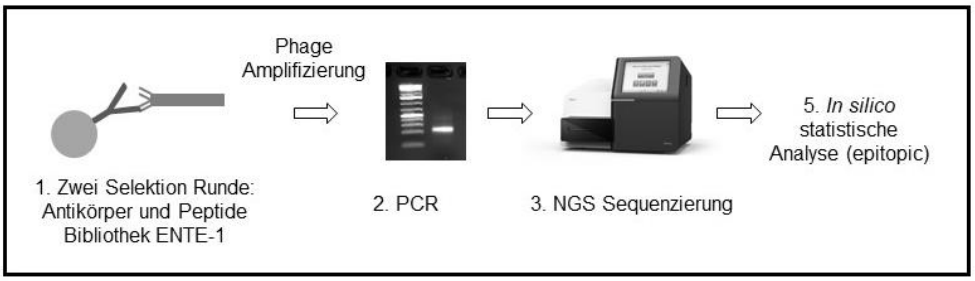

Abbildung 1: Überblick über das Phage-Display Verfahren.

    b. Standard Selektionen

Im Rahmen dieses Projekts, verschiedene Schweine und Kaninchen Seren wurden von GPV geliefert. Die Tiere wurden entweder mit einem glykosysierten (YghJ) oder mit einem nicht glykosysierten (-YghJ) Antigen in Kombination mit verschiedenen Adjuvanten immunisiert. Weitere Seren von UPEC UTI89 infizierten Schweine wurden von unserem Partner am Universitätsklinikum Odense (P4) zur Verfügung gestellt (Tabelle 1). Die Tierseren wurden mit

einem am IZI entwickeltes Phage Display Verfahren analysiert, und im Lauf des Vorhabens mit dem Peptidarray untersucht (Tabelle 1).
Die resultierende des Phage-Display NGS-Daten wurden von epitopic analysiert. Insbesondere wurden Serumdaten von Tieren ausgewertet, die mit den beiden Antigentypen (glykosyliert und nicht glykosyliert) geimpft wurden um Mimotope für die Glykosylierung des Antigens zu identifizieren.

Seren	Wirt	Herkunft	Beschreibung	Versuche	Ergebnisse
10	Kaninchen	Dänemark (GPV)	Die Kaninchen wurden entweder mit einem glykosysierten (YghJ) oder mit einem nicht glykosysierten (-YghJ) Antigen (YghJ) immunisiert.	Klassische Selektionen und subtractive Selektionen. Seren mit arrays getestet	Design von 16 Peptiden für Epitope. Herstellung eines ersten Peptide-Array
6	Mensch	Dänemark (Universitätsklinikum Odense)	Seren von UPEC infizierten Patienten	Klassische Selektionen. Seren mit arrays getestet	Design von 39 Peptiden. Herstellung eines zweiten Peptide-Array
6	Schwein	Dänemark (Universitätsklinikum Odense)	Seren von UPEC UTI89 infizierten Schweine	Mit arrays getestet	Validierung der Peptiden
19	Schwein	Dänemark (Universitätsklinikum Odense)	Die Schweine wurden entweder mit einem glykosysierten oder mit einem nicht glykosysierten Antigen immunisiert und verschiedenen Adjuvantien. Drei Seren von gesunden Schweine wurden geliefert als Negative Kontrole.	Klassische Selektionen und subtractive Selektionen mit Serum und mit anti-YghJ gereinigten Antikörper. Seren mit arrays getestet.	Validierung der Peptiden
6	Kaninchen	Dänemark (GPV)	Die Kaninchen wurden entweder mit einem glykosysierten oder mit einem nicht glykosysierten Antigen immunisiert.	Klassische Selektionen und subtractive Selektionen mit Serum und mit anti-YghJ gereinigten Antikörper. Subtractive Selektionen mit Serum und Antigen (YghJ). Seren mit arrays getestet.	Design von weitere 18 Peptiden für Epitope und Mimotope (glykosylierten Epitope). Herstellung eines zweiten Peptide-Array. Design von 18 Peptide für weitere Mimotope. Validierung der Peptiden.
103	Mensch	Deutschland (Sankt-Georg Krankenhaus)	Seren von UPEC infizierten Patienten	Seren mit arrays getestet.	Validierung der Peptiden
40	Kaninchen	Dänemark (GPV)	Seren von einer Impf-Challenge-Studie.	Seren mit arrays getestet.	Validierung der Peptiden
38	Schwein	Dänemark (Universitätsklinikum Odense)	Seren von einer Impf-Challenge-Studie.	Seren mit arrays getestet.	Validierung der Peptiden. Identifizierung von Peptidpaaren, die einen Impferfolg anzeigen

Tabelle 1: Zusammenfassung der Versuche und Ergebnisse mit den Tier- und Mensch- Seren für das Projekt.

c. Subtraktive Selektionen

Ein Ziel dieses Projekt war eine weiter Entwicklung des Phage-Display Verfahrens. Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, in denen verschiedene Seren gemischt wurden um Antikörper, die Glykosylierte-Stellen des Antigens erkennen, gezielt anzureichern.
Andere Selektionen wurden mit nicht glykosyliertem Antigen durchgeführt, um die Bindungstelle der Antikörper im Kaninchen Serum zu blockieren, in der Hoffnung, eine Anreicherung von Antikörpern zu erreichen, die glykosylierte Stellen des Antigens erkennen (Tabelle 1).
Aufgrund der Heterogenität des Serums und des immunologischen Profils der Tiere, wiesen einige Tiere bereits Antikörper gegen das Antigen YghJ auf, waren die Ergebnisse dieser Experimente nicht sehr schlüssig.
Trotz allem wurden die Daten an unseren Partner übermittelt, der sie mithilfe neuer Algorithmen nutzen konnte. Epitopic konnte auf *In-silico*-Ebene die subtraktive Selektion unter Verwendung von Daten aus standard Selektionen durchführen.
Insgesamt wurden mehr als 220 Selektionen für das Projekt durchgeführt, die mehr als 60 Millionen Peptid Sequenzen entsprechen.
Mit der Daten konnte epitopic Epitope und Mimotope identifizieren, die Glykosylierte- und Nicht-Glykosylierte Regionen des Antigens entsprechen. Dementsprechend wurden 73 Peptiden synthetisieren für die Realisierung mehrerer Peptidarrays (Tabelle 1 und 2).

	Beschreibung	Peptid-Sequenz	Typ	Protein-Position	Peptidarray
1	Y-585-N1	VNSKGESTLSGD	epitope	585-596	1, 2, 3
2	Y-585-Ph1	GCLHNSKGECV	mimotope	x	1, 2, 3
3	Y-585-Ph2	CNQNSKGECTQ	mimotope	x	1, 2, 3
4	Y-797-N1	TIDPNTGEVTWKY	epitope	795-807	1, 2, 3
5	Y-797-Ph1	CQDPNTGEDCE	mimotope	x	1, 2, 3
6	Y-797-Ph2	ACDPNTGECR	mimotope	x	1, 2, 3
7	Y-797-Ph3	CDPNTGECRQHEF	mimotope	x	1, 2, 3
8	Y-826-N2	QEEVEGKQVTRY	epitope	825-836	1, 2, 3
9	Y-826-Ph1	VCEEVEGKCS	mimotope	x	1, 2, 3
10	Y-1073-N1	NPTKWFAGNAQ	epitope	1075-1085	1, 2, 3
11	Y-1073-Ph1	SGFNPTKWFST	mimotope	x	1, 2, 3
12	Y-1179-N1	APFYKDGEWKNDLD	epitope	1177-1190	1, 2, 3
13	Y-1179-Ph1	CFQRYKDGRCLED	mimotope	x	1, 2, 3
14	Y-1195-N1	DSPAPLGELES	epitope	1190-1200	1, 2, 3
15	Y-1349-N1	TVAPEYLDES	epitope	1348-1357	1, 2, 3
16	Y-1349-Ph1	HSHVAPEYEKE	mimotope	x	1, 2, 3
17	SV1-N-90	PTKTGYLTLGGSQ	epitope	88-100	2, 3
18	SV1-N-113	SSDGFTFKPGEDV	epitope	111-123	2, 3
19	SV1-N-133	IATFNTQSEAAR	epitope	132-143	2, 3
20	SV1-N-154	VSFSLEDAQELAGS	epitope	151-164	2, 3
21	SV1-N-192	TFSSVVDRARFEKL	epitope	191-204	2, 3
22	SV1-N-217	KKLVNEEVENNA	epitope	217-227	2, 3
23	SV1-N-252	PDLNASFVSANAE	epitope	250-262	2, 3
24	SV1-N-314	GEAISFGIDTFE	epitope	392-402	2, 3
25	SV1-N-364	NTRVVPDDVRKV	epitope	362-373	2, 3
26	SV1-N-483	GNARGQAVVNIS	epitope	483-494	2, 3
27	SV1-N-393	NGATLDEGDQNV	epitope	391-402	2, 3
28	SV1-N-507	DKNYWLAFGEK	epitope	506-516	2, 3
29	SV1-N-583	YSWGGGVNSKGE	epitope	579-590	2, 3
30	SV1-N-684	FEYVTQWGSDPY	epitope	681-692	2, 3
31	SV1-N-702	DTSKPKLTQQDV	epitope	699-710	2, 3
32	SV1-N-764	QGYPDRVRQR	epitope	764-773	2, 3
33	SV1-N-776	RSTPIWVYERYP	epitope	774-785	2, 3
34	SV1-N-841	TTEESLEAAKAK	epitope	845-856	2, 3
35	SV1-N-845	LGFKTFTEFLN	epitope	973-983	2, 3
36	SV1-N-975	AFIDEAEYTTEE	epitope	837-848	2, 3
37	SV1-N-1010	IYGEESSKAG	epitope	1010-1019	2, 3
38	SV1-N-1101	IKSSASVPVTVT	epitope	1099-1110	2, 3
39	SV1-N-1119	LTGREKHEVALN	epitope	1117-1128	2, 3
40	SV1-N-1165	DDVSANFTFT	epitope	1163-1172	2, 3
41	SV1-N-1180	FYKDGEWKNDL	epitope	1179-1189	2, 3
42	SV1-N-1192	DSPAPLGELES	epitope	1190-1200	2, 3
43	SV1-N-1199	ELESASFVYTTP	epitope	1197-1208	2, 3
44	SV1-N-1218	TGGLEQFANDLD	epitope	1218-1229	2, 3
45	SV1-N-1318	PGATEVANNVLA	epitope	1318-1329	2, 3
46	SV1-N-1467	GASAYQLPGATE	epitope	1468-1479	2, 3
47	SV1-N-1477	GASELSFEGGVS	epitope	1476-1487	2, 3
48	SV1-N-1490	GVSQSAYNTLAS	epitope	1485-1496	2, 3
49	YMi-02	DQQDHDWDYHAF	mimotope	x	2, 3
50	YMi-03	CFDHDLDYQIGCY	mimotope	x	2, 3
51	YMi-04	SKDHDQDYYVD	mimotope	x	2, 3
52	YMi-05	SITNDHDQDYKSF	mimotope	x	2, 3
53	YMi-06	KNSKGEEQEWQ	mimotope	x	2, 3
54	YMi-07	CWANSKGEEQGTC	mimotope	x	2, 3
55	YMi-08	VDHDHDYDVHKY	mimotope	x	2, 3
56	YMi-09	QSWKPSRQGTL	mimotope	x	3
57	YMi-10	QSDASWKPWTEH	mimotope	x	3
58	YMi-11	CLLDPNDWELKVC	mimotope	x	3
59	YMi-12	CIVDPNDGNVNC	mimotope	x	3
60	YMi-13	CQSLLDVESTPEC	mimotope	x	3
61	YMi-14	KQWLDVEKQHVY	mimotope	x	3
62	YMi-15	QHLDVEGYYQAF	mimotope	x	3
63	YMi-16	QRLDVEWCIGPC	mimotope	x	3
64	YMi-17	FNRDDCYDYAEC	mimotope	x	3
65	YMi-18	CNRAVDCYDGVF	mimotope	x	3
66	YMi-19	CVVVDHCYDY	mimotope	x	3
67	YMi-20	CLQHDHCYDY	mimotope	x	3
68	YMi-21	NHGSGTQGFIQ	mimotope	x	3
69	YMi-22	DNGSGNQNSI	mimotope	x	3
70	YMi-23	CLNSKGEWIDC	mimotope	x	3
71	YMi-24	WNSKGEWIYI	mimotope	x	3
72	YMi-25	HWNSKGEPTNQ	mimotope	x	3
73	YMi-26	EWGSGNRKDIE	mimotope	x	3

Tabelle 2: Liste der verwendeten Peptide für die Peptidarrays. Im Rahmen des Projekts wurden drei Arrays gebaut. Das finale Peptidarray (3) enthält 73 Peptide. Die Position des Epitops auf der Ebene des Antigens YghJ wird angezeigt.

5. Durchgeführte Arbeiten der Aufgabe 3.2

a. Herstellung des Peptidarrays

Im Rahmen dieses Projekts wurden 3 Peptidarrays hergestellt. Das erste und das zweite enthielt 16 und bzw. 53 Peptide (Tabelle 2).
Das finale Peptidarray enthält 73 verschiedene Peptide mit einer Länge zwischen 10 Aminosäure (AS) – 14 AS. Alle Peptide wurden dreifach auf eine Glasoberfläche mittels Click-Chemie gebracht.
Für die Anwendung dieses Peptidarray, wird jedes Serum mit den Peptiden inkubiert damit die spezifischen Antikörper im Serum die Peptide binden können (Abbildung 2). Die gebundenen Antikörper werden nacheinander mit zwei weiteren Antikörpern, einem primären und einem sekundären Antikörper, detektiert. Der sekundäre Antikörper ist fluoreszenz-markiert, wodurch ein Signal beim Scannen gemessen werden kann. Die Daten wurden mit einem am IZI entwickelten Software analysiert und ausgewertet. Die Abbildung 2B zeigt einen Ausschnitt von 2 Feldern nach der Inkubation mit einem Serum vor und nach der Immunisierung und zeigt eine Steigerung des Signals für einige Peptide nach der Immunisierung.

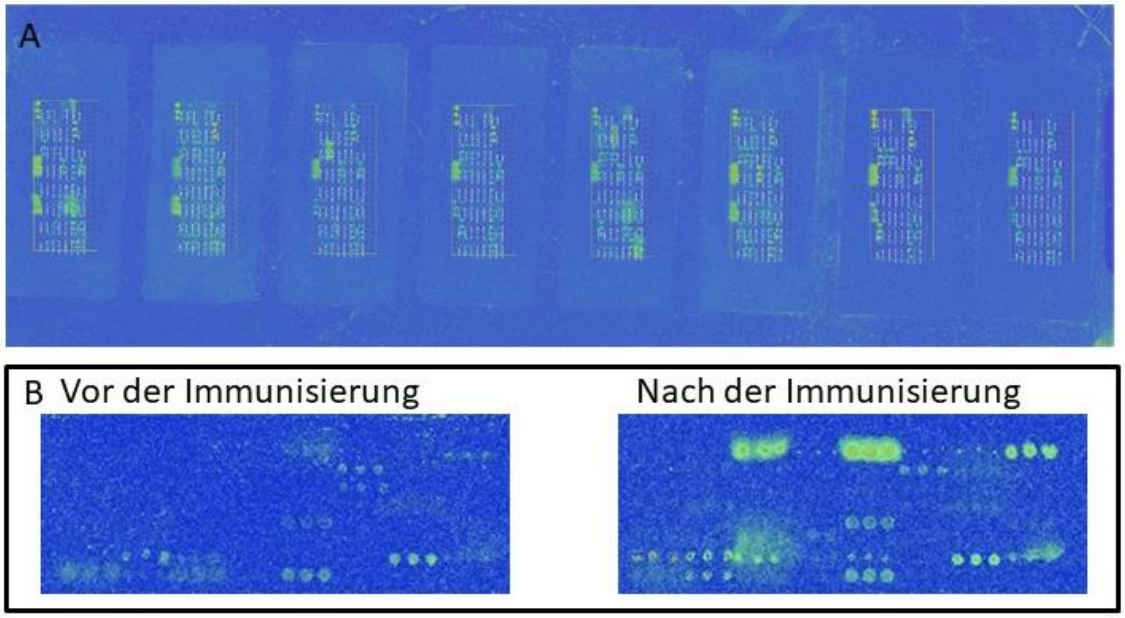

Abbildung 2: A, Bild eines Scans des endgültigen Arrays mit 73 Peptide die dreifach auf eine Glasoberfläche gebracht wurde. Auf dem Glasträger sind 8 Felder dargestellt. Jedes Feld wurde mit einem Serum inkubiert. Die Signalintensität variiert in aufsteigender Reihenfolge von Grün nach Rot.
B, Scan von zwei Feldern eines Peptidarrays nach Inkubation mit Serum vor und nach der Impfung. Mehrere Peptide reagieren stark mit Serumantikörpern nach der Immunisierung.

b. Analyse der Seren mit dem Peptidarray

Seren von immunisierten Kaninchen, immunisierten und infizierten Schweinen sowie Patienten wurden für die Analyse mit der zweiten Version des Peptidarrays verwendet. Der Peptidarray enthält 55 verschiedenen Peptiden von denen 7 Mimotope entsprechen (Tabelle 2).
Alle identifizierten Epitope und durch statistische Verfahren von epitopic gefundenen Mimotope zeigten eine IgG-Bindung von mindestens mehreren Seren (Tabelle 3).

Die Seren von Schweinen zeigten im Allgemeinen geringere Antikörperspiegel gegen das Antigen. Dennoch wurde durch die Verwendung affinitätsgereinigter Antikörper nachgewiesen, dass auch diese Tiere das gesamte Spektrum an Antikörpern besitzen.

Die Signalintensitäten variieren stark zwischen den verschiedenen Serum-Quellen, und ein direkter Vergleich konnte nur mit den Ergebnissen aus den Seren immunisierter Kaninchen durchgeführt werden. Obwohl mindestens ein Kaninchen Kontakt mit einem YghJ-ähnlichen Antigen hatte, gab es eine Tendenz, dass Kaninchen vor der Immunisierung viel geringere Signale in den Peptidarray Daten aufwiesen als nach der Immunisierung (Abbildung 2B). Der glykosylierte Impfstoff verursachte ein anderes Muster und eine höhere Signalstärke im Vergleich zum nicht glykosylierten Protein.
Die Wirkung der Glykosylierung auf die Antikörpersignale in den Arrays wurde bei Kaninchen für mehrere Epitope beobachtet (Tabelle 3).
Einige dieser Epitope zeigen eine extreme Anreicherung und sind wahrscheinlich Mimotope von Glykosylierungen (Tabelle 1, YMi Peptide).

Beim Vergleich verschiedener Spezies war die Divergenz der einzelnen Epitope Muster sowohl zwischen Harnwegsinfektionspatienten als auch zwischen infizierten oder immunisierten Tieren hoch (Tabelle 3). Es gab jedoch keinen allgemeinen Unterschied in den Antigen-Epitopen, die von den Tierseren und den Seren der Harnwegsinfektionspatienten erkannt wurden. Überraschenderweise war das Epitope-Muster nicht von der Bakterienspezies abhängig, die die laufende Infektion verursachte.

Seren, die vor der Behandlung von Schweinen und Kaninchen entnommen wurden, zeigen eine signifikante Anzahl unterschiedlicher positiver Epitope. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die häufige Exposition gegenüber dem hochkonservierten Antigen unter den *Bakterien*-Erregern zurückzuführen. Bei Exposition gegenüber Impfung oder Infektion werden jedoch Antikörper gegen zusätzliche Epitope oder stärkere Reaktionen beobachtet wie zum Beispiel gezeigt in der Abbildung 2B.
Die Ergebnisse wurden in *Frontiers in Immunology* veröffentlicht (PMC10637626, DOI: 10.3389/fimmu.2023.1258136).
Die letzte Version des Peptidarray mit 73 Peptiden wurde kurz vor Ende des Projekts fertiggestellt.

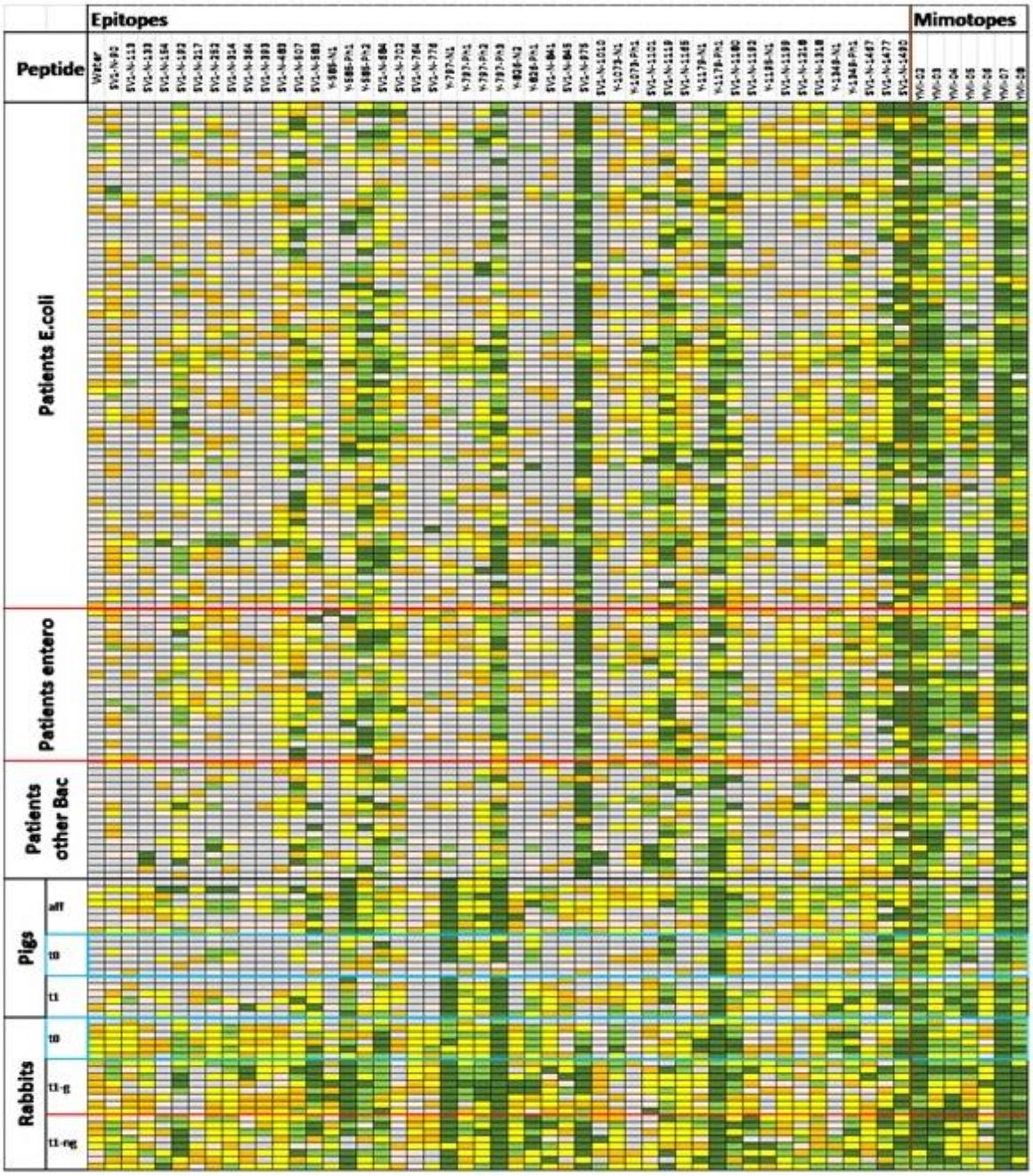

Tabelle 3: Ergebnisse aus Screening-Seren von Harnwegsinfektionspatienten mit bestätigten Infektionen, Schweinen, die entweder geimpft oder direkt in der Blase infiziert wurden, und immunisierten Kaninchen, die in einem Epitop-Peptid-Array mit dreifacher Ausfertigung getestet wurden. Die Signal-Cutoffs sind Signal über Hintergrund (leere Flecken). Farbcodes sind Signal über Hintergrund; >100× (dunkelgrün), >20× (hellgrün), >4× (gelb), >2× (orange), 2× und weniger (grau); keine Daten aufgrund zu hoher Fehler, Druckfehler im Array oder nicht mindestens Werte von 2 Flecken. Blaue Kästen: Tierseren, die vor der Immunisierung entnommen wurden (Tabelle aus „Glycosylation of bacterial antigens changes epitope patterns“ (doi:10.3389/fimmu.2023.1258136)).

6. Letzte Impfstoffstudie und Ergebnis

Kürzlich fand ein neuer Impfversuch mit Schweinen am Universitätsklinikum Odense statt. Die Seren vor und nach der Immunisierung mit dem Antigen YghJ wurden auch mit der letzten Version des Peptidarrays getestet. Der Peptidarray enthält 73 verschiedenen Peptiden von denen 25 Mimotope entsprechen (Tabelle 2). Wir konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigen. Viele Schweineseren enthalten Antiköper gegen das Antigen YghJ vor der

Immunisierung. Aber wir können mit dem Array wieder zeigen, dass die Antikörperreaktion nach der Impfung mit der Zeit zunimmt, validierend die Nützlichkeit dieses Peptidarrays.
Einige von den neuen Peptiden reagieren positiv mit Serum von geimpften Tieren (Tabelle 2, YMi-08 - YM-26).
Deshalb ermöglichte uns eine ausführlichere Analyse eine Identifizierung von neun Peptidpaaren, die auf Impferfolg hinweisen (Abbildung 3). Mit dem Peptidpaar YMi-02 und YMi-18, reagierten beispielsweise 30 von 34 Schweinen nach der Impfung.
Das Peptidarray kann routinemäßig von unseren Partnern in Dänemark benutzt werden um Antiköper gegen UPEC zu detektieren.

		YMi-02	YMi-10	YMi-02	YMi-13	SV1-N-583	SV1-N-90	SV1-N-90	YMi-02	SV1-N-583
		YMi-18	Y-1179-Ph1	SV1-N-217	SV1-N-217	SV1-N-217	SV1-N-217	SV1-N-1101	YMi-16	SV1-N-1180
D0	YghJ	20	16	13	1	8	12	13	13	17
	PBS	12	18	11	6	8	4	15	10	8
D14	YghJ	22	24	18	16	18	20	23	18	19
	PBS	16	17	12	5	3	2	10	16	3
D42	YghJ	30	29	31	29	31	31	30	32	28
	PBS	3	14	17	12	14	14	10	4	4

Abbildung 3: Peptidpaare, die es ermöglichen, den Erfolg einer Impfung mit dem Antigen YghJ nach 14 (D14) oder 42 (D42) Tagen festzustellen. Die Zahlen geben die Anzahl der Schweine an, die nach der Impfung mit dem Antigen YghJ oder PBS auf das Peptidpaar reagieren. D0: Vorimmunisierung. PBS: negativ Kontrolle. 34 and 23 Schweine wurden mit dem Antigen bzw. PBS immunisiert.

This project has received funding from the Eurostars-2 joint programme with co-funding from the European Union Horizon 2020 research and innovation programme

Kurzbericht zum Vorhaben

„Identifizierung und Validierung von Vakzin-Epitopen“

im Rahmen des Eurostars Projekts

E! 114695 SVEET

„Exploration und Translation modifizierter, glykosylierter Vakzine Epitope“

Nicolas Delaroque

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI
Perlickstr. 1, 04103 Leipzig

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Förderkennzeichen: 01QE2109C
Projektlaufzeit: 01.04.2021 – 30.04.2024

Ursprüngliche Aufgabenstellung

Das Hauptergebnis von SVEET ist ein Impfstoff-Kandidat gegen Harnwegsinfektionen der mit einem neuen Ansatz entwickelt worden soll. In Europa kommt es jährlich 770000 Male zu nosokomialen Harnwegsinfektionen (HAUTI), wobei die durchschnittlichen direkten Kosten pro Fall 5700 € betragen. HAUTI verursacht allein in Europa jedes Jahr 14000 Todesfälle und die Fälle nehmen aufgrund von Antibiotikaresistenzen zu. 80 % dieser Infektionen werden durch uropathogene *E. coli* (UPEC) verursacht. UPEC sind abzugrenzen von den apathogenen *E. coli*-Typen, die lediglich eine asymptomatische Bakteriurie hervorrufen. Eine Infektion beginnt durch den transurethralen Eintritt von UPEC. Anschließend kommt es zur Adhäsion am Epithel der Harnwege mithilfe verschiedener Adhäsionsmechanismen, wie z.B. Fimbrien. Es folgt die Invasion der Urothelzellen. Im Zytoplasma bilden UPEC sogenannte intrazelluläre bakterielle Gemeinschaften (IBC), die einem Biofilm ähneln. Dadurch wird eine effektive Immunantwort erschwert. Die IBCs können auch nach erfolgreicher Antibiotikatherapie in den Zellen persistieren und so zu rezidivierenden Infekten führen. Da UPEC zur Aszension fähig sind, können sie neben einer Infektion der Blase (Zystitis) auch die oberen Harnwege infizieren und so bspw. eine kompliziertere Pyelonephritis hervorrufen. **Derzeit gibt es keine klinisch validierte Prävention gegen eine UPEC-Infektion.**
Im Rahmen des Vorhabens SVEET soll ein neuer UPEC-Impfstoffkandidaten von GlyProVac (GPV) entwickeln werden, der eine neue Klasse bakterieller Protein-Antigene repräsentiert, die O-Glykosylierungen aufweisen.
Der erfolgreiche Impfstoff wird Risikogruppenpatienten helfen, kostspielige Behandlungen (5700 €) durch kostengünstige Prophylaxe (< 200 € pro Patienten) ersetzen, Leben retten und Antibiotikaresistenzen im Krankenhausumfeld reduzieren.
Der neue Ansatz zum Antigendesign erfordert neuartige, kosteneffiziente Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Epitope. Basierend auf den proprietären Methoden von Fraunhofer IZI und epitopic GmbH und den Antigenen, Peptiden und Antikörpern von GPV wird IZI in der Zusammenarbeit mit epitopic, diese Methoden entwickeln.
Zu den spezifischen Projektzielen gehören:

- Ein GPV UPEC-Subdomänen-Impfstoffkandidat GPV0X
- Ein GPV0X-Antigen-Produktionsstamm
- Eine Entwicklung des Phage-Display Verfahren am Fraunhofer IZI
- Für epitopic, verbesserte Algorithmen, die es ermöglichen, erweiterte Epitop-Mapping-Dienste zur Validierung und Verbesserung von Impfstoffen anzubieten
- Am Universitätsklinikum Odense wird ein neues Großtiermodell für komplexe Harnwegsinfektionen zur In-vivo-Impfstoffwirksamkeit entwickeln werden

Ablauf des Vorhabens

Im Lauf dieses Projekts, wurden von GPV verschiedene Impfstoffe-Kandidaten auf der Basis von glykosylierten Antigenen (YghJ) entwickelt. Kaninchen und Schweine wurden mit den Impfstoffen in Kombination mit verschiedenen Adjuvanten immunisiert. Die Seren der Immunisierte Tieren wurden mit einem am IZI entwickeltes Phage-Display Verfahren analysiert. Das Phage-Display ist eine biotechnologische Methode, bei der aus großen rekombinanten Bibliotheken Peptide, Proteinteile (z. B. Antikörperfragmente) oder komplette Proteine funktionell auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden, um anschließend geeignete Bindepartner für einen bestimmten Liganden, z. B. Antikörper zu isolieren und zu identifizieren. Die DNA-Sequenz codierend für die potenzielle Bindung Stelle, sogenannte Epitope wurde durch Next-Generation-Sequencing (NGS) sequenziert.

Gleichzeitig wurde es versucht den Verfahren durch subtraktive Selektionen zu optimieren, in denen die Epitope selektiv angereichert und abgereichert wurden. Dazu wurden die Selektionen alternierend oder nacheinander auf Seren mit bzw. ohne die entsprechenden Antikörper durchgeführt. Weitere Subtraktiven Selektionen in Kombination mit glykosylierten (YghJ) oder nicht glykosylierten (-YghJ) Antigen wurden vollzogen.
Die resultierenden NGS-Daten wurden an epitopic GmbH überlassen und die Epitope wurden mit nur mit bei epitopic entwickelten Algorithmen identifiziert.
Epitopic GmbH konnte IZI die Sequenz von potenzialen nicht glykosylierte und glykosylierte Epitope mitteilen (Mimotope). Damit wurden ein Peptidarray mit 73 Peptide für die Analyse von Patientenseren und Immunisierungs-Versuchen hergestellt.

Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Eine Optimierung der subtraktiven Selektionen mit den Tierseren erwies sich als schwierig wegen der unterschiedliche Immunprofile der Immunisierten Tieren, insbesondere vor der Immunisierung. Jedoch konnte epitopic GmbH die NGS daten von IZI mit neuen Algorithmen auswerten, ermöglicht am Ende die Erstellung eines Peptidarrays.
Mit Hilfe dieses Peptidarrays wurden Seren aus Impfstudie und Patienten Seren untersucht.
Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass das Immunsystem geimpfter Kaninchen dieselben Epitope erkennt wie die Antikörper im Serum genesender Patienten. Darüber hinaus bildeten Schweine, die mit YghJ geimpft oder direkt in der Blase mit *E. coli* infiziert wurden, Antikörper gegen fast alle Epitope, die bei Kaninchen und Menschen beobachtet wurden. Die Analyse zeigten, dass die Impfung von Kaninchen und Schweinen Antikörper hervorbringt, die sich gut auf das menschliche Immunsystem übertragen lassen.
Gegen Ende dieses Projekts, wurden von GPV weitere fortschrittlichere Impfstoffe entwickelt und ebenso an Tieren am Universitätsklinikum Odense getestet. Dort wurde ein neues Schweinemodell für komplexe Harnwegsinfektionen zur In-vivo-Impfstoffwirksamkeit entwickelt.
Die Seren aus der letzten Impfstudie wurden mit dem Peptidarray getestet, um die Wirksamkeit der verschiedenen Formen des Impfstoffs zu untersuchen. Die Ergebnisse bestätigten wieder die Fähigkeit des Peptidarrays zur Bewertung der Immunisierung und bestätigten die natürliche Variabilität der Immunisierungsreaktion, die zuvor bei menschlichen Patienten und Tieren beobachtet wurde.
Der Peptidarray ermöglicht eine Zunahme des Antikörpertiters nach der Immunisierung gegen UPEC nachzuweisen.
Abschließend, der Array ist somit vollständig und kann für die Routinemessungen von Patientenseren und Immunisierungs-Versuchen verwenden werden.