Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil I: Kurzbericht zu FKZ161B0637

Die Norden Vaccines GmbH arbeitet an der Entwicklung eines Human-Impfstoffes gegen die Zecke (*Ixodes* spp.) als Überträger diverser oft schwerer Erkrankungen, um somit die Übertragung der Krankheitserreger, wie zum Beispiel Borrelien oder Frühsommer- Meningoenzephalitis (FSME-) Viren auf den Menschen zu inhibieren.

Mithilfe des ORFeome-Phagen Displays wurden Zeckenantigene identifiziert, gegen die Probanden mit erworbener Zeckenimmunität eine IgG Antwort ausbilden. Für diese von uns patentierten Schlüsselantigene und weitere, in der Literatur beschriebene Zeckenspeichelproteine wurden Produktions- und Reinigungsprotokolle erarbeitet.

Mausstudien: Um die Immunogenität unserer Antigene zu untersuchen, wurden Testimmunisierungen mit Einzelantigenen und Antigenkombinationen durchgeführt, dabei wurde auch der Einfluss verschiedener Adjuvanten und Verabreichungswege untersucht. Generell wurde unser Impfstoff mit allen getesteten Antigenen und- Kombinationen gut vertragen und es konnten robuste Immunantworten in verschiedenen Mausstämmen induziert werden.

Anschließend erfolgten zusammen mit [redacted] erste Studien in der Maus, in denen zum einen der Einfluss der Immunisierung auf die Borrelienübertragung [redacted] von der Zecke auf die Maus und zum anderen der Einfluss auf die Blutmahlzeit von [redacted] Nymphen untersucht wurde. [redacted].

Nachdem eine Publikation von Sajid et al. Ende 2021 nahelegt, dass das Mausmodell für die Entwicklung eines Zeckenimpfstoffs Limitationen aufweist, sind wir auf das Meerschweinchen Modell umgestiegen, da dieses leichter eine erworbene Zeckenimmunität entwickelt als die Maus, die in der Natur einen der Hauptwirte der Zecken darstellt, weshalb eine starke Anpassung der Zecke an die Maus naheliegend ist.

Studien im Meerschweinchen: Im Meerschweinchen haben wir, mit einem neuen CRO [redacted] die Verträglichkeit unseres proteinbasierten Impfstoffes überprüft und den Effekt der Impfung auf den Zeckenbiss analysiert. [redacted] Nach abgeschlossener Immunisierung erfolgte ein Zeckenbesatz [redacted] Außerdem wurde die Dauer der Blutmahlzeit sowie das Gewicht der Zecken nach der Blutmahlzeit erfasst. [redacted] Um die Immunantwort genauer zu untersuchen, wurden Serumproben genommen und mittels ELISA analysiert. [redacted].

In einer zweiten Studie sollte die Frage adressiert werden, ob die durch den proteinbasierten Impfstoff induzierte Immunantwort eine Übertragung von Krankheitserregern ([redacted]) von der Zecke auf das Meerschweinchen verhindern kann.

Dazu erfolgte die Immunisierung wie in der ersten Meerschweinchenstudie, [redacted]

Optimierung des Impfstoff Kandidaten: Um die immunogenen Bereiche unserer Antigene zu identifizieren, wurde ein Peptidmicroarray durchgeführt. Neben den Meerschweinchen Seren wurden hier auch Seren von Probanden mit natürlich erworbener Zeckenimmunität eingesetzt. [redacted] Diese Daten liefern uns Ansatzpunkte zur weiteren Optimierung unseres Impfstoffes, [redacted].

***Target Product Profile* und klinischer Entwicklungsplan:** Zur zielgerichteten Entwicklung des Impfstoffes wurde ein *Target Product Profile* (TPP) erstellt, welches die Schlüsselattribute eines marktfähigen Zecken Impfstoffes zusammenfasst. Das TPP dient dazu das angestrebte fertige Produkt vor Augen zu haben, um bereits in der frühen R&D Phase die richtigen Entscheidungen, z.B. bei der Auswahl des Lead-Kandidaten zu treffen. Da auch viele Aspekte der klinischen Erprobung bereits früh in die Entwicklung miteinfließen müssen (z.B. zu verwendendes Adjuvans, Produktzusammensetzung und Applikation, Supply, Stabilität etc.), wurde in Zusammenarbeit [redacted] ein klinischer Entwicklungsplan ausgearbeitet, der zwei verschiedene Szenarien für eine klinische Entwicklung (Phase I-III) einschließlich Endpunkten, Zeitachsen und Budget enthält.

Ausblick: Aus den bisherigen Studien haben wir gelernt, dass Borrelien als Modellpathogen sehr herausfordernd sind, [redacted]. Im Moment arbeiten wir somit an der Verbesserung unseres Impfstoffes im Hinblick auf seine Zusammensetzung und Formulierung [redacted]

Da wir mit den ersten Mausdaten bereits einen Investor gefunden haben, der uns die Finanzierung der nächsten Studien ermöglicht, hoffen wir zeitnah ein belastbares Datenset zu generieren, mit dem wir ein größeres Investment einwerben können. Mit diesem Investment wollen wir die weitere präklinische und klinische Entwicklung unseres Impfstoffkandidaten bis hin zu einem angestrebten Exit nach klinischer Phase I oder II realisieren.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil II: Eingehende Darstellung zu FKZ161B0637

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zecken übertragen eine Vielzahl von Pathogenen auf den Menschen, darunter *Borrelia burgdorferi* in den USA oder *Borrelia afzelii* in Europa (Erreger der Lyme-Borreliose) und das FSME-Virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis). Weniger verbreitete Pathogene umfassen *Francisella tularensis* (Erreger der Tularämie), *Ehrlichia chaffeensis* (Humane Ehrlichiose) und *Babesia*-Arten (Babesiose) (Vonesch et al. 2016; Choi, Pyzocha, and Maurer 2016; Ismail and McBride 2017). Die Lyme-Borreliose stellt weltweit die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung dar, die unbehandelt schwerwiegende Komplikationen wie Arthritis, Fazialisparese oder Meningitis hervorrufen kann (John, Raman, and Ryan 2017). In Deutschland werden jährlich zwischen 60.000 und 200.000 Fälle registriert, während in den USA die Zahl der Fälle auf über 300.000 geschätzt wird (Nelson et al. 2015; Hofmann et al. 2017). Die Zahl der FSME-Fälle hat sich in Europa seit den 1990er Jahren signifikant erhöht, und der Klimawandel könnte die Inzidenz von durch Zecken übertragenen Erkrankungen wie Borreliose und FSME weiter steigern (Frimmel et al. 2014; Vonesch et al. 2016).

Ixodes-Zecken, die Hauptvektoren der Borreliose, sind ebenfalls für die Übertragung weiterer Pathogene wie Bakterien, Viren und einzelliger Parasiten verantwortlich (Shapiro 2014). In der Forschung wird zunehmend ein Impfansatz verfolgt, der die Zecke selbst als Ziel nimmt, anstatt spezifische Pathogene zu bekämpfen. Personen, die regelmäßig Zeckenstichen ausgesetzt sind, entwickeln häufig eine Immunantwort gegen die Zecken (*acquired tick immunity*), was zu einer reduzierten Blutaufnahme, einem frühzeitigen Ablösen der Zecke vom Wirt und einer verminderten Pathogenübertragung führen kann (Gomes et al. 2015; Trager 1939; Wikel 1996). Verschiedene immunogene Zeckenproteine, darunter Subolesin/Akirin, MP1 und Aquaporine, wurden als potenzielle Impfstoffkandidaten identifiziert, jedoch konnte bislang kein einzelnes Protein ausreichenden Schutz bieten (Becker et al. 2015; Contreras and De La Fuente 2016). In der Tiermedizin hat das auf dem Protein Bm86 basierende Vakzin TickGARD/GAVAC bei Rindern einen partiellen Schutz von etwa 50% gegen *Rhipicephalus microplus* gezeigt (Jonsson et al. 2000; Miller et al. 2012; Schetters et al. 2016). Kombinationen von Proteinen, wie Bm86 und Subolesin, haben vielversprechende synergistische Effekte gezeigt (Schetters et al. 2016).

Um ein effizientes Vakzin für Menschen zu entwickeln, wollen wir verschiedene Zeckenspeichel-proteine, die in unterschiedlichen Bereichen der Überwindung der Immunantwort oder Blutgerinnung involviert sind, als Antigene kombinieren. Hierzu beginnen wir mit der von uns bereits identifizierten Metalloprotease 1 (MP1) (Becker et al. 2015). Dieses immunogene Protein wurde mittels einer neuen, von uns entwickelten Methode, dem *ORFeome phage display* (Zantow et al. 2016; 2018) mit Hilfe von Serum von Personen mit einer erworbenen Zeckenimmunität (*acquired tick immunity*) identifiziert. Ein weiteres von uns entdecktes immunogenes Protein, welches wir in Kombination testen wollen, ist ein Thrombin-Inhibitor (Becker et al. 2015), welches wie auch MP1 an der Hemmung der Blutgerinnung beteiligt ist. Weitere Virulenzfaktoren, die adressiert werden, sind u.a. [redacted] welchen ebenso Schlüsselfunktionen bei der Blutmahlzeit zugesprochen werden. Durch die Kombination verschiedener immunogener Proteine bei der Vakzinierung erwarten wir einen synergistischen Effekt bei der Inhibierung der Pathogenübertragung und/oder der Blutmahlzeit der Zecke.

2. Ablauf des Vorhabens (Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung)

WP1: Proteinproduktion

In diesem WP war die rekombinante Expression von sechs hoch konservierten *Ixodes*-Proteinen in *E. coli* geplant. Die Reinigung sollte über [redacted] erfolgen, und die Identität biochemisch mittels SDS-PAGE und Immunoblot überprüft werden. Die Reinheit sollte durch SDS-PAGE mit Silberfärbung sowie Größenausschlusschromatographie getestet werden. Der Endotoxingehalt sollte mit dem LAL-Test überprüft werden. Eine Optimierung der Produktionsprotokolle und -systeme sollte parallel zu den weiteren WPs erfolgen.

Abgesehen von kleineren Anpassungen konnte dieses WP wie geplant umgesetzt werden: Um die Chance auf einen effektiven Impfstoff zu erhöhen, wurden anstatt der sechs geplanten insgesamt 16 Antigene/Antigenfragmente als Kandidaten für unser Projekt ausgewählt [redacted]. Die DNA-Sequenzen zu diesen Antigenen wurden Codon-optimiert, als synthetische Gene bestellt und in Expressionsvektoren für *E. coli* und Insektenzellen kloniert, die [redacted] zur Proteinreinigung enthalten. Zunächst erfolgte die Expression in *E. coli* BLR(DE3), [redacted]. Während des Projekts wurden auch Optimierungen der Produktionsbedingungen und des Downstream Processings vorgenommen (u.a. Kultivierungsbedingungen, Produktionsmaßstab, Zellaufschluss, Pufferzusammensetzung, pH-Wert). Zusätzlich wurden Testexpressionen in [redacted] Insektenzellen durchgeführt, um die Qualität anspruchsvoller Antigene zu verbessern und Antigene zu produzieren, die [redacted] nicht exprimierbar waren. Dies ermöglichte die Erweiterung des Antigenrepertoires um ein weiteres Antigen für eine Mausstudie. Ein Qualitätskontrollsystem wurde etabliert, das die Reinheit und Beschaffenheit der Proteine mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, Western Blot und Endotoxin-Assays überprüft.

WP2: Validierung der Immunogenität

Die Auswahl unserer Antigene sollte laut ursprünglichem Arbeitsplan über verschiedene Assays validiert werden. Da bekannt ist, dass bei Menschen mit einer erworbenen Zeckenimmunität auch eine IgE-Antwort vorhanden ist, sollte getestet werden, ob in den gesammelten Probandenseren IgE-Antikörper spezifisch gegen unsere Antigene vorhanden sind. Dazu sollte ein Basophilen-Assay durchgeführt werden. Im Basophilen-Assay werden spezielle Rattenzellen (RBL NF-AT/DsRed) verwendet, die mit IgE-Antikörpern aus dem Serum von Menschen mit Zeckenimmunität beladen werden. Danach wird geprüft, ob die Zugabe von unseren Antigenen die Basophilen durch Quervernetzung der IgE-Rezeptoren aktiviert. Dies erfolgt über Messung der induzierten Fluoreszenz. Leider war dieser Assay nicht sensitiv genug/die IgE-Titer in den Probandenseren zu niedrig, um hier aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Um unsere Antigenauswahl dennoch validieren zu können haben wir uns auf die IgG-Antwort konzentriert. Dieser Antikörper-Subtyp ist im menschlichen Serum am meisten vertreten, was den Nachweis deutlich vereinfacht. Zur Validierung wurden folglich IgG-basierte ELISAs sowie eine Epitopkartierung mittels Peptidmicroarray vorgenommen.

WP3: Testimmunisierungen

Das Ziel dieses Workpackage war es die Immunantwort von immunisierten Mäusen über ihre B- und T-Zell-Antwort zu charakterisieren. [redacted]. Die antigenspezifischen IgG-Antikörpertiter im Serum wurden mittels Antigen-ELISA bestimmt. Die Analyse der zellulären Th1/Th2/Th17 Immunantworten wurde mittels Elispot detektiert. Basierend auf den Ergebnissen aus WP2 und WP3 wurden die besten Proteine für die nachfolgenden Mausversuche ausgewählt.

Dieses Workpackage wurde während der Projektlaufzeit gegenüber dem Ursprungsantrag erweitert, da z.T. unterschiedliche Mausstämme, unterschiedliche Adjuvanten und unterschiedliche Verabreichungswege getestet und/oder verglichen wurden.

WP4: *Feeding tests* mit pathogenfreien Zecken

In WP4 sollte untersucht werden, inwiefern eine Immunisierung von Mäusen mit unseren Antigenen oder Kombinationen daraus einen Einfluss auf die Blutmahlzeit der Zecken hat. WP4 wurde nicht wie ursprünglich geplant zusammen mit der [redacted], sondern mit einem neuen Kooperationspartner, [redacted], in einer gegenüber dem Ursprungsantrag ausgeweiteten und an die bisherigen Ergebnisse angepassten Form (u.a. Anzahl der Zecken, Impfstoffdosierung) durchgeführt. Es wurde ein Fast-Screening-System etabliert, um in einem kürzeren Zeitraum ein schnelles Screening auf [redacted] durchzuführen, die zu einer Verringerung des Zecken *Feedings* an der Maus führen. [redacted]. Es wurden lokale Hautreaktionen der Mäuse sowie die Dauer der Blutmahlzeit und das Gewicht/*scutal index* der Zecke nach der Blutmahlzeit analysiert.

WP5: *Feeding tests* mit *B. burgdorferi* tragenden Zecken

In diesem Workpackage waren die Arbeiten zum PoC im Mausmodell vorgesehen, dafür sollte an der [redacted] eine Immunisierung [redacted] von Mäusen mit einem Antigengemisch und anschließender Challenge durch [redacted] infizierte [redacted] Zecken erfolgen. Als Read Out war maßgeblich eine qPCR-Analyse von Hautbiopsien zur Ermittlung des Infektionsstatus sowie eine Analyse der induzierten Immunantwort vorgesehen.

Dieses Workpackage wurde stark erweitert. Zum einen wurden deutlich mehr unterschiedliche Antigenkombinationen getestet als zunächst vorgesehen (was vor allem auf das breitere Antigenpanel und die damit einhergehende Kombinatorik zurückzuführen ist), zum anderen wurde die Studien um die europäische Zeckenart [redacted] und die entsprechenden Borrelien [redacted] erweitert. Dazu haben wir mit einem neuen Partner, [redacted], zusammengearbeitet. Durch den neuen Partner in der Nähe hatten wir außerdem die Möglichkeit die Immunisierungen selbst durchzuführen, was uns dazu veranlasst hat auch verschiedene [redacted] miteinzubeziehen.

WP6: Bestimmung der minimalen Proteinzusammensetzung für das Vakzin

Zur Bestimmung der minimalen Impfstoffzusammensetzung sollten laut ursprünglichem Antrag [redacted]-

Immunisierungsschema [redacted] immunisiert werden. Dafür sollten [redacted] Mäuse verwendet werden: [redacted]. Nach Infestation mit [redacted]-infizierten [redacted] Nymphen sollte die Übertragungsrate von [redacted] mittels qPCR und serologisch bestimmt werden. [redacted].

Auf Grund der Einschränkungen bedingt durch die Corona-Pandemie und Platzlimitierungen im Tierhaus, konnte dieses Workpackage nicht wie ursprünglich geplant mit unserem Partner, [redacted] durchgeführt werden. Um dennoch Hinweise auf die beste Antigen-kombination zu erhalten, haben wir von vorneherein parallel verschiedene Antigenkombinationen getestet und außerdem in einem „Fast Screening System" (vgl. WP4) [redacted] in einem *Tick-Feeding*-Experiment getestet um anschließend die vielversprechendsten in unserem Impfstoff zu kombinieren.

WP7: Projektmanagement, Geschäftsentwicklung, IP-Strategie und Teamentwicklung

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden zentrale Aufgaben zur Unterstützung des Projekts abgeschlossen. Schulungen in qPCR, präklinischen Studien und Projektmanagement bereiteten das Team auf wissenschaftliche und organisatorische Herausforderungen vor.

Das Team nahm an wichtigen Fachkonferenzen wie dem World Vaccine Congress, dem International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases und den Biotechnologietagen 2023 teil, was den Wissensaustausch und die Vernetzung mit Experten förderte. Zudem wurde das Coaching zur Erstellung des *Target Product Profiles* und eines klinischen Entwicklungsplans genutzt, um die strategische Ausrichtung zu stärken.

Im Bereich geistiges Eigentum erfolgte eine Patentanmeldung und eine FTO-Analyse. Die Norden Vaccines GmbH wurde 2019 gegründet. Der nächste wichtige Meilenstein war die Gewinnung von [redacted] als Investor, wodurch die Finanzierung über die GO-Bio Förderung hinaus gesichert wurde. [redacted] wurde nach dem Einstieg von [redacted] als Geschäftsführer benannt.

Die Vernetzung mit Arbeitsgruppen und CROs mit Expertise in zeckenübertragenen Erkrankungen, Tiermodellen sowie klinischer Entwicklung ([redacted]) wurde ausgebaut. Zudem erzielte das Projekt durch den Gewinn des Innovationspreises 2019 der Bioregionen Deutschlands zusätzliche Sichtbarkeit.

Gegenüber dem ursprünglichen Projektantrag wurden während der Projektlaufzeit noch zwei Arbeitspakete hinzugefügt. WP8 als [redacted]zur Erweiterung unseres Antigenrepertoires mit Antigenen aus [redacted], um [redacted] Effektivität unseres Impfstoffes auch gegen europäische Zecken zu erhöhen und WP9 als Reaktion auf eine wissenschaftliche Veröffentlichung von Dritten (Sajid et al. 2021), die nahelegt, dass das Mausmodell zur Induktion einer erworbenen Zeckenimmunität starke Limitierungen aufweist.

WP8: Identifizierung weiterer immunogener Zeckenproteine

Mit WP8 wollten wir unser Antigenreportoire erweitern. Dazu ist uns gelungen in Deutschland Probanden mit erworbener Zeckenimmunität zu akquirieren, die uns Serumproben zur Verfügung gestellt haben. Unser Partner [redacted] hat für uns [redacted] Nymphen nach 2 h und 18 h

Blutmahlzeit hergestellt, welches das Ausgangsmaterial für zwei neue *ORFeome*-Bibliotheken auf der Basis von [redacted] darstellen sollte. [redacted]

WP9: POC im Meerschweinchenmodell

Dieses WP umfasst die Arbeiten zum Proof of Concept im Meerschweinchen und konnte im Großen und Ganzen wie im Aufstockungsantrag 2022 dargestellt durchgeführt werden:

In einem ersten Schritt wurde eine *Feeding* Studie ähnlich zu WP4 durchgeführt. Für die *Feeding* Studie wurden Meerschweinchen mit der [redacted] immunisiert. Nach Abschluss der Immunisierung wurden die Meerschweinchen mit jeweils [redacted] besetzt. Die Bissstellen wurden regelmäßig untersucht, Entzündungsreaktionen dokumentiert und mit einem Scoring System bewertet, zudem wurde die Verweilzeit der Zecke auf dem Wirtstier sowie das Gewicht der Zecken nach der Blutmahlzeit erfasst.

Anschließend erfolgte eine weitere Studie mit Borrelien Challenge. Hierfür wurden Meerschweinchen mit der [redacted] immunisiert. Nach Abschluss der Immunisierung wurden die Meerschweinchen mit [redacted] besetzt und die Bissstellen dokumentiert. [redacted] nach der Challenge wurden die Tiere euthanisiert und Hautbiopsien von den Bissstellen und distalen Stellen genommen. Aus diesen wurde die DNA isoliert, um mittels qPCR den Infektionsstatus der Tiere bzw. die Borrelienlast zu bestimmen.

Zur Komplementierung des Datensets wurde die IgG-Immunantwort unseres Impfstoffes in diesem Tiermodell analysiert.

3. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse

3.1 Ergebnisse Antigen Produktion

WP1 umfasst die Arbeiten zur Produktion, Reinigung und Qualitätskontrolle der Antigene. Insgesamt wurden 16 Antigenkonstrukte kloniert ([redacted], wovon 14 Antigene rekombinant exprimiert, gereinigt und in Testimmunisierungen in der Maus eingesetzt werden konnten [redacted]. Basierend auf den Ergebnissen der Testimmunisierungen sowie der Challenge und *Feeding* Studien in der Maus wurden [redacted] Antigenen für die POC-Studien im Meerschweinchen ausgewählt. Die optimierten Produktionsbedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Reinigungsbedingungen der Antigene der finalen Impfstoffzusammensetzung entnehmen Sie bitte Tabelle 5 im Anhang.

Tabelle 1: Produktionsbedingungen der Antigene der finalen Impfstoffzusammensetzung

[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

3.2 Ergebnisse Testimmunisierungen

Um die Immunogenität unserer Antigene zu evaluieren, wurden Testimmunisierungen in Mäusen durchgeführt. Hier wurden unterschiedliche Dosierungen, Adjuvantien, Mausstämme und Verabreichungswege getestet und miteinander verglichen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die variablen Parameter. Der Fokus der Immunisierungen lag auf dem Vergleich der Immunisierungs-routen [redacted]. Die Immunisierungen mit den verschiedenen Antigenkombinationen [redacted] zeigte hinsichtlich der induzierten antigenspezifischen IgG-Titer keine nennenswerten systematischen Unterschiede. Die Titer (*end point dilution*) lagen konsistent im Bereich [redacted]. Die Immunisierung über die [redacted]. Die Evaluierung der zellulären Immunantworten mittels Elispot und Durchfluss-Zytometrie zeigte die Generierung einer Th1- und Th2-Immunantwort. [redacted] Die Analyse der multifunktionalen CD4-T-Zellen (IFNy, IL-2, TNFα) zeigte eine Überlegenheit [redacted]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunisierung [redacted]

Tabelle 2: Variable Parameter der Norden Vaccines GmbH Studien

Antigene	[redacted]
Antigen-Kombinationen	[redacted]
Adjuvans	[redacted]
Dosis [µg]	[redacted]
Route of Administration	[redacted]
Tiermodel	[redacted]
Studien Typen	[redacted]

[1] [redacted]

3.3 Antigenvalidierung

Zur Validierung der Antigene der finalen Impfstoffzusammensetzung wurden IgG-ELISA mit Serumproben von Probanden mit erworbener Zeckenimmunität durchgeführt. [redacted] was auf eine potenzielle Rolle dieser Antigene bei einer erworbenen Zeckenimmunität hindeutet.

Zur weiteren Validierung unserer Antigene wurde zudem ein Peptidarray durchgeführt. Hierzu wurden die Antigene in 15-mer Peptide unterteilt und mit einer Überlappung von 14 Aminosäuren auf einen Array „gedruckt“. Die Arrays [redacted]. Gebundene IgG-Antikörper aus den Seren wurden mithilfe fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper nachgewiesen. Auf diese Weise konnten wir sowohl die immunogenen Bereiche unserer Antigene identifizieren als auch unser Antigenpanel weiter validieren. [redacted]

Tabelle 3: Bestimmung immunogener Epitope der NV-Antigene

Antigen	Epitope [redacted]	Epitope [redacted]	Übereinstimmungen
[redacted]			

3.4 Mausstudien

[redacted] *Challenge*:/Kooperation [redacted]

In den *Proof of concept* Studien für unseren Zeckenimpfstoff wurden zunächst bei unserem Kooperationspartner [redacted] Mäuse mit unseren Antigenen immunisiert und anschließend mit von [redacted] besetzt. Die durch die Immunisierungen ausgelöste Immunantwort soll die Übertragung der Borrelien auf die Mäuse inhibieren. Die Inhibierung der Übertragung wurde mittels qPCR von Hautbiopsien untersucht.

Es konnte mit allen Antigenkombinationen ein antigenspezifischer IgG-Titer induziert werden. [redacted] Nach Abschluss der Immunisierungen wurden [redacted] auf die Mäuse gesetzt und die Borrelienübertragung wurde durch die qPCR-Analyse der Mausbiopsien ermittelt. Die mittels qPCR bestimmte Anzahl der Genkopien des *Bb recA* Gens wurde auf 20.000 *Mus musculus* (Mn) *nido* Gene normalisiert und sind in Abbildung 1 für jede Gruppe der *Challenge* dargestellt. [redacted]

Gruppe	Anzahl infiziert/Gesamt
[redacted]	[redacted]

* Die Werte dieser Gruppe wichen in einem signifikanten Maße von den Werten der Kontrollgruppe Ab (Kruskal- Wallis-ANOVA, Dunn's Test, P<0,05)

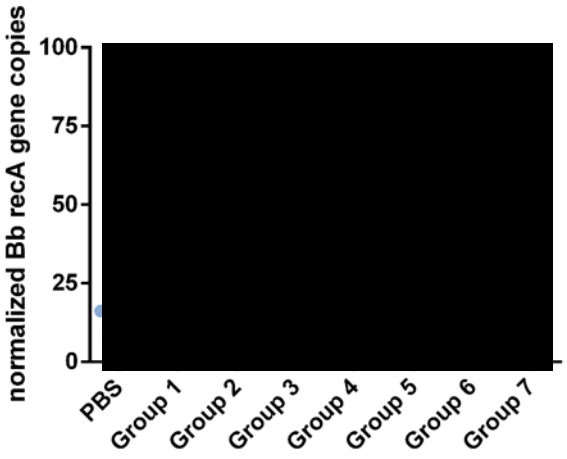

Abbildung 1: Infektionsstatus der immunisierten [redacted] Mäuse nach [redacted] Challenge ermittelt durch qPCR-Nachweis von recA Genkopien in Hautbiopsien aus den Ohren

[redacted] *Challenge/ Kooperation* [redacted]

Um das *proof of concept* um europäische Zeckenarten zu erweitern, [redacted] zu adressieren, wurde gemeinsam mit einem neuen Kooperationspartner, der [redacted], eine weitere *Challenge* Studie geplant. Die Ergebnisse der *Challenge* Studie sind in Tabelle 4 zusammengetragen.

Zunächst wurden Parameter untersucht, die Rückschlüsse auf den Erfolg der Blutmahlzeit ziehen lassen. Der s*cutal index* ist das Verhältnis zwischen der Bauchlänge der Zecke und der Breite des Scutums und dient wie sonst das *engorgement weight* als ein Maß für die Blutaufnahme einer Zecke. [redacted] der *scutual index* der Nymphen [redacted]

[redacted] Analysen des Infektionsstatus der Mäuse mittels Nested-PCR an xenodiagnostischen Larven und an Hautproben der Bissstellen zeigten, [redacted].

Feeding Studien

In den *Feeding* Studien in der Maus sollte untersucht werden, inwiefern eine Immunisierung von Mäusen mit unseren Antigenen sowie Kombinationen daraus einen Einfluss auf die Blutmahlzeit der Zecken hat. [redacted] Unterschiede im Gewicht der Zecken nach einer Blutmahlzeit an immunisierten Mäusen [redacted] Dauer der Blutmahlzeit [redacted] Hautreaktionen wie Rötungen und Hämatome an den Stellen der Zeckenbisse beobachtet. Eine solche lokale Entzündungsreaktion könnte beim Menschen ausreichen, um den Zeckenstich rechtzeitig zu bemerken und die Zecke zu entfernen, bevor Krankheitserreger übertragen werden.

Tabelle *4*: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausstudien mit [redacted]; oben: Ergebnisse der Borrelien *Challenge*, unten: zusammengefasste Ergebnisse der *Feeding* Studien

Treatment group	No. mice	Infected nymphs					No. skin reactions			Xenodiagnostic larvae (Day 81)		Skin sample (Day 90)	
		No. engorged	Mean scutal index	Mean no. days for feeding	No. pools examined	% pools infected	reddening	hematome	swelling	No. examined	% infected	No. examined	% infected
Control	[redacted]												
[redacted]													
[redacted]													
[redacted]													
[redacted]													

* differs significantly from control, $p < 0.05$, ANOVA with Dunnett multiple comparison test

Treatment group	No. mice	No. engorged	Median engorgement weight	Median abdomen length	Mean no. days for feeding	Mean no. skin reactions per mouse (recounted each day when present)			remarks about ticks
						small red dots	reddening	hematome	
Control	[redacted]								
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
Control	[redacted]								
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
[redacted]									
Control	[redacted]								
[redacted]									
[redacted]									
* [redacted]									
[redacted]									

3.5 Meerschweinchen Studien

Immunanalysen

In den Meerschweinchen Studien wurden [redacted] Tieren eingesetzt. Die Immunisierung erfolgte nach [redacted] da dieses Immunisierungsschema im Mausmodell sehr verlässlich zu hohen Antikörpertitern geführt hat. Die Verabreichung des Impfstoffkandidaten [redacted] führte zu IgG-Titern gegen den Antigen-Mix [redacted] Schaut man sich die Immunantworten gegen die einzelnen Antigene an, [redacted]

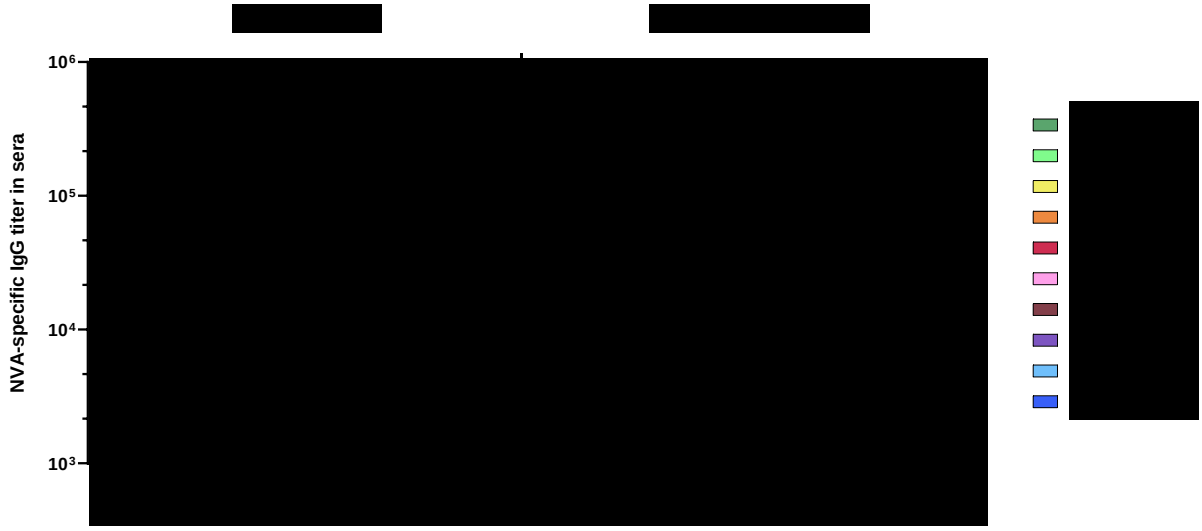

Abbildung 2: Induzierte IgG-Titer gegen die in der Studie eingesetzten Antigenkombination sowie der darin enthaltenen Einzelantigene im Meerschweinchen

Feeding Analyse

In der *Feeding* Studie im Meerschweinchen sollte untersucht werden, inwiefern eine Immunisierung mit unserer finalen Antigenkombination einen Einfluss auf die Blutmahlzeit der Zecken hat und ob die immunisierten Meerschweinchen Hautreaktionen aufweisen. Hierfür wurden nach Abschluss der Immunisierung die Meerschweinchen [redacted] besetzt. Die Bissstellen wurden regelmäßig untersucht, Entzündungsreaktionen (Juckreiz, Rötungen und Ödeme) dokumentiert und mit einem Scoring System bewertet. Zudem wurde die Verweilzeit der Zecke auf dem Wirtstier sowie das Gewicht der Zecken nach der Blutmahlzeit erfasst. In Abbildung 3 ist beispielhaft die Auswertung des Juckreiz 24 h nach Zeckenbesatz, sowie die Gewichte der Zecken, die an Studientag 75 abgefallen sind, dargestellt.

[redacted]

[redacted]

Das Gewicht der Zecken, die auf den immunisierten Meerschweinchen ihre Blutmahlzeit genommen haben, [redacted]

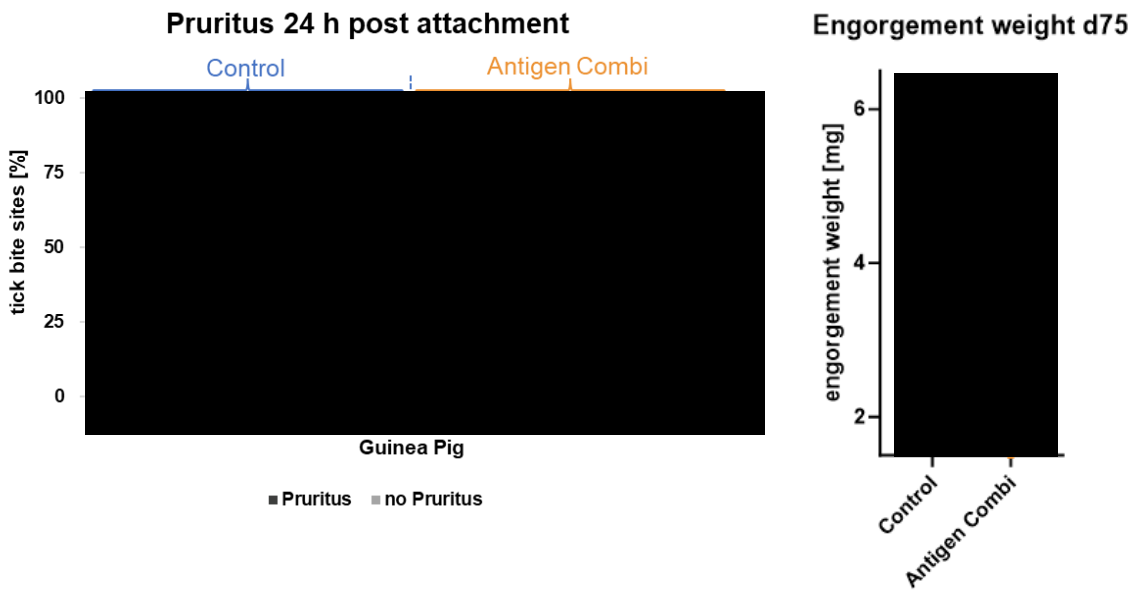

Abbildung 3: Juckreiz nach 24h Zeckenbesatz und Zeckengewichte der vollgesogenen Zecken an Studientag 75

<u>Borrelienübertragung</u>

Das eigentliche *Proof of Concept* soll durch eine Borrelien Challenge Studie erfolgen. Hierfür wurden jeweils [redacted] Meerschweinchen mit der [redacted] nach einem [redacted] immunisiert und anschließend mit [redacted] besetzt. Drei Wochen nach der Challenge wurden die Tiere euthanasiert und jeweils fünf Biopsien der Bissstellen („bite sites“) sowie fünf weiter entfernt liegende Biopsien (distal) entnommen.

Um ein sensitives und zuverlässiges Read-Out der Borrelien-Challenge zu realisieren, wurde das qPCR-Protokoll zum Erregernachweis optimiert. [redacted]

Zur Analyse der Borrelienübertragung aus der Zecke bzw. Borrelieninfektion der Versuchstiere wurde die DNA aus den Hautbiopsien isoliert [redacted] Die distale Probe kann Auskunft über die systemische Ausbreitung der Bakterien innerhalb des

Versuchstieres geben. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben wurden die ermittelten Genkopien gegen das Referenzgen β-Actin des Meerschweinchens normalisiert.

In den Hautbiopsien der Bissstellen [redacted] Bei den distalen Proben lag die Infektionsrate [redacted]

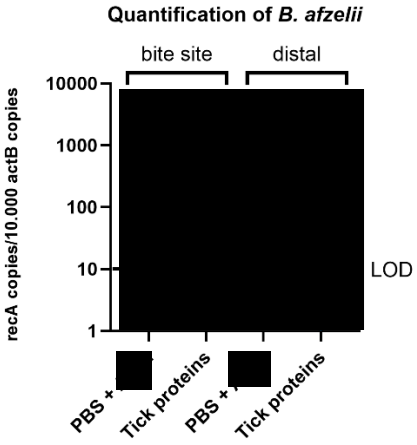

Abbildung 4: qPCR-Ergebnisse zur Quantifizierung von [redacted] in Hautbiopsien (bite site und distal) von immunisierten Meerschweinchen

[redacted]

Abbildung 5: Antigenspezifische IgG-Titer nach Immunisierung der Meerschweinchen in der Challenge Studie

Validierung der Ergebnisse bisheriger Mausstudien zur Borrelienübertragung (-Studie)

Nachdem wir eine verbesserte qPCR zur Quantifizierung von Borrelien entwickelt haben, wurden ausgewählte Proben der mit einem angepassten Protokoll der qPCR geprüft.

4. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Nachfolgenden geben wir einen Überblick über die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises und führen auf, ob Mittel wie beantragt verwendet werden konnten oder ob es größere Abweichungen und/oder Umwidmungen gab.

Position 0812 (+ 0822): Personalkosten

Der Bedarf an Personalkosten war aufgrund der schrittweisen Verlängerung der Projektlaufzeit von 2 Jahren auf ca. 5,5 Jahre deutlich höher als bei einer Laufzeit von 2 Jahren vorgesehen. Nur durch diese notwendigen Verlängerungen konnte das Projekt so weit vorangetrieben werden, dass ein Investor

gewonnen werden konnte. Neben der Laufzeitverlängerung hat sich auch die Zusammensetzung des Teams im Verlauf des Projekts geändert. Durch die Neubesetzungen mit wissenschaftlichen Mitarbeitern für den Laborbetrieb waren Arbeiten zur Identifikation neuer Antigenkandidaten, der Antigenproduktion sowie für die Optimierung der qPCR sowie der Datenauswertung der Challengestudien mittels qPCR möglich. Der Mehrbedarf an Mitteln wurde vorrangig aus beantragten Mittelumwidmungen sowie Aufstockungen gedeckt.

Position 0835: Vergabe von Aufträgen

Die ursprünglich für die Zusammenarbeit mit der [redacted] geplanten Mittel, wurden nach vorzeitiger Beendigung der Zusammenarbeit durch die Fortführung der geplanten Arbeiten mit anderen Forschungsdienstleistungsunternehmen in etwa wie geplant verausgabt. Durch den Wechsel des Tiermodells von Maus auf Meerschweinchen war der Mittelbedarf jedoch etwas höher als ursprünglich veranschlagt. Der Mehrbedarf wurde durch die beantragte Aufstockung finanziert. Durch die vergebenen Aufträge konnten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

[redacted] Auftragsforschung zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen Zecken

- Sammeln von Serum von Probanden mit erworbener Zeckenimmunität
- Testimmunisierungen in [redacted] Mäusen mit anschließender Immunanalyse (ELISA, Elispot, FACS)
- Wiederholter Zeckenbesatz [redacted] Mäusen mit anschließender *Challenge* durch [redacted] infizierte Zecken, qPCR-Analyse zur Überprüfung des Infektionsstatus
- Immunisierungen mit Sieben verschiedenen Antigenmischungen + Kontrollen mit anschließender *Challenge* durch *B.* [redacted], Analyse der Immunantwort mittels ELISA, qPCR auf DNA-Isolation aus Hautbiopsien zur Ermittlung des Infektionsstatus
- Anzucht (und Infektion) von [redacted] Nymphen für oben genannte Arbeiten

[redacted] Auftragsforschung zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen Zecken

- *Challenge*-Studie mit *B.* [redacted] Mäusen
- *Feeding*-Studie Einzelantigene (2x) in [redacted] Mäusen
- *Feeding*-Studie Antigenkombinationen in [redacted] Mäusen

[redacted]: Auftragsforschung zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen Zecken

- *Feeding* Studie im Meerschweinchen
- *Challenge* Studie im Meerschweinchen

Position 0843: sonst. Allgemeine Verwaltungsausgaben inkl. Gesperrter Mittel

Die benötigten Labormaterialien und Sachmittel konnten mit den beantragten Mitteln vollständig abgedeckt werden. Neben gängigem Verbrauchsmaterial fallen darunter unter anderem Kits zur Präparation von Zecken-RNA und DNA sowie zur cDNA-Synthese. Für die Proteinproduktion sind insbesondere synthetische Gene, Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie und zur Entsalzung, Chemikalien und Filter für die Herstellung der Puffer sowie kommerzielle SDS-Gele und Endotoxin-Test Kits für die Qualitätskontrolle der aufgereinigten Proteine zu nennen. Weitere Posten sind qPCR-Materialien (darunter insbesondere SYBR-Green Enzym Mix und 96-Well PCR-Platten) sowie die Bestellung von Mäusen für die Immunisierungen. Da die anfallenden Kosten zum Zeitpunkt der

Antragstellung zu hoch eingeschätzt wurden, wurden aus diesem Posten im Verlauf des Projekts Mittel in andere Positionen umgewidmet.

Der gesperrte Anteil an Mitteln aus dieser Position wurde ebenfalls nicht vollständig verausgabt. Aufgrund des hohen bürokratischen Aufwands, der für die Verwendung dieser Mittel vom ursprünglichen Projektträger PTJ gefordert wurde, war es in der Anfangszeit des Projekts kaum möglich die Mittel entsprechend ihrer Bestimmung zu verwenden. Zudem waren ursprünglich geplante Ausgaben durch wesentliche Änderungen im Projekt nicht nötig:

- Coaching im Bereich Business Development konnte aufgrund der im Team vorhandenen Expertise eingespart werden
- Ausgaben für weitere Patente fallen erst an sobald ein PoC im Tiermodell erbracht ist

Gesperrte Mittel konnten wie beantragt genutzt werden für:

- Coaching/Unterstützung bei der Entwicklung eines *Target Product Profiles* (TPP) [redacted]
- Erstellung eines klinischen Entwicklungsplans [redacted]
- FTO-Analyse [redacted]
- Fortbildungen der Mitarbeiter in den Bereichen qPCR, präklinischen Studien und Projektmanagement

Position 0846: Dienstreisen

In dieser Position wurden deutlich weniger Mittel benötigt als ursprünglich beantragt, da aufgrund der Reisebeschränkungen durch die Corona-Pandemie sowie der vorzeitigen Beendigung der Zusammenarbeit mit [redacted] die Forschungsaufenthalte in [redacted] nicht wie geplant umgesetzt werden konnten. Zudem haben wir uns bei Konferenzteilnahmen, wo möglich, auf die Teilnahme an geeigneten Konferenzen in Europa statt den USA bzw. online-Teilnahmen beschränkt. Ein vom ursprünglichen Geschäftsführer angesetztes Investoren-Treffen in den USA konnte durch Gewinnung eines Investors aus Deutschland entfallen.

Position 0850: Geräte über 410 €

Die Mittel für die Anschaffung von Geräten konnten wie beantragt verausgabt werden. Es wurden ein MacsQuant Durchflusszytometer für immunologische Analysen und ein Äkta Pure Chromatographie-system zur Protein Aufreinigung angeschafft.

5. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Aufgrund des hohen finanziellen Aufwands insbesondere zur Finanzierung der Tierstudien und des Personals wäre eine Umsetzung des Projekts ohne öffentliche Förderung, nur durch Eigenkapital nicht möglich gewesen. Durch den ausgeprägten Translationsbezogenen Ansatz und da es sich bei dem Projekt um eine Produkt- und Firmenentwicklung handelt, war auch keine DFG-Förderung möglich, die eher darauf abzielt Grundlagenforschung zu unterstützen. Eine Risikokapitalfinanzierung wurde zu diesem frühen Zeitpunkt nicht in Betracht gezogen, da es hierbei um die Umsetzung einer universitären Idee geht und noch keine ausreichende Datengrundlage für einen Risikokapitalgeber vorhanden war. Diese wurde während der GO-Bio I Förderung geschaffen, so dass wir nun einen Investor finden konnten, der die Finanzierung weiterer präklinischer Studien sichert.

6. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

6.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten für das Norden Vaccines Projekt haben sich seit Projektbeginn nicht signifikant verändert. Nach wie vor gibt es keinen Impfstoff gegen Zecken zur Anwendung im Menschen in klinischer Entwicklung. Die wichtigsten Konkurrenten für unser Produkt sind demzufolge zum einen die bereits zugelassenen Impfstoffe gegen FSME (Encepur und FSME-Immun®/ TicoVac™/ TICOVAC™) sowie ein noch nicht zugelassener Impfstoff gegen Borrelien (VLA15). Für den OspA-Impfstoff VLA15 gibt es bereits positive Daten aus den Phase-2 Studien. Erst diesen Monat wurden positive Immunogenitäts- und Sicherheitsdaten nach einer zweiten Auffrischungsimpfung (Booster) aus dieser Phase 2-Studie publiziert (Bézay et al. 2024). Zudem startete im August 2022 eine klinische Phase-3-Studie, die voraussichtlich bis Ende 2025 abgeschlossen sein wird, um die Wirksamkeit, Sicherheit und Immunogenität gegen Borreliose zu untersuchen. Doch auch bei erfolgreichem Verlauf der Entwicklung, wird der Impfstoff nicht den Vorteil unseres Produkts haben, Immunität gegen die Zecken selbst zu vermitteln und damit vor einer Vielzahl übertragbarer Erreger zu schützen. Ein Impfstoff, der sich gegen die Zecke selbst richtet, ist bisher noch nicht in klinischer Entwicklung. Für ein mRNA-Vakzin basierend auf einer Kombination aus 19 Antigenen konnte Ende 2021 das *Proof of Concept* im Tiermodell Meerschweinchen gezeigt werden. Danach sind zu diesem Impfstoff keine weiteren Daten mehr veröffentlicht worden. Eine genauere Stellungnahme zu diesen Arbeiten und ihren Schwächen entnehmen Sie bitte Kapitel 7. Für diesen Impfstoff gibt es aktuell keine Hinweise auf eine Weiterentwicklung in Richtung klinische Studien.

Durch den Einstieg eines Investors können nach Abschluss der GO-Bio Förderung die bisherigen Studien fortgeführt bzw. erweitert werden, sodass nach erfolgreichem PoC weitere Investoren für die Weiterentwicklung des Impfstoffs gewonnen werden sollen (siehe Abschnitt 6.3).

6.2 Wissenschaftliche / technische Erfolgsaussichten

Die größte Herausforderung in diesem Projekt oder generell bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Zecken liegt zweifelsohne in der Wahl der geeigneten Kombination aus Wirtstier, Zeckenstamm und Modellpathogen. Zu Beginn des Projekts haben wir uns hier auf die Expertise unseres amerikanischen Kooperationspartners verlassen, mussten aber lernen, dass wir diesem Punkt deutlich mehr Beachtung schenken müssen.

Die Schwächen der Tiermodelle Maus und Meerschweinchen bzgl. einer Borrelien Infektion zeigen sich durch fehlende Symptomatik einer Erkrankung [redacted]

Mithilfe eines Peptidmicroarrays konnten Daten generiert werde, die uns Ansatzpunkte zur weiteren Optimierung unseres Impfstoffes liefern, [redacted] Hierfür etablieren wir aktuell eine Zusammenarbeit mit einem anderen Startup, das eine Möglichkeit einer neuen innovativen Impfstoffformulierung [redacted]

Während der Projektlaufzeit hat ein kontinuierlicher Aufbau eines Netzwerks mit relevanten Akteuren in der Region stattgefunden. Durch den Aufbau dieses Netzwerks konnte die im Team vorhandene

Expertise erweitert werden sowie die Akteure untereinander vernetzt werden. Dieses Netzwerk aus dem [redacted] und der TU Braunschweig sowie der Norden Vaccines GmbH ermöglicht einen kontinuierlichen schnellen Wissenstransfer, der die Weiterentwicklungen des Impfstoffkandidaten erheblich voranbringen kann.

6.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Im Rahmen des Zecken-Projekts wurde mit der TU Braunschweig ein Patent über die Nutzung der Metalloprotease und des Thrombin Inhibitors als Zeckenimpfstoff in der EU, Indien, den USA und Kanada angemeldet. Diese Länder verzeichnen die meisten Fälle von zeckenübertragenen Krankheiten und sind zudem als Pharma(produktions)standorte bekannt. Im April 2019 wurden Daten aus den ersten Immunisierungsstudien genutzt, um die Patentschrift zu erweitern. Die Verhandlungen der Norden Vaccines GmbH mit der TU Braunschweig bezüglich der Konditionen für eine Exklusivlizenz sind größtenteils abgeschlossen. Ein Vertrag zwischen der Norden Vaccines GmbH und der TU Braunschweig zur weiteren Nutzung der im Rahmen der GO-Bio I Finanzierung angeschafften Geräte wurde geschlossen.

Nach erfolgreichem *Proof of Concept* ist die Anmeldung weiterer Patente für die zusätzlichen Antigene/Peptide geplant. Dies soll die Norden Vaccines GmbH bei entsprechender Datenlage in die Lage versetzen, erfolgreich zusätzliche externe Finanzierung einzuwerben und so eine Weiterentwicklung des Produktes über die GO-Bio Förderung hinaus, durch die Präklinik bis in die klinischen Phasen hinein, zu gewährleisten. Ein Exit nach klinischen Studien I oder II ist weiter anvisiert.

Durch den Einstieg eines Investors können nach Abschluss der GO-Bio Förderung die bisherigen Studien fortgeführt bzw. erweitert werden. [redacted]

7. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden in zwei fast zeitgleichen Publikationen Ergebnisse einer amerikanischen Forschungsgruppe um Erol Fikrig veröffentlicht. (Sajid et al. 2021; Matias et al. 2021). In diesen Publikationen wird die Entwicklung eines Zeckenimpfstoffs, bestehend aus 19 verschiedenen mRNAs beschrieben. Es wurden verschiedene Tiermodelle (Maus und Meerschweinchen) miteinander verglichen, sowie verschiedene Impfstoffformulierungen (mRNA, DNA und Protein). Die Artikel bieten interessante Ansätze, weisen jedoch auch wesentliche Schwächen auf:

Immunogenität der Antigene: Von den 19 getesteten Antigenen waren nur 10 immunogen, laut der zweiten Studie ist sogar nur ein einziges Antigen ausreichend, um eine Rötung im Meerschweinchen zu induzieren. Die Rötung allein bedeutet jedoch nicht, dass ein Schutz vor Borrelienübertragung gegeben ist.

Schutz vor Borrelienübertragung: Der Schutz wurde nur bei der Entfernung der Zecken nach Auftreten einer Rötung nachgewiesen. Wurden Zecken bis zum Ende der Blutmahlzeit auf den Meerschweinchen belassen konnte kein Schutz erzielt werden.

Infektionsrate der Kontrolltiere: Die niedrige Infektionsrate der Kontrolltiere (<50%) mindert die Belastbarkeit der Ergebnisse.

Anzahl und Infektionsrate der Zecken: Die Verwendung von nur 3 infizierten Zecken pro Tier und fehlende Angaben zur Infektionsrate der Zecken schränken die Interpretierbarkeit der Ergebnisse ein.

Entnahmestelle der Biopsien: Der Artikel liefert keine Details zur Entnahmestelle der Hautbiopsien, obwohl diese, laut unseren Studien für die Borrelienlast entscheidend sind.

Verarbeitung der qPCR-Daten: Die stark verarbeiteten qPCR-Daten erschweren die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse. Eine detailliertere Darstellung der Rohdaten wäre hilfreich.

Vergleich mit anderen Darreichungsformen: Eine zeitgleich veröffentlichte Studie zeigt, dass der mRNA-Impfstoff gegenüber anderen Darreichungsformen überlegen ist, jedoch wurde im Vergleichsartikel entgegen gängiger Praxis kein Adjuvans für den Proteinimpfstoff verwendet.

Insgesamt zeigen die Artikel vielversprechende Ansätze, leiden jedoch unter methodischen und interpretativen Schwächen, die die Relevanz der Ergebnisse einschränken. Eine für uns sehr relevante Erkenntnis war der Vergleich der Tiermodelle. Während im Meerschweinchen durch die Immunisierung eine erworbene Zeckenimmunität induziert werden konnte (einhergehend mit Rötungen und reduzierter Blutmahlzeit) war dies im Selben Setting in der Maus nicht möglich. Dieses Ergebnis hat uns dazu bewogen, die Wahl unseres Tiermodells nochmals zu überdenken und für die späteren Studien auf das Meerschweinchen zu setzen.

8. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Bisher sind keine Ergebnisse aus diesem Projekt in Fachjournals, o. ä. veröffentlicht, eine Publikation mit Schwerpunkt auf die Meerschweinchen Studien und die qPCR-Optimierung ist aktuell in Vorbereitung. Aus IP-rechtlichen Gründen ist eine Veröffentlichung zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht sinnvoll.

9. Quellenverzeichnis

Becker, Martin, André Felsberger, André Frenzel, Wendy M. C. Shattuck, Megan Dyer, Jonas Kügler, Jonas Zantow, Thomas N. Mather, and Michael Hust. 2015. "Application of M13 Phage Display for Identifying Immunogenic Proteins from Tick (Ixodes Scapularis) Saliva." *BMC Biotechnology* 15 (1): 43. https://doi.org/10.1186/s12896-015-0167-3.

Choi, Edwin, Natasha J. Pyzocha, and Douglas M. Maurer. 2016. "Tick-Borne Illnesses." *Current Sports Medicine Reports* 15 (2): 98–104. https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000238.

Contreras, Marinela, and José De La Fuente. 2016. "Control of Ixodes Ricinus and Dermacentor Reticulatus Tick Infestations in Rabbits Vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin Chimera." *Vaccine* 34 (27): 3010–13. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.092.

Frimmel, Silvius, Anja Krienke, Diana Riebold, Micha Loebermann, Martina Littmann, Karin Fiedler, Christine Klaus, Jochen Süss, and Emil Christian Reisinger. 2014. "Tick-Borne Encephalitis Virus Habitats in North East Germany: Reemergence of TBEV in Ticks after 15 Years of Inactivity." *BioMed Research International* 2014:1–5. https://doi.org/10.1155/2014/308371.

Gomes, Helga, Jorge Moraes, Naftaly Githaka, Renato Martins, Masayoshi Isezaki, Itabajara Da Silva Vaz, Carlos Logullo, Satoru Konnai, and Kazuhiko Ohashi. 2015. "Vaccination with Cyclin-Dependent Kinase Tick Antigen Confers Protection against Ixodes Infestation." *Veterinary Parasitology* 211 (3–4): 266–73. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.022.

Hofmann, Heidelore, Volker Fingerle, Klaus-Peter Hunfeld, Hans-Iko Huppertz, Andreas Krause, Sebastian Rauer, and Bernhard Ruf. 2017. "Cutaneous Lyme Borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society." *GMS German Medical Science* 15 (September):Doc14. https://doi.org/10.3205/000255.

Ismail, Nahed, and Jere W. McBride. 2017. "Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis." *Clinics in Laboratory Medicine* 37 (2): 317–40. https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006.

John, Manuel, M Raman, and Keith Ryan. 2017. "A Tiny Tick Can Cause a Big Health Problem." *Indian Journal of Ophthalmology* 65 (11): 1228–32. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_411_17.

Jonsson, N.N., A.L. Matschoss, P. Pepper, P.E. Green, M.S. Albrecht, J. Hungerford, and J. Ansell. 2000. "Evaluation of TickGARDPLUS, a Novel Vaccine against Boophilus Microplus, in Lactating Holstein–Friesian Cows." *Veterinary Parasitology* 88 (3–4): 275–85. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00213-7.

Matias, Jaqueline, Cheyne Kurokawa, Andaleeb Sajid, Sukanya Narasimhan, Gunjan Arora, Husrev Diktas, Kathleen DePonte, et al. 2021. "Tick Immunity Using mRNA, DNA and Protein-Based Salp14 Delivery Strategies." *Vaccine* 39 (52): 7661–68. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.003.

Miller, Robert, Agustín Estrada-Peña, Consuelo Almazán, Andrew Allen, Lauren Jory, Kathleen Yeater, Matthew Messenger, Dee Ellis, and Adalberto A. Pérez De León. 2012. "Exploring the Use of an Anti-Tick Vaccine as a Tool for the Integrated Eradication of the Cattle Fever Tick, Rhipicephalus (Boophilus) Annulatus." *Vaccine* 30 (38): 5682–87. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.061.

Nelson, Christina A., Shubhayu Saha, Kiersten J. Kugeler, Mark J. Delorey, Manjunath B. Shankar, Alison F. Hinckley, and Paul S. Mead. 2015. "Incidence of Clinician-Diagnosed Lyme Disease, United States, 2005–2010." *Emerging Infectious Diseases* 21 (9): 1625–31. https://doi.org/10.3201/eid2109.150417.

Sajid, Andaleeb, Jaqueline Matias, Gunjan Arora, Cheyne Kurokawa, Kathleen DePonte, Xiaotian Tang, Geoffrey Lynn, et al. 2021. "mRNA Vaccination Induces Tick Resistance and Prevents Transmission of the Lyme Disease Agent." *Science Translational Medicine* 13 (620): eabj9827. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj9827.

Schetters, Theo, Richard Bishop, Michael Crampton, Petr Kopáček, Alicja Lew-Tabor, Christine Maritz-Olivier, Robert Miller, et al. 2016. "Cattle Tick Vaccine Researchers Join Forces in CATVAC." *Parasites & Vectors* 9 (1): 105. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1386-8.

Shapiro, Eugene D. 2014. "Borrelia Burgdorferi (Lyme Disease)."

Trager, William. 1939. "Acquired Immunity to Ticks." *The Journal of Parasitology* 25 (1): 57–81. https://doi.org/10.2307/3272160.

Vonesch, Nicoletta, Maria Concetta D'Ovidio, Paola Melis, Maria Elena Remoli, Maria Grazia Ciufolini, and Paola Tomao. 2016. "Climate Change, Vector-Borne Diseases and Working Population."

Wikel, Stephen K. 1996. "Host Immunity to Ticks."

Zantow, Jonas, Sarah Just, Ilias Lagkouvardos, Sigrid Kisling, Stefan Dübel, Patricia Lepage, Thomas Clavel, and Michael Hust. 2016. "Mining Gut Microbiome Oligopeptides by Functional Metaproteome Display." *Scientific Reports* 6 (October):34337. https://doi.org/10.1038/srep34337.

Zantow, Jonas, Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira, Stefan Dübel, and Michael Hust. 2018. "ORFeome Phage Display." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1701:477–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7447-4_27.

10. Anhang

10.1. Tabellen

Tabelle 5: Reinigungsbedingungen der Antigene der finalen Impfstoffzusammensetzung

	Purification buffers					
Antigen	**Binding**	**Washing**	**Elution**	**Exchange**	**Expression-system**	**Yield** (mg/L-culture)
N						

10.2. Abbildungen

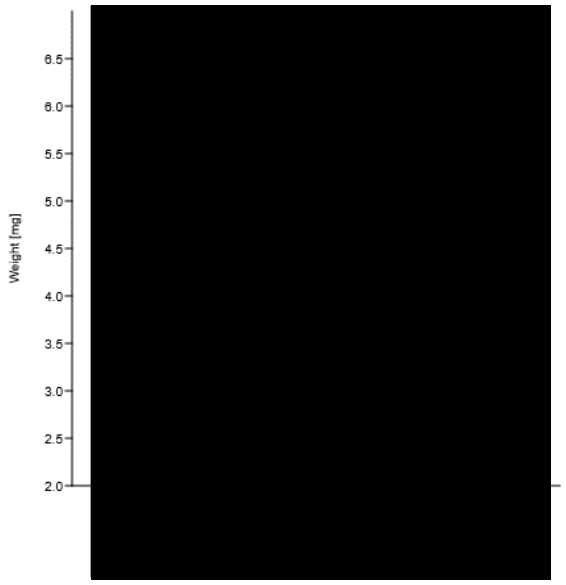

Abbildung S 1: Gewicht der vollgesogenen Zeckennymphen (in mg) aus der Feeding Studie auf immunisierten (Antigenkombinationen) [redacted] Mäusen (Kooperation [redacted]). Die bimodale Verteilung der Werte lässt sich durch die spätere Entwicklung der Nymphen in adulte Weibchen und adulte Männchen erklären.

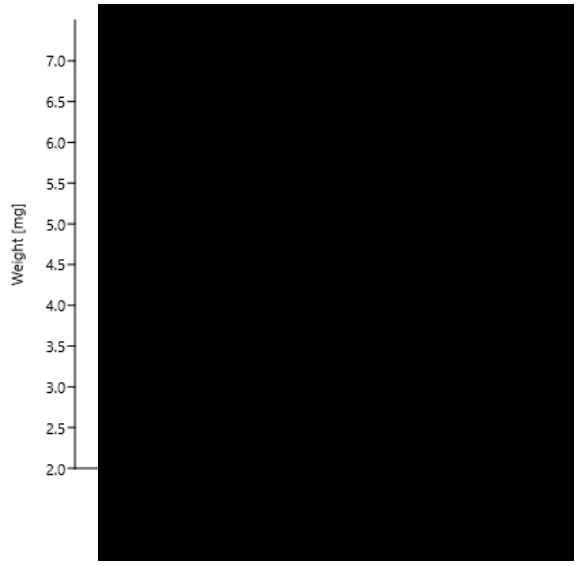

Abbildung S 22: Gewicht der vollgesogenen Zeckennymphen (in mg) aus der Feeding Studie auf immunisierten (Einzelantigene I) [redacted] Mäusen (Kooperation [redacted]). Die bimodale Verteilung der Werte lässt sich durch die spätere Entwicklung der Nymphen in adulte Weibchen und adulte Männchen erklären.

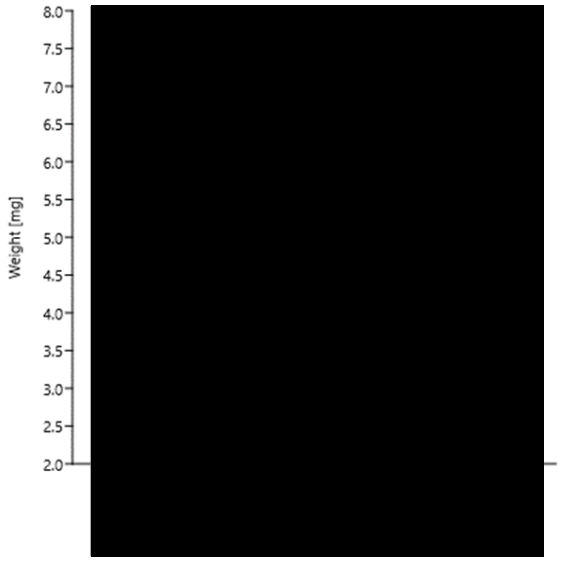

Abbildung S 3: Gewicht der vollgesogenen Zeckennymphen (in mg) aus der Feeding Studie auf immunisierten (Einzelantigene II) [redacted] Mäusen (Kooperation [redacted]). Die bimodale Verteilung der Werte lässt sich durch die spätere Entwicklung der Nymphen in adulte Weibchen und adulte Männchen erklären.