

**Volker Biermann: Untersuchungen zum Einfluss von Kapsid-Modifikationen auf den Tropismus und die Transduktionseigenschaften adenoviraler Gentransfervektoren großer DNA-Kapazität. 2003**

Adenovirale Gentransfer-Vektoren können ein breites Spektrum an proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen sehr effizient transduzieren und sind deshalb für Anwendungen in der somatischen Gentherapie von besonderem Interesse. Durch die Entwicklung der adeno- viralen Vektoren großer DNA-Kapazität (HC-Ad-Vektoren) konnten die Eigenschaften adenoviraler Vektoren deutlich verbessert werden. HC-Ad-Vektoren besitzen eine hohe Aufnahmekapazität für fremde DNA sowie eine geringe Immunogenität und Toxizität. Sie zeichnen sich weiterhin durch eine lange Expression ihrer Transgene aus. HC-Ad-Vektoren transduzieren jedoch einige klinisch relevante Zellarten wie Endothelzellen, glatte Muskel- zellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs sowie einige Tumorzelltypen nur in unzurei- chendem Maße. Für eine breite Anwendung von HC-Ad-Vektoren in der somatischen Gentherapie ist eine Steigerung ihrer Transduktionseffizienz und -spezifität für solche Zellarten deshalb essentiell. Eine Möglich- keit, den Zelltropismus und damit die Transduk- tionseigenschaften von HC-Ad-Vektoren zu verändern, besteht im Einbau von Peptid- Liganden in das adenovirale Kapsid. Dabei hat sich der HI-Loop des Kapsid-Proteins Fiber als ein geeigneter Insertionsort erwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden der Tropismus und damit die Transduktionseigenschaf- ten von HC-Ad-Vektoren durch den Einbau heterologer Peptide in das Vektor-Kapsid verän- dert. Die Peptide wurden in den Fiber-HI-Loop von Helferviren inseriert, die für die Produk- tion von HC-Ad-Vektoren verwendet werden. Solcherart modifizierte HC-Ad-Vektoren transduzierten Zellen, die sich normalerweise nur sehr schlecht mit adenoviralen Vektoren transduzieren lassen, deutlich effizienter. Es wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Tropismus-Modifikation untersucht. Als erstes wurden heterologe Peptid-Liganden, die an Rezeptoren auf Zellen binden, in den Fiber-HI-Loop eingebaut. Als Liganden wurden das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-bindende RGD-Peptid CDCRGDCFC, ein Heparansulfat-bindendes Poly- Lysin sowie CD4- bzw. CD8-bindende Peptide in den Fiber-HI-Loop inseriert und ihr Einfluß auf die Transduktion von Ovarialkarzinomzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Gefäßwand, Dendritischen Zellen und peripheren T-Zellen untersucht. Mit einem RGD-modi- fizierten HC-Ad-Vektor ließen sich im Vergleich zu einem nicht modifizierten HC-Ad-Vektor Ovarialkarzinomzellen bis zu 20-fach, Endothelzellen 15-fach und glatte Muskelzellen der Gefäßwand 13-fach effizienter transduzieren. Die Modifikation eines HC-Ad-Vektors mit Poly-Lysin führte zu einer erhöhten Transduktionseffizienz für Dendritische Zellen der Maus. Auf die Transduktion humaner Dendritischer Zellen hatte die Poly-Lysin-Modifikation jedoch keinen Einfluß. Der Einbau von CD4- bzw. CD8-bindenden Peptiden führte zu keiner Steige- rung der Transduktionseffizienz oder spezifität für periphere T-Zellen. Um die Insertion von heterologen Peptid-Sequenzen in den Fiber-HI-Loop von Helferviren zu vereinfachen und in einem einzelnen Klonierungsschritt zu ermöglichen, wurden in das Helfervirus-Plasmid pVB5 singuläre PacI/ClaI-Restriktionsschnittstellen nach Nukleotid 32670 der Ad5-Sequenz inseriert, korrespondierend zur Aminosäure 543 des Fiber-Proteins. Die Funktionalität von pVB5 für die Produktion Kapsid-modifizierter HC-Ad-Vektoren wurde anhand der RGD-Modifikation untersucht. Der Einbau des RGD-Liganden in die Fiber-Proteine von Helferviren ermöglichte die Produktion entsprechend modifizierter HC- Ad-Vektoren und führte durch die Bindung an den Rezeptor  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin zu einer verbes- sertem und CAR-unabhängigen Transduktion von Zellen. Als zweite Strategie zur Tropismus-Modifikation adenoviraler Vektoren wurde das synthetische Adaptor-Peptid FNMQQRRFYREALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD (Z33) in den Fiber-HI-Loop eines adenoviralen Vektors eingebaut. Das Z33-Peptid stammt von der IgG-bindenden Domäne des Protein-A von Staphylococcus aureus ab und bindet an den Fc- Teil von Antikörpern. Die Inkubation des Z33-modifizierten Vektors mit monoklonalen Anti- körpern führte zu einer Antikörper-vermittelten Transduktion von Zellen. So wurde durch die Inkubation eines anti-EGFR-Antikörpers mit dem Z33-modifizierten Vektor eine 6-fach erhöhte Transduktion von EGFR-positiven Zellen erreicht. Die Zugabe eines  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin- spezifischen Antikörpers führte zu einer 15-fach höheren

Transduktionseffizienz von glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Der Einsatz eines CD4- bzw. CD3-Antikörpers führte hingegen zu keiner erhöhten Transduktion von peripheren T-Zellen. Durch die Z33-Modifikation im adenoviralen Vektor-Kapsid konnte somit die sehr hohe Affinität und Spezifität monoklonaler Antikörper für eine gesteigerte Transduktion von Rezeptor exprimierenden Zielzellen genutzt werden.

Die Möglichkeit, das Kapsid von Helferviren durch den Einbau heterologer Peptid-Sequenzen in den Fiber-HI-Loop zu verändern, erlaubt die Herstellung von Tropismus-modifizierten HC-Ad-Vektoren mit verbesserten und spezifisch auf die jeweiligen Zielzellen abgestimmten Transduktionseigenschaften. Dabei hat sich vor allem der Einbau eines Antikörper-bindenden Peptids als sehr aussichtsreich für die flexible Modifikation des viralen Tropismus erwiesen. Diese Möglichkeit einer variablen Modifikation des Tropismus, gepaart mit der geringen Immunogenität und Toxizität von HC-Ad-Vektoren, eröffnet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten von HC-Ad-Vektoren in der somatischen Gentherapie.

---

Adenoviral vectors transduce a broad range of proliferating and non-proliferating cells and are promising tools for gene therapy applications. Their characteristics were further improved by the development of the High-Capacity adenoviral (HC-Ad) vectors. HC-Ad vectors feature a high cloning capacity for foreign DNA and a very low immunogenicity and toxicity as well as a long lasting transgene expression. However, HC-Ad vectors do not efficiently transduce some clinically important cell types like endothelial cells, smooth muscle cells, hematopoietic cells or some tumor cell types. Thus, the improvement of the HC-Ad vectors' transduction efficiency and specificity for these cell types is a prerequisite for their wide application in gene therapy. An option to alter the cell tropism and thereby the transduction characteristics of HC-Ad vectors is the incorporation of heterologous peptide ligands into the adenoviral capsid with the fiber HI loop being the most suitable place for insertion. In this work, the tropism and the transduction characteristics of HC-Ad vectors were changed by incorporation of heterologous peptides into the fiber HI loop of helper viruses used for production of HC-Ad vectors. Capsid-modified HC-Ad vectors transduced cells which are normally refractory to adenoviral transduction much more efficiently. Two different strategies to modify the viral tropism were analysed. First, heterologous peptide ligands binding to cell receptors were incorporated into the HI loop. The peptide ligands inserted were the RGD peptide CDCRGDCFC binding to  $\alpha_3\beta_5$  Integrin, poly-lysine binding to heparansulfate, and CD4 or CD8 binding peptides. The effect of these modifications on the transduction efficiency for ovarian carcinoma cells, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, dendritic cells, and peripheral T cells was investigated. An RGD-modified HC-Ad vector transduced ovarian carcinoma cells up to 20 fold more efficiently, endothelial cells 15 fold more efficiently, and vascular smooth muscle cells 13 fold more efficiently than a non-modified HC-Ad vector. Mouse Dendritic cells, but not human Dendritic cells were more efficiently transduced by a poly-lysine modified HC-Ad vector. The incorporation of CD4 or CD8 binding peptides, however, had no effect on the adenoviral transduction efficiency or specificity for peripheral T cells. To allow for the insertion of heterologous peptide sequences into the fiber HI loop of helper viruses in a single cloning step, unique PacI and ClaI restriction sites were introduced into the helper virus plasmid pVB5 after nucleotide 32670 of the Ad5 sequence, corresponding to fiber amino acid 543. The suitability of the pVB5 construct for production of capsid-modified HC-Ad vectors was validated after insertion of the RGD ligand. The RGD ligand was incorporated into the fiber proteins of helper viruses and HC-Ad vectors and allowed for a CAR-independent,  $\alpha_3\beta_5$ -Integrin-mediated transduction of cells. In the second strategy to modify the tropism of adenoviral vectors the synthetic adaptor peptide FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD (Z33) was inserted into the fiber HI loop of an adenoviral vector. The Z33 peptide was derived from the antibody-binding domain of the Staphylococcus aureus' protein A and binds to the Fc part of antibodies. The incubation of the Z33-modified adenoviral vector with monoclonal antibodies allowed for an antibody-mediated transduction of cells. By using an anti-EGFR antibody the transduction efficiency for EGFR-positive

cells increased 6 fold. The incubation with an  $\alpha 7\beta 1$ -Integrin- specific antibody enhanced the adenoviral transduction of vascular smooth muscle cells 15 fold. However, the use of an anti-CD4 or anti-CD3 antibody had no effect on the transduction of peripheral T cells. By incorporating the Z33 peptide into the capsid of adenoviral vectors monoclonal antibodies with their high affinity and specificity could be used for an antibody- mediated transduction of target cells.

The possibility to modify the capsid of helper viruses by incorporating heterologous peptide sequences into the fiber HI loop enables the production of tropism-modified HC-Ad vectors with altered transduction characteristics specifically tailored to target cells. The incorporation of an antibody-binding peptide, especially, allows for the versatile modification of the viral tropism. Tropism-modified HC-Ad vectors with their low immunogenicity and toxicity will have an extended spectrum of applications in gene therapy.