

## Abstract

Adeno-associated virus (AAV), in particular, serotype 2, has gained tremendous popularity as vector for gene therapy. This interest is due to several beneficial features, including apathogenicity, high stability, ability to transduce both dividing and non-dividing cells, long term gene expression and low immunogenicity. As it is the case with the majority of viral vectors however, the primary disadvantage of AAV is its' broad tropism, resulting in gene transfer into the target cells, as well as off-target cells. Extensive work has been undertaken in recent years, aiming to generate cell type-specific vectors (targeted vectors). The techniques employed to date are either based on non-covalent chemical modifications, which are unstable and inefficient or on genetic modifications which are time-consuming because they are laborious processes that require a new capsid mutant to be developed and characterized that is specific for each type of target cell. Therefore, a procedure that allows easy and flexible exchange of targeting ligands would be highly beneficial. This study describes the generation of a novel and universal targeting platform, utilizing a combinatorial genetic-chemical targeting approach that provides a flexible and tunable technique for the specific targeting of selected cell types, showing in this way for the first time using an AAV vector.

An essential prerequisite for successful coupling of chemical entities to vector capsids is the production of ultra-pure vector preparations. Purification by density gradient or affinity column, which are commonly employed, were investigated, but did not result in sufficiently pure vector preparations when performed alone. Generally, heparin columns can only be used for AAV2 particles that possess an intact primary receptor binding moiety, which is not always present in genetically modified targeting vectors. Therefore, a new affinity chromatography column was established that allows the purification of vectors, regardless of the presence or absence of the primary heparin motif, via the binding affinity of the 'A20' monoclonal antibody, which only recognizes intact capsids. Antibodies were coupled with high efficiency to NHS-activated sepharose beads. Competition, high salt concentration and change of pH were tested as elution strategies. All three were suitable to elute bound recombinant AAV2 (rAAV2) particles and infectivity and capsid intactness remained as shown in transduction assays and by capsid ELISA. Moreover, it could be demonstrated, that with this affinity column not only wild type AAV2 particles can be purified but also primary receptor ablated and tagged ones. Most importantly this purification strategy yielded in a single-step in exceptionally pure vectors directly from crude lysate, thereby decreasing the time required for sample processing.

Following a screening campaign, a mutant AAV vector was identified from an error-prone library, which contained cysteine residues exposed on the exterior of the capsid surface. This mutant was further investigated, as the exposed cysteines provide an ideal platform for further chemical modification and coupling. The cysteine residues were coupled with a maleimide modified linker, via the formation of a covalent thioether bond, with the specificity of the reaction increased by including a click chemistry reaction. Coupling reactions were performed on the newly established A20 purification column, resulting in a novel “on-column” strategy. As proof of concept, modified biotin was initially used to demonstrate thioether bond-formation, specificity of the cysteines for chemical modification, titration of the chemical linker, as well as success of the reducing agent and the click reaction. Following modification with biotin, the cysteine-containing mutant was also labelled with a fluorophore for microscopic imaging. Labeling was demonstrated to be vector specific, as the fluorophore co-localized with an antibody that was specific for the viral capsid. The successful labeling and imaging is of great importance, as tools for investigating the infectious biology for AAV2 are currently very limited.

The ability of targeting ligands to direct infection of vectors to specific cells was determined with two separate Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs), directed against HER2/neu and EpCAM, respectively. It could be shown, that these DARPin-labeled vectors efficiently transduced receptor positive cells. Moreover, specificity could be proven by mixed-culture experiments, thereby highlighting the enormous potential of this novel genetic-chemical technique.

In summary, a newly established affinity column purification technique has been described that results in the rapid, simple and ultra-pure purification of AAV vectors, regardless of capsid modifications. More importantly, a universal capsid modification platform has been developed that allows for the coupling of a variety of chemical and biological entities onto the capsid of AAV vectors, via exposed cysteine residues. The nature of the coupled substrate can convey numerous properties, including fluorescent labeling to conduct biological and infectious studies, but the most important aspect is the ability to direct viral infection to specific cells, via addition of receptor-specific ligands such as DARPs. This is the first time this ability has been described for AAV in this way and may assist in providing a new avenue for gene therapy in the future.

# Zusammenfassung

Adeno-assoziierte Viren (AAV), insbesondere des Serotypes 2 (AAV2), haben eine enorme Beliebtheit als Genfähren in der Gentherapie erlangt. Dieses Interesse beruht auf mehreren nutzbringenden Eigenschaften wie z.B. Apathogenität, eine hohe Stabilität, die Fähigkeit teilende und nicht-teilende Zellen zu transduzieren, Langzeitgenexpression und eine niedrige immunogene Aktivität. Einer der Nachteile von AAV hingegen, wie auch bei allen anderen viralen Vektoren, ist der breite Tropismus. Dies führt sowohl zum Gentransfer in Zielzellen, als auch in Nichtzielzellen. In den letzten Jahren wurde viel Aufwand betrieben, um zelltypspezifische Vektoren (Targetingvektoren) zu generieren. Bis heute basieren diese Techniken entweder auf nicht-kovalenten chemischen Verbindungen, welche instabil und ineffizient sind, oder auf genetischen Modifikationen, welche zeitaufwändig sind und mühsame Prozesse darstellen, da für jede neue Zielzelle eine neue spezifische Kapsidmutante hergestellt und charakterisiert werden muss. Deswegen wäre ein Verfahren, das ein schnelles und einfaches Austauschen von Zielliganden gewährleisten könnte, ein enormer Fortschritt. Diese Arbeit beschreibt die Herstellung einer solchen neuen und universellen Targetingplattform, welche auf der Kombination eines genetischen mit einem chemischen Ansatz beruht. Diese Technik ist flexibel und modifizierbar und wird für das Herstellen von AAV basierten Targetingvektoren auf diese Weise zum ersten Mal gezeigt.

Eine Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Koppeln von chemischen Einheiten an ein Vektorkapsid ist die Herstellung von ultrareinen Vektorpräparationen. Es wurden die für AAV gängigen Aufreinigungsmethoden Gradient und Affinitätschromatografie, untersucht, welche jedoch nur in Kombination eine ausreichende Sauberkeit erreichten. Die üblicherweise angewandte Heparinaffinitätschromatografiesäule kann jedoch nur für AAV2-Partikel herangezogen werden, die noch ein intaktes Primärrezeptorbindungsmotiv haben, was jedoch in vielen Targetingvektoren nicht mehr der Fall ist. Deswegen wurde hier eine Affinitätschromatografiesäule entwickelt, die die Aufreinigung unabhängig von dem Primärrezeptor des Vektors ermöglicht. Dafür wurde der monoklonale 'A20'-Antikörper, welcher nur intakte Kapside erkennt, mit hoher Effizienz an NHS-aktivierte Sepharose-beads gekoppelt. Danach wurden die drei Elutionsmöglichkeiten Konkurrenz, Hochsalz und eine Änderung des pH-Wertes evaluiert. Alle drei Strategien ermöglichten die gebundenen rekombinanten AAV Vektoren (rAAV) zu eluieren. Die Kapside und Infektiosität blieben intakt, was mithilfe von Transduktionsversuchen und einem kapsid-spezifischen ELISA bestätigt werden

konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode nicht nur Wildtyp-AAV2-Partikel aufgereinigt werden können, sondern auch solche Viren, welche keinen Primärrezeptor mehr haben, und darüber hinaus auch noch getaggte Vektoren. Das Wichtigste an dieser Aufreinigungsstrategie ist jedoch die Tatsache, dass mit nur einem einzigen Schritt, ausgehend von dem Zelllysat, hochreine Vektoren produziert werden können, was mit einer sehr großen Zeitersparnis einhergeht.

Bei der Durchsicht einer „Error-Prone“-Bibliothek wurde eine AAV-Variante identifiziert, welcher an exponierten Außenstellen des Kapsids Cysteine enthält. Da diese Cysteine die ideale Plattform für chemische Modifikationen wie zum Beispiel das Koppeln darstellen, wurde diese Mutante weiter charakterisiert. Die Cysteinreste wurden an einen mit Maleimide-modifizierten Linker gekoppelt, wodurch eine kovalente Thioetherbrücke entstand. Diese Reaktion wurde durch eine zusätzliche „Click-Chemistry“-Reaktion noch spezifischer gemacht. Die Kopplungsreaktionen wurden auf der neu etablierten A20-Aufreinigungssäule durchgeführt, wodurch auf diese Weise eine neuartige „on-column“-Strategie entwickelt wurde. Dadurch können die Reagenzien in der gewünschten Reihenfolge geladen und nicht gebundenes Material vor dem Laden des nächsten Reaktionspartners durch einfaches Waschen entfernt werden. Um zu zeigen, dass es in diesem System möglich ist, Thioetherbrücken über die zusätzlichen Cysteine zu bilden, wurde zu Demonstrationszwecken modifiziertes Biotin verwendet. Biotin wurde auch zur Titration des Reduktionsmittels und zur Erörterung, ob die „Click-chemistry“ auf der Säule funktioniert, eingesetzt. Danach wurde Biotin durch einen Farbstoff ersetzt, um eine weitere Einsatzmöglichkeit aufzuzeigen. Die cysteinhaltige Mutante wurde mit dem Farbstoff gekoppelt und mikroskopische Bilder aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Färbung vektor-spezifisch war, da der Farbstoff mit einem kapsidspezifischen Antikörper kolokalisierte. Das erfolgreiche Labeln mit Fluorophoren von AAV Vektoren ist von großer Bedeutung, da die momentan zur Verfügung stehenden Mittel für die Untersuchung der Infektionsbiologie von AAV limitierend sind.

Targetingliganden können die Infektion von Vektoren auf spezifische Zielzellen lenken. Um zu zeigen, dass auch dies mit der „on-column“-Strategie möglich ist, wurden zwei verschiedene Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs), und zwar gegen HER2/neu und EpCAM verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass diese DARPin gekoppelten Vektoren rezeptorpositive Zellen transduzieren konnten. Darüber hinaus konnte das Potenzial und die Spezifität dieser neuartigen genetisch-chemischen Kopplungsmethode in Mischkulturexperimenten gezeigt werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass eine neue Affinitätsäule etabliert wurde. Diese kann für eine schnelle, einfache und hochreine Aufreinigung von AAV Vektoren eingesetzt werden und ist unabhängig von Kapsidveränderungen. Von größerer Bedeutung ist jedoch die Tatsache, dass diese Säule gleichzeitig für eine neue Targetingplattform verwendet werden kann, welche das Koppeln verschiedenster chemischer und biologischer Stoffgruppen ermöglicht. So können neben dem Einsatz von Targetingliganden für den spezifischen Transfer auf Zielzellen, auch Farbstoffe zur Aufklärung der Infektionsbiologie von AAV herangezogen werden. Diese hier zum ersten Mal beschriebene „on-column“-Kopplungsstrategie kann deswegen für das Feld der Gentherapie ganz neue Wege eröffnen.