

Characterization of AAV serotype 2 and derived *in vivo*-selected AAV peptide display capsid variants for targeting hepatocellular carcinoma and the liver

Zusammenfassung

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind die Ausgangsbasis für eines der am häufigsten verwendeten Vektorsysteme. Dabei wurden rekombinante (r)AAV-Vektoren bereits mit großem klinischen Erfolg angewendet, wobei sie sich durch therapeutische Langzeiteffekte und ein exzellentes Sicherheitsprofil auszeichneten. AAVs und die darauf basierten Vektoren verfügen, wie auch andere virale Systeme, über einen breit aufgestellten Gewebetropismus. Während sich diese Charakteristik für Ex-vivo-Anwendungen als vorteilhaft erweist, ergibt sich aus ihr bei der *In-vivo*-Anwendung eine Schwierigkeit. Denn um den Verlust viraler Vektoren im Nicht-Zielgewebe zu kompensieren, müssen hohe Vektormengen verabreicht werden. Außerdem kann eine fehlgeleitete Vektortransgen-Expression zu Nebenwirkungen wie Toxizität oder Immunantworten führen. Um diesem Hindernis entgegen zu wirken, werden virale Vektor-Kapside entwickelt, die einen Tropismus für bestimmte Zielzelltypen gewährleisten. Eine vielversprechende Strategie um dies zu erreichen, stellt die Insertion eines kurzen Rezeptor-bindenden Peptids in das virale Kapsid dar. Diese Modifikation soll eine zielgerichtete Zellaufnahme und Transduktion vermitteln. Um solche speziellen Peptidliganden zu identifizieren werden entsprechende Selektionen von AAV-Peptid-Präsentations-Bibliotheken, auch AAV-Peptid-Display-Bibliotheken genannt, in Zielzellen durchgeführt. Die Kapsid-Varianten solcher Bibliotheken präsentieren randomisierte 7-mer-Peptid-Insertionen auf exponierten Kapsid-Strukturen. Diese können in einem Hochdurchsatzverfahren selektioniert werden, um Kandidaten zu identifizieren, die in der Lage sind Zielgewebe bzw. Zielzellen effizient zu transduzieren. Solche geleiteten Evolutionsansätze sind besonders nützlich um fehlendes Wissen über geeignete Zielzell-spezifische Peptid-Rezeptor-Interaktionen, die im Kapsidkontext effizienten und sicheren Gentransfer gewährleisten, zu überwinden.

Die Leber ist eines der Hauptzielorgane der Gentherapie und ist auch Gegenstand dieser Arbeit. Diese Relevanz beruht darauf, dass eine Reihe vererbbarer sowie auch erworbener Krankheiten durch pathologische Störungen im Lebergewebe hervorgerufen werden und anhand von Überexpression und Sekretion von therapeutischen Faktoren durch Hepatozyten behandelt werden können. In diesem Zusammenhang werden zur Zeit neuartige genbasierte Strategien entwickelt. Dabei haben sich AAV-Vektoren aufgrund ihres natürlichen Lebertropismus' und ihrer Nicht-Pathogenität als vielversprechende Plattform etabliert. Allerdings sind keine der natürlichen AAV-Serotypen in ihrer Expression einzig und allein auf die Leber begrenzt. Außerdem verhindern spezielle zelluläre Barrieren die effiziente Transduktion von Hepatozyten durch dieses Vektorsystem.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Verbesserung des AAV-Systems im Hinblick auf Effizienz und Selektivität des *In-vivo*-Gentransfers in Hepatozyten und hepatozellulären Karzinomzellen (HCC). Im Speziellen, wurde zum ersten Mal eine Hochdurchsatz-*in-vivo*-Selektion der AAV2-basierten AAV-Peptid-Display-Bibliothek in einem orthotopen bitransgenen HCC-Mausmodell durchgeführt. Wir haben drei vielversprechende Kandidaten für einen optimierten HCC-Gentransfer identifiziert, die im Vergleich zum parentalen AAV2 charakterisiert wurden. In-vitro-Experimente in Hepatoma-Zelllinien zeigten unterschiedliche und zum Teil überlegene Transduktions-Effizienzen der rHCC-Kapsid-Varianten im Vergleich zu rAAV2. Der Vorteil der HCC-Kapsid-Varianten in ihrer In-vitro-Leistung konnte auf– abhängig von Variante und Zelllinie – höhere Zellimport-Raten und Expressions-Zugänglichkeit der Vektorgenome zurückgeführt werden. Auch die *In-vivo*-Charakterisierung im bitransgenen HCC-Mausmodell zeigte vielversprechende Resultate für die HCC-Kapsid-Varianten; mit HCC3 als Variante mit dem bisher besten *In-vivo*-Verhalten. Die rHCC3-Kapsid-Variante war zur effizienteren Transduktion von HCC-Knoten im Vergleich zu AAV2 und den anderen zwei Kandidaten fähig. Außerdem zeigte sich rHCC3 in Bezug auf die Expressions-Effizienz überlegen, d.h. mehr Transgenprodukt pro Vektorgenom-Kopie. Dies spricht für eine verbesserte intrazelluläre Prozessierung des Vektorpartikels. Des Weiteren waren die HCC-Kapsid-Varianten ebenfalls in der Lage Hepatozyten effizient zu transduzieren. Interessanterweise waren die Varianten in diesem Zusammenhang effizienter als der AAV2wt. Dies könnte auf einen Gewinn an neuen Eigenschaften hindeuten, welche die Überwindung einer Barriere gegen AAV2wt in nicht-malignen Hepatozyten ermöglichen, die bisher nicht identifiziert wurde.

AAV2wt wurde zum ersten Mal in einem syngenem transgenem HCC-Mausmodell untersucht. Dabei wurde ein bislang unbekannter natürlicher Tropismus für HCC-Zellen aufgezeigt, welcher in weiteren therapeutischen Strategien angewendet werden könnte. Aufgrund der hohen Heterogenität des Mausmodells und der limitierten Zahl an geeigneten Tieren, die in die Versuchs-Kohorten aufgenommen werden konnten, müssen die Ergebnisse anhand von größeren Kohorten bestätigt werden.

Die anspruchsvolle *In-vivo*-Selektion wurde in Zielzellen durchgeführt, die transformierte Hepatozyten darstellen und daher gemeinsame Eigenschaften gesunder Hepatozyten teilen. Dieser Umstand wurde zur Identifizierung von Leber-gerichteten AAV-Kapsid-Varianten genutzt. Die *In-vivo*-Charakterisierung der Leber-Kapsid-Varianten zeigte eine stark verbesserte Transduktions-Effizienz im Vergleich zum parentalen AAV2, welche durch Hinweise auf deutlich erhöhte Zellimport-Raten erklärt werden könnte. Im Besonderen zeigten die neuartigen Kapsid-Varianten einen zum momentanen Goldstandard, AAV8, vergleichbaren Leber-Tropismus und Transduktion-Effizienzen. Daher weisen die hier selektionierten hepatotropen AAV-Kapsid-Varianten ein großes Potential auf, das Spektrum der Gentherapieansätze für Leberkrankheiten zu erweitern.