

Herstellung universeller Influenza A Impfstofftypen und Erprobung ihrer Wirksamkeit in vivo



Influenza A M2 Impfstoff

Fragestellung

Die Cytos Biotechnology AG entwickelte eine alternative Impfung gegen Influenza A. Das Matrixprotein2 (M2) wurde an das VLP (virusähnliches Partikel) des RNA Phagen AP205 gekoppelt. Dieser Impfstoff zeigte gute Wirksamkeit in Mäusen.

In meiner Diplomarbeit habe ich versucht diesen Impfstoff zu verbessern, indem ich das Matrixprotein2 an verschiedene andere VLPs koppelte und sowohl die Kopplungseffizienz als auch die Wirksamkeit in vivo testete.

Influenza A M2 Impfstoff

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

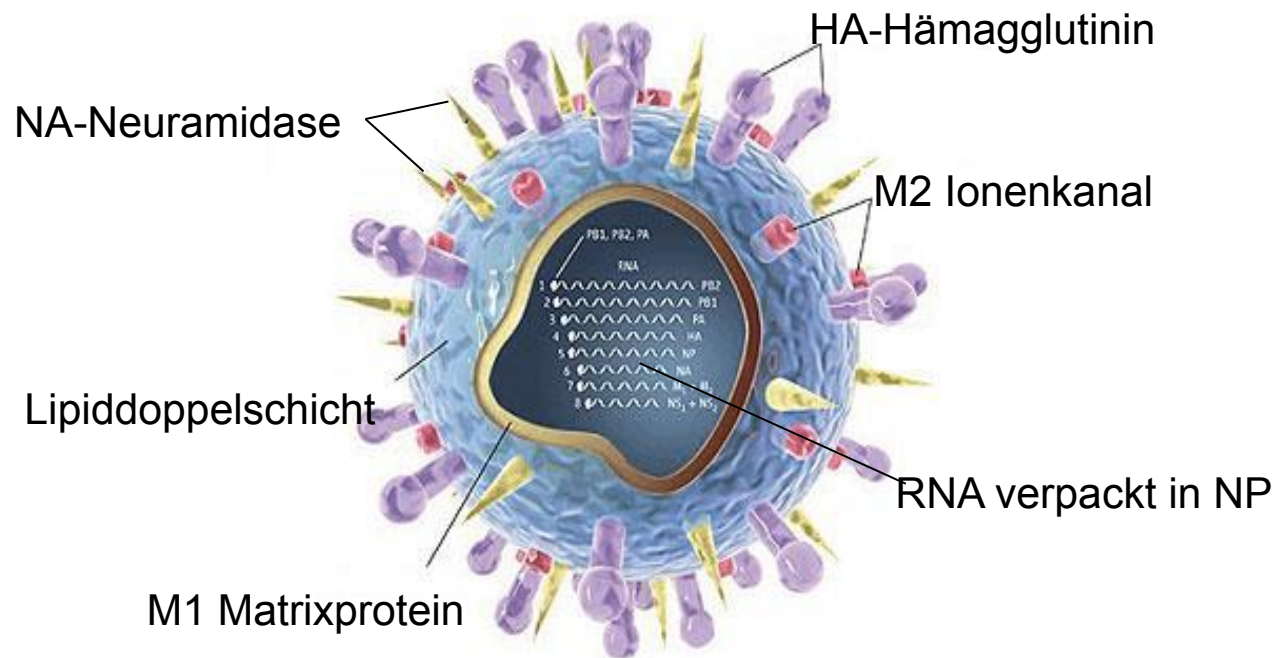
Einleitung

- 100.000 – 200.000 Erkrankungen jährlich
- ca. 1800 Hospitalisierungen und 400-1000 Todesfälle
- Orthomyxovirus
- negativer Einzelstrang RNA-Virus
- segmentiertes Genom
- 8 RNA Stränge (890-2341 Nucleotide)
- 11 Proteine werden codiert
- HA, NA, M1, M2, PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 und NS3

Influenza A M2 Impfstoff

Aufbau des Influenza A Virus

- 9 Neuramidasen (N)
- 16 Hämagglutinine (H)
- H1N1, H2N2, H3N2, (H5N1)
humanpathogen



Influenza A M2 Impfstoff

HA/NA Impfstrategie

- gegen Hämagglutinin und Neuramidase
- aktuell H1N1, H3N2 und B (2012/2013)
 - A/California/7/2009 (H1N1)
 - A/Victoria/361/2011 (H3N2)
 - B/Wisconsin/1/2010
- WHO verschickt *seed* Viren an Impfstoffhersteller
- Herstellung in bebrütete Hühnereier
- Inaktivierung der Viren und Aufreinigung

Durch die ständige Veränderung der HA und NA Oberflächenantigene, muss die Impfung jährlich erneuert werden.

Influenza A M2 Impfstoff

Antigen Shift und Drift

Antigen drift

- langsame Veränderung
- neutralisierende AK gegen HA und NA bei Infektion
- hoher Selektionsdruck auf HA und NA
- *proofreading* Aktivität der viralen Polymerase fehlt
- Sequenzveränderungen
- AK nicht mehr wirksam

jährlich neue Impfung nötig

Influenza A M2 Impfstoff

Antigen Shift und Drift

Antigen shift

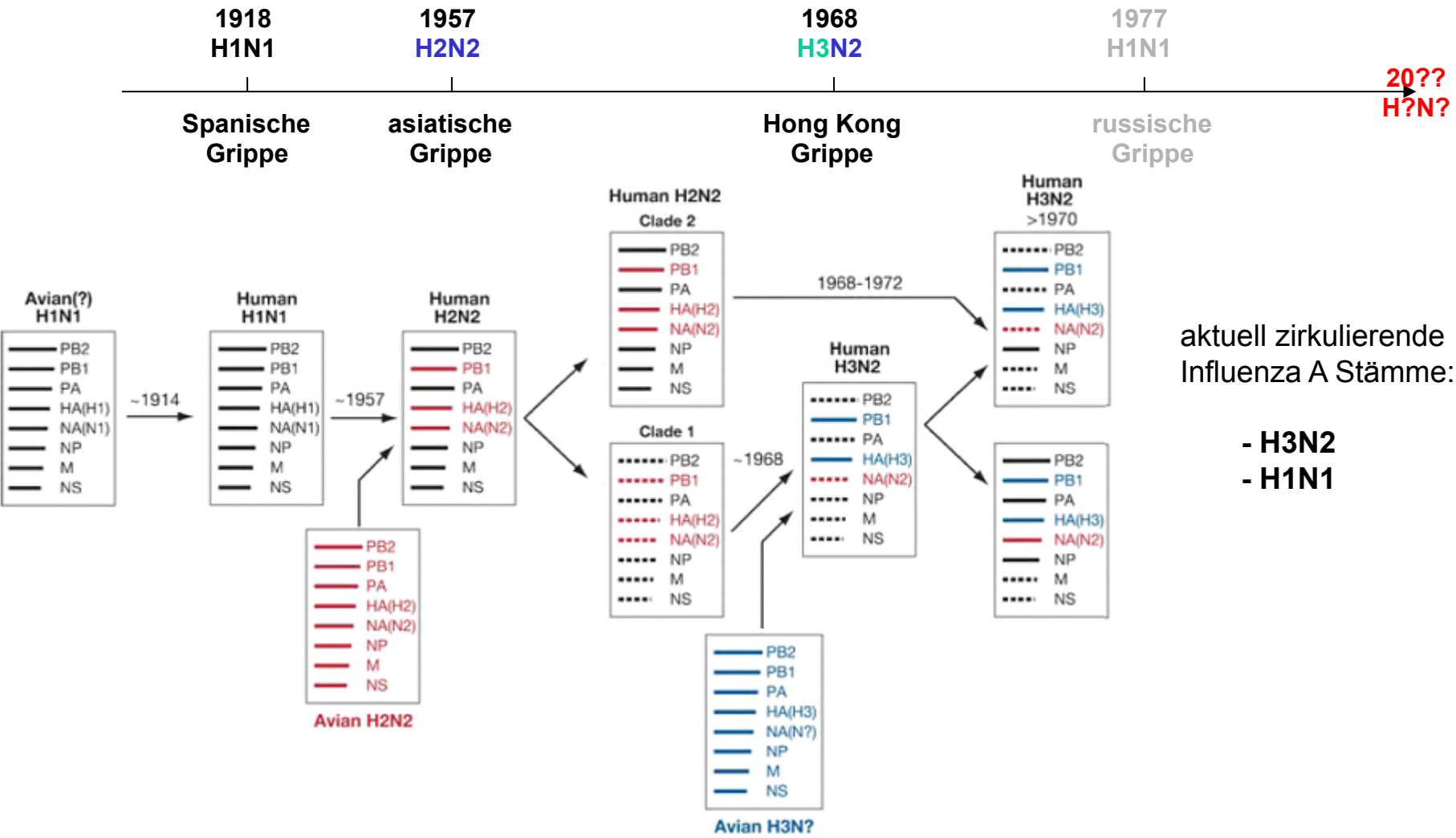
- sprunghafte Veränderung
- Reassortantenbildung in Zwischenwirten
- Schwein ist ein geeigneter Zwischenwirt
- Infektion eines Wirtes mit 2 verschiedenen Viren
- Austausch von ganzen RNA Strängen

nicht vorhersehbar

Pandemien möglich

Influenza A M2 Impfstoff

Einleitung Antigen Shift und Drift



Influenza A M2 Impfstoff

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

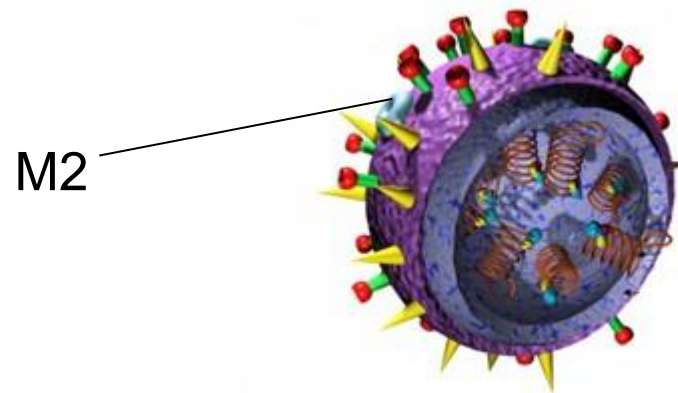
M2 als Alternative

neutralisierende AK gegen NA und HA → Selektionsdruck

M2 ist «versteckt» → keine natürlichen AK

Sequenz ist nicht so variabel wie HA und NA

Ansatzpunkt für Impfungen



Influenza A M2 Impfstoff

M2 als Alternative

Sequenzvergleich im letzten Jahrhundert zwischen HA und M2

grosse
Pandemien

HA_H1N1_1918	yeelreqlssvssfekfeifpktsswpnhettkgvtaacsyagassfyrnlwltkkgssypklsksyvnmkgkevlvlwgvhhpvtgtdqqslyqmadayvsv	1918
HA_H1N1_1934r.....e.....n.....h..k.....e.eg.....kn....k.....i...snsk...ni...en....	
HA_H1N1_1988r.....e.....n..n.....he.k.....e.eg.....kn....k.....i...nske..n...en....	
HA_H2N2_1957	...khl...kh...vk.l..-dr.tq.t..g.-sr..avs.np..f..av.....d..vakg..n.ts.eqn.ii.....nde.e.rt...vgt....	1957
HA_H2N2_1968	...khl...kh...vk.l..-dr.tq.t..g.-sw..avs.kp..f..av...r...n..vakg..n.ts.eqn.ii.....ndeae.ra...vgt....	
HA_H3N2_1968	.as...---.l.a.sgtl.fitegt.tg-v.qn.gsn..krgpg.g.fsr.n....s..t..v.nvtmp..dnfdk.yi.....s.nqe.t...vq.sgr.t.	1968
HA_H3N2_2000	.vs...---.l.a.sgtl.fnesfn.tg-vaqn.tss..krrsdk..fsr.n..hqlkyk..a.nvtmp..ekfdk.yi.....g.ds..i...aq.sgr.t.	

repräsentativer Teil des Hämagglutinins

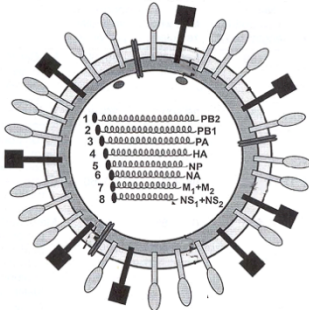
M2_Vaccine	1 mslitevetpirnewgcrcndssd	
M2_H1N1_1918	1t.....	1918
M2_H1N1_1934	1g...	
M2_H1N1_1988	1k.....	
M2_H2N2_1957	1	1957
M2_H2N2_1968	1	
M2_H3N2_1968	1	1968
M2_H3N2_2000	1t.....	

komplette extracelluläre Domäne von M2

Influenza A M2 Impfstoff

M2 als Alternative

M1 and M2 Sequenz in Influenza A H1N1/PR8



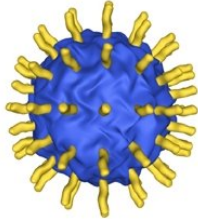
M1

ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG TAC GTA	GCC TAT CAG AAA CGA ATG GGG GTG CAG ATG CAA CGG TTC AAG TGA
M S L L T E V E T Y V	A Y Q K R M G V Q M Q R F K -

M2

ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GAA AC	splicing	G CCT ATC AGA AAC GAA TGG GGG TGC AGA TGC AAC GGT TCA AGT GAT CCT
M S L L T E V E T		P I R N E W G C R C N G S S D P

M2 extrazelluläre Domäne



Aminosäuren 1-9: genutzt von M1 and M2

Aminosäuren 10-24: genutzt von M1 and M2 in unterschiedlichen Leserastern

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD-GGGC

Influenza A M2 Impfstoff

Inhaltsverzeichnis

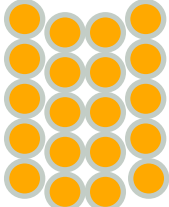
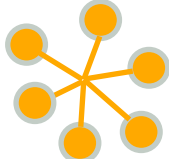
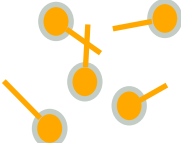
- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

VLP Technologie

Wie unterscheidet unser Immunsystem zwischen Eigen- und Fremdartigenen?

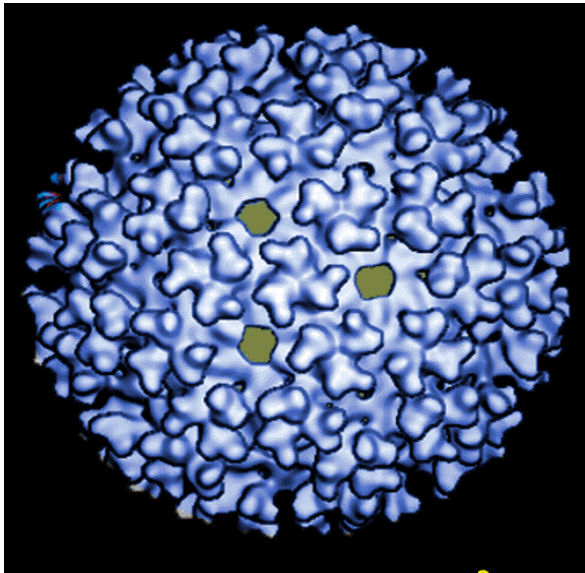
Science 262, 1448-1451

Organisationsgrad:	 hoch	 tief	 ungeordnet
Antikörperantwort	+++	+	+/-
Induktion von Autoantikörpern	+++	-	-

Influenza A M2 Impfstoff

VLP Technologie

Wie unterscheidet unser Immunsystem zwischen Eigen- und Fremdantigenen?



- ein Virus besteht nur aus wenigen Proteine
- diese bilden repetitive, hochorganisierte Strukturen
- durch diese Strukturen erkennt das Immunsystem das Virus als «fremd» und bildet Antikörper

Influenza A M2 Impfstoff

VLP Technologie



- AP205 ist ein RNA Phage aus der Familie der Leviviradea
- Hüllproteinsequenz in E.coli transfiziert und exprimiert
- besteht aus 180 Monomeren, welche aus je 131 Aminosäuren bestehen und 14kDa gross sind

Influenza A M2 Impfstoff

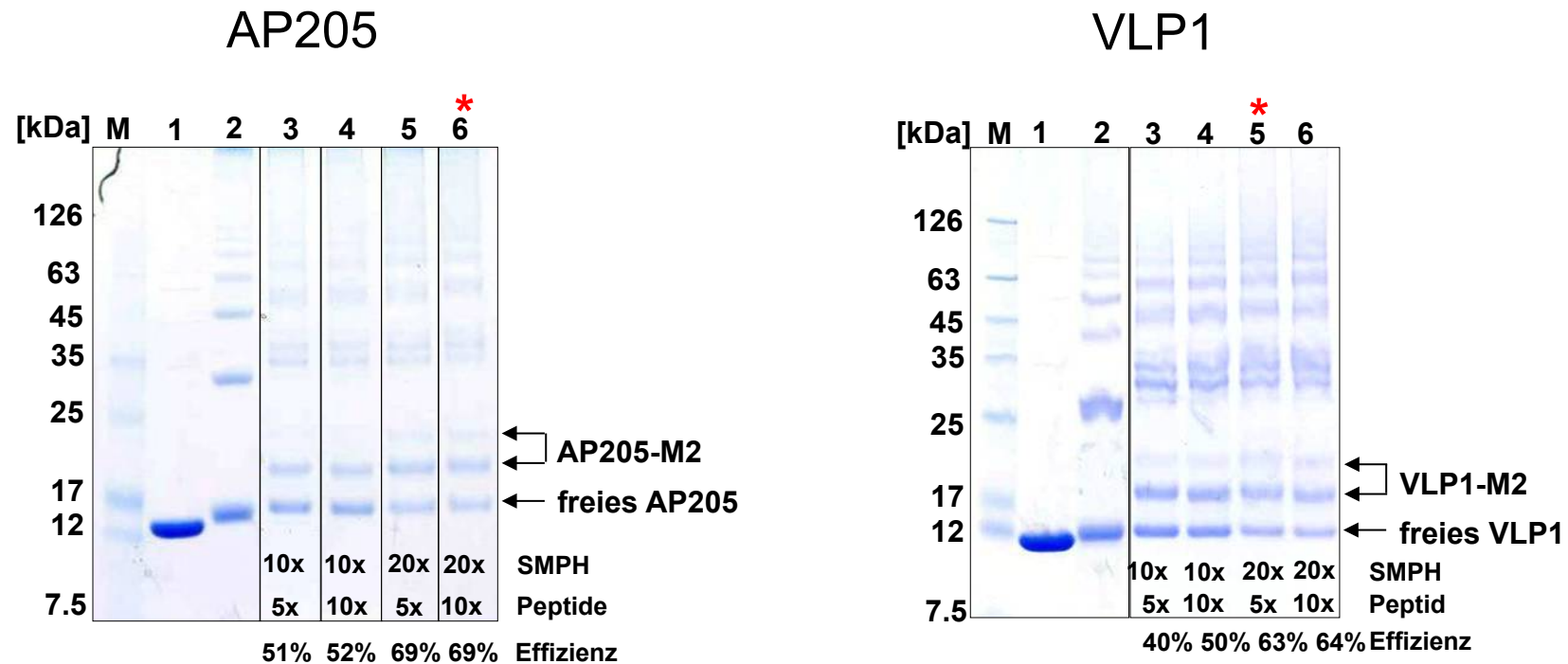
Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

Impfstoffherstellung

Testkopplung

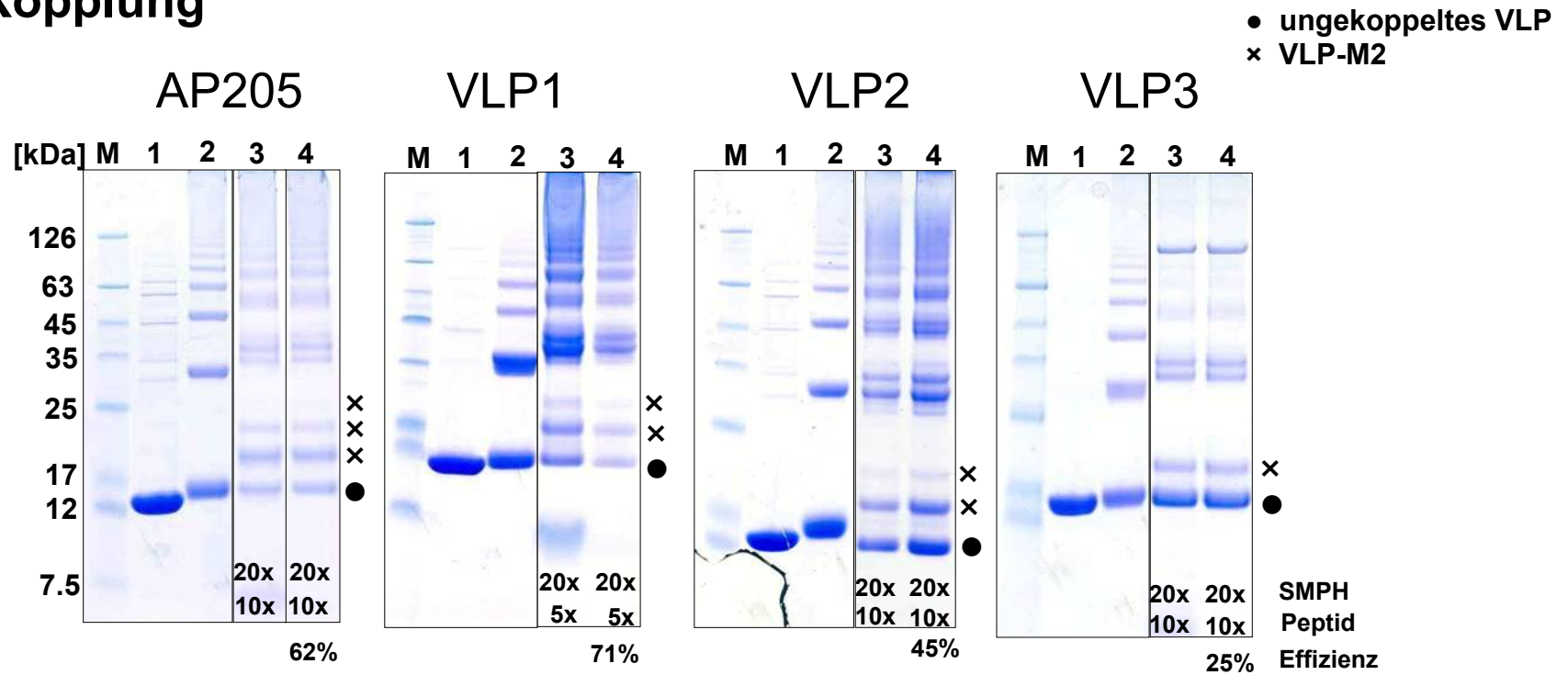


* Diese Kondition wurde für die Impfstoffherstellung gewählt

Influenza A M2 Impfstoff

Impfstoffherstellung

Kopplung



- VLP3 hat eine sehr viel tiefere Kopplungseffizienz an M2 als alle anderen VLPs

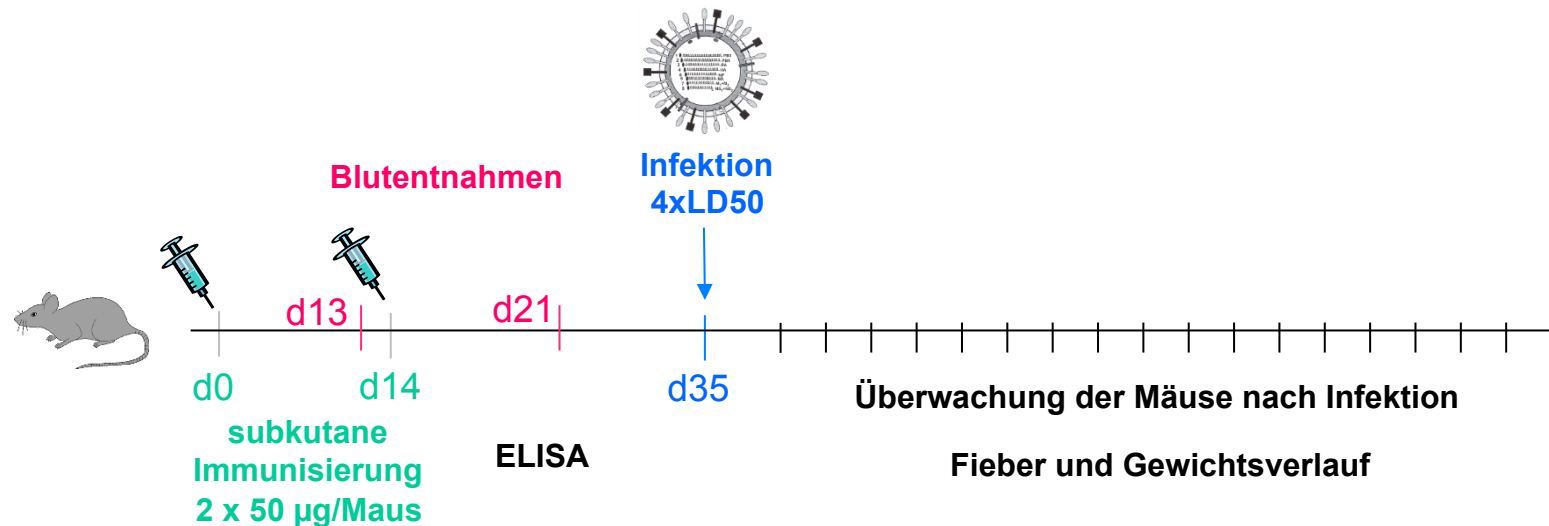
Influenza A M2 Impfstoff

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

Mauserperimente Überblick

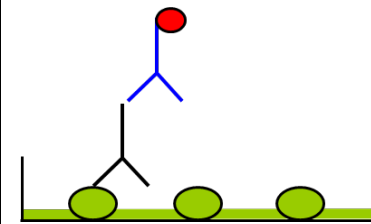
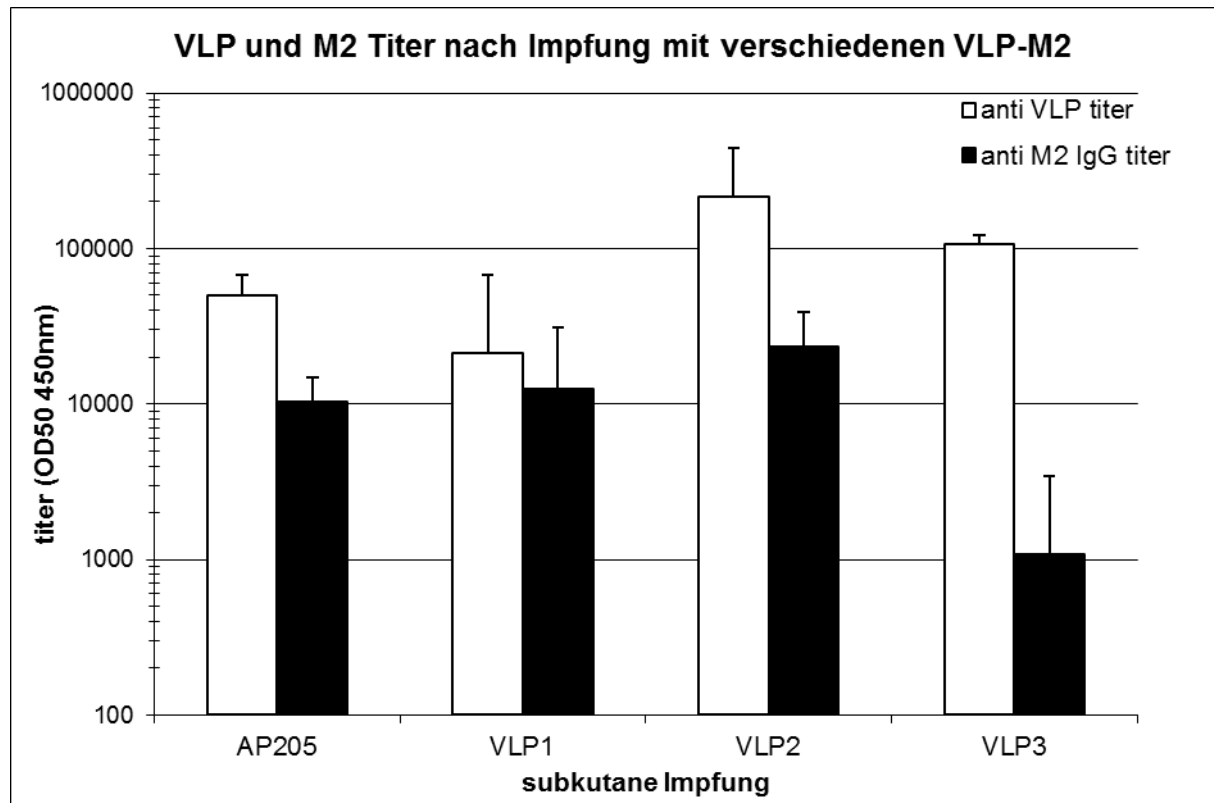


Mausstamm: weibliche C57BL/6 Mäuse 6 Wochen alt
6 Mäuse pro Gruppe

PR8 Virus: A/Puerto Rico/8/34/ (H1N1) mausadaptiert

Influenza A M2 Impfstoff

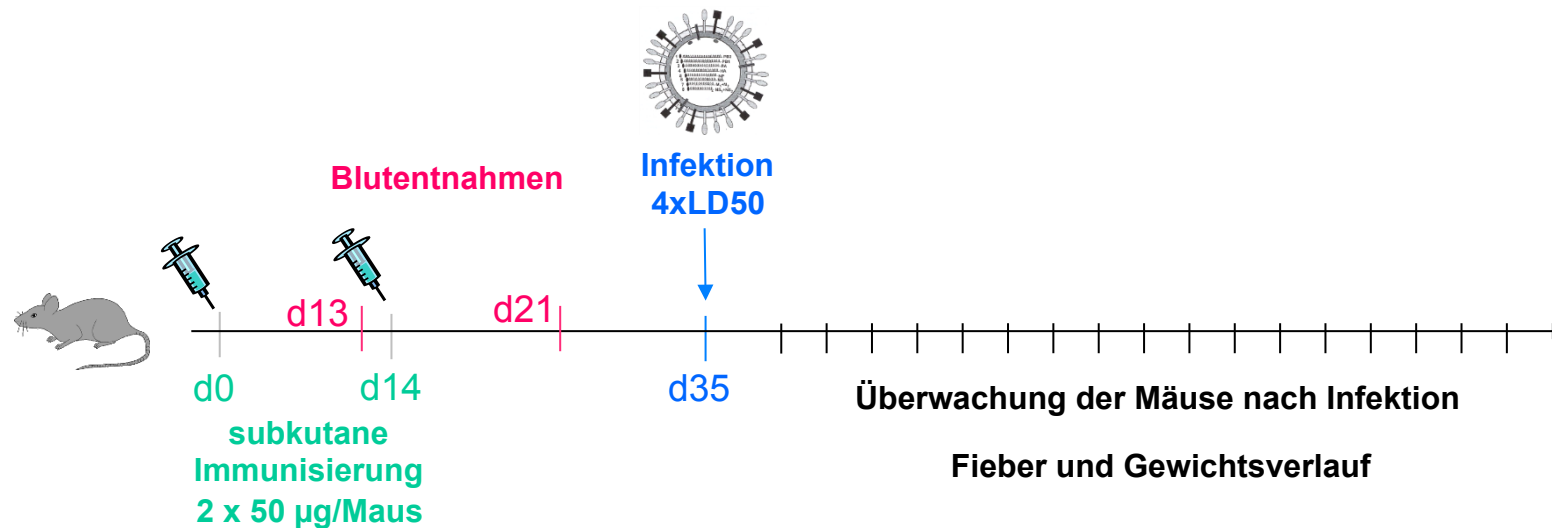
Antikörper Messung



- kein signifikanter Unterschied der spezifischen M2 Titer zwischen AP205-M2, VLP1-M2 und VLP2-M2
- VLP3-M2 hat einen signifikant tieferen M2 spezifischen Antikörpertiter

Influenza A M2 Impfstoff

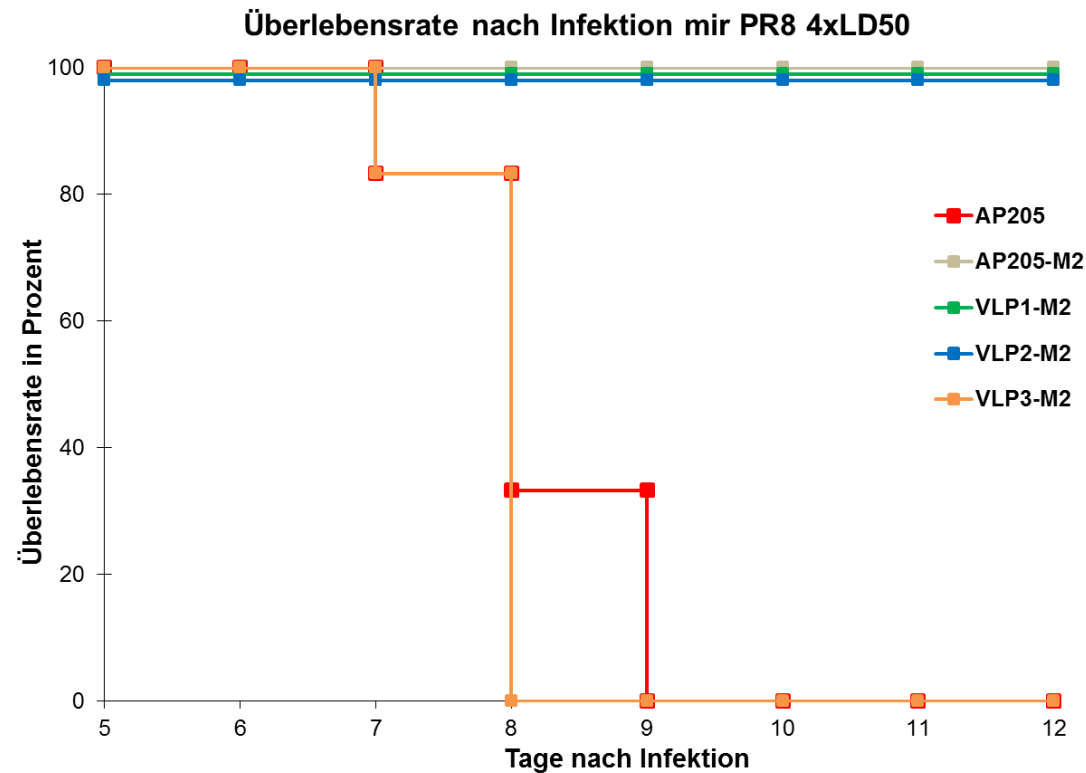
Mausexperimente



- intranasale Applikation des PR8 Virus, 2 x 50µl im Abstand von 30-60 Minuten
- tägliche Gewichtskontrolle und Temperaturbestimmung der Mäuse

Influenza A M2 Impfstoff

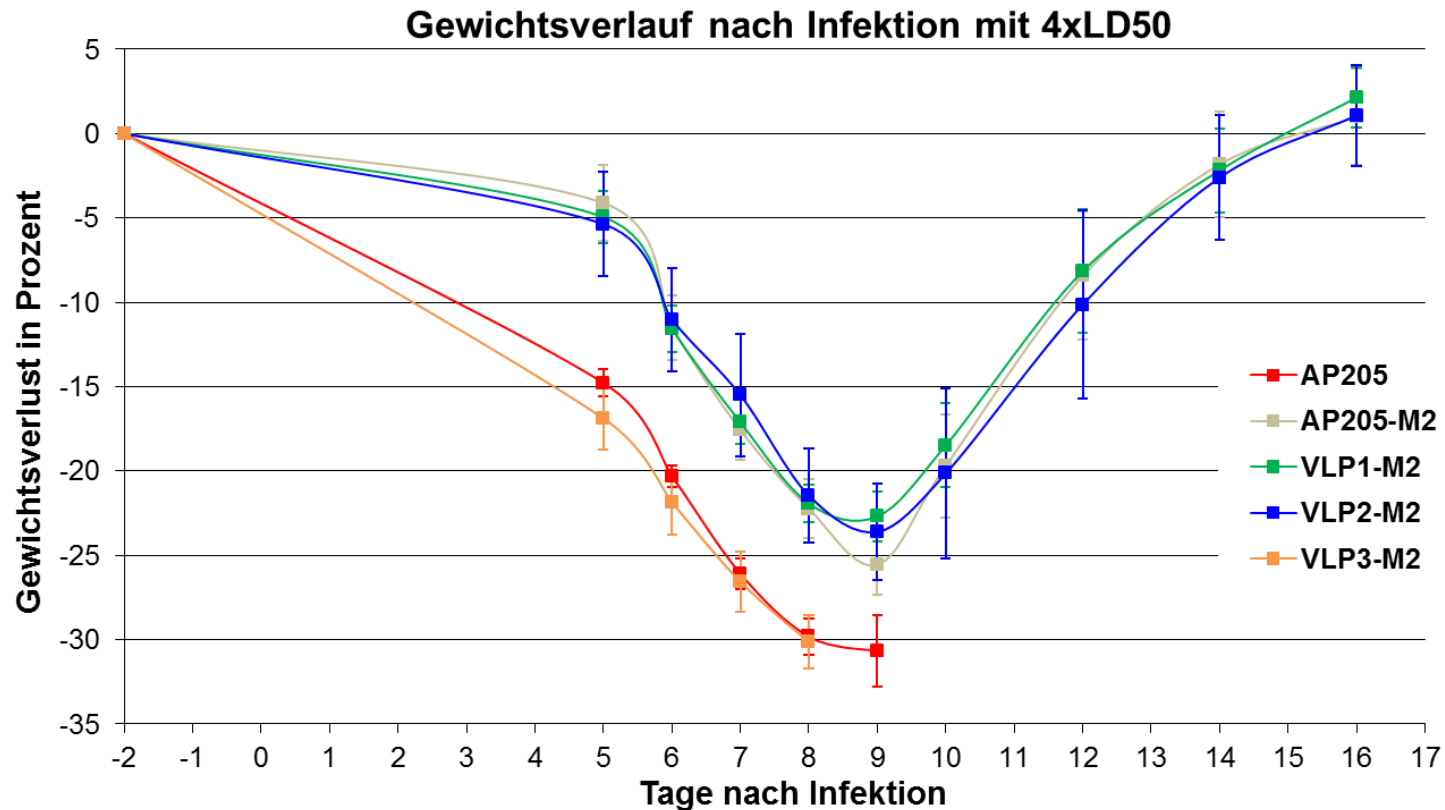
Überlebensrate



- alle VLP Kontrollen sowie die VLP3-M2 geimpften Gruppe haben eine Sterberate von 100% nach letaler Virusinfektion
- bei AP205-M2, VLP1-M2 und VLP2-M2 überleben 100% aller Mäuse bei gleicher Infektion

Influenza A M2 Impfstoff

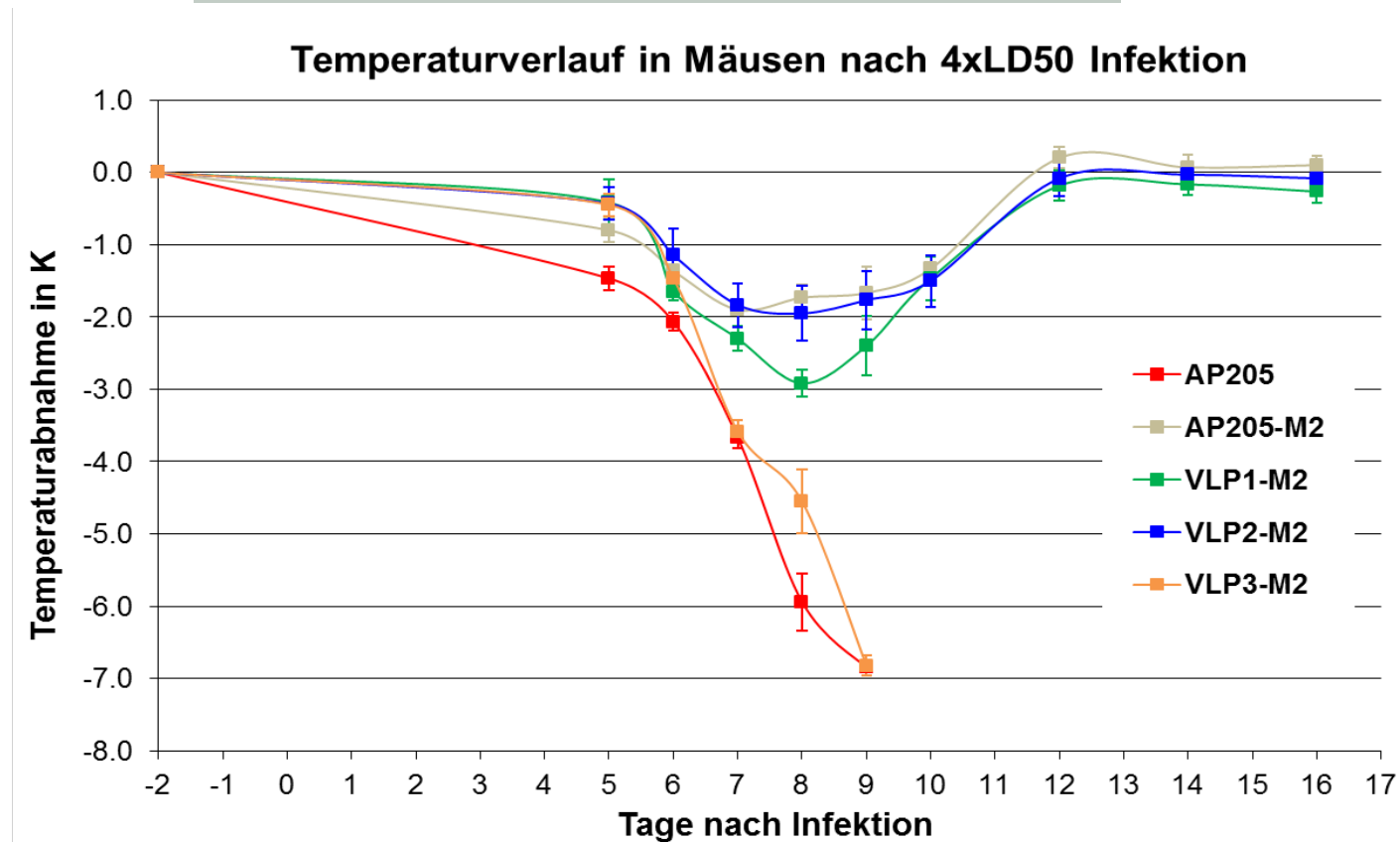
Krankheitsverlauf



- alle VLP Kontrollen sowie die VLP3-M2 geimpfte Gruppe haben einen signifikant höheren Gewichtsverlust als alle anderen Gruppen

Influenza A M2 Impfstoff

Krankheitsverlauf



- alle VLP Kontrollen sowie die VLP3-M2 geimpfte Gruppe haben eine signifikant höhere Temperaturabnahme als alle anderen Gruppen

Influenza A M2 Impfstoff

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
 - aktuelle Impfstrategien
 - Antigen shift und Drift
- M2 als Alternative
- VLP Technologie
- Impfstoffherstellung
- Impfstofftests
- Zusammenfassung

Influenza A M2 Impfstoff

Zusammenfassung

- Das VLP3-M2 hat eine sehr viel schlechtere Kopplungseffizienz als AP205-M2 sowie VLP1-M2 und VLP2-M2. Daraus resultiert auch ein geringerer M2 spezifischer Antikörpertiter. Die Mäuse dieser Gruppe überleben eine letale Influenza A Infektion nicht.
- Es konnte kein Impfstoff gefunden werden, welcher besser als AP205-M2 war, aber die Impfung mit VLP1-M2 und VLP2-M2 zeigte eine vergleichbare Wirkung wie AP205-M2.

Influenza A M2 Impfstoff

Danksagung

Nicole Schmitz

Jan Kisielow

Monika Bauer

Roger Beerli



Klaus Dietmeier

Patrik Maurer

Simone Muntwiler

Philippe Saudan

