

Bericht zur Max-Buchner-Forschungsarbeit
*„Polymer-basierte Nanoträger zur Etablierung von Impfstoffen
gegen infektiöse Krankheiten“ (MBFSt-Kennziffer: 3807)*

Prof. Dr. Lutz Nuhn, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
(zuvor: Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz)

1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Für erfolgreiche immuntherapeutische Interventionen gegen Infektionskrankheiten oder sogar gegen Krebs sind starke antigenspezifische Immunantworten erforderlich. Zu diesem Zweck müssen immunstimulierende Wirkstoffe gemeinsam mit krankheitsspezifischen Antigenen kombiniert und Antigen-präsentierenden Zellen wirksam zugeführt werden. Nur so werden sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten potent und nachhaltig ausgelöst.

In eigenen Arbeiten konnten wir bisher nachweisen, dass Imidazochinoline ihr enormes Potenzial als niedermolekulare Agonisten des Toll-like-Rezeptors 7/8 (TLR7/8) zur Immunstimulierung unter Beweis stellen können, wenn sie über Polymer-basierte Nanoträger verabreicht werden.¹⁻³

Zur weiteren Anwendung als Impfstoffe gegen infektiöse Krankheiten oder sogar gegen Krebs sollen die Polymer-basierten Nanoträger zusätzlich mit Antigenen versehen werden. Wegen ihrer einfachen Herstellung und schnellen Zugänglichkeit stellen Peptid-basierte Antigene vielversprechende Antigenkandidaten dar. Da sie allein nur eine geringe Immunogenität aufweisen, sollen sie im Rahmen dieses Projekts an TLR 7/8 Agonist-tragende, biodegradierbare Nanoträgern verknüpft werden und so eine modulare Plattform zur individuellen Zubereitung von Impfstoffen, insbesondere gegen sich rasch ausbreitende Infektionskrankheiten, bewirken.

2. Durchgeführter Arbeitsplan

In vier Arbeitspaketen wurde dieses Projekt erarbeitet:

In einem ersten Schritt sollten Nanogele auf Basis aliphatischer Reaktivester-Poly(trimethylencarbonat)-Blockcopolymeren hergestellt werden, die ein hydrolytisches Abbauverhalten aufweisen. Diese sollten mit TLR7/8 Agonisten versehen und in biodegradierbare Nanogele überführt werden. Dabei sollten die Endgruppen der dafür verwendeten Polymere bioorthogonal adressierbare Click-Einheiten tragen (**WP1**).

Parallel dazu sollten in einem zweiten Schritt Antigen-basierte Peptidsequenzen mit jenen bioorthogonal reaktiven Click-Einheiten spezifisch modifiziert und charakterisiert werden. Dadurch sollte eine Anbindung relevanter Modell-Peptide an die Nanogele ermöglicht werden (**WP2**).

In den abschließenden zwei Arbeitspaketen sollte die Bioaktivität der so gewonnenen Peptid-Nanogel-Vakzine in ersten immunologischen Studien nachgewiesen werden (**WP3**). Dabei sollten auch Zugänge zu anderen klinisch-relevanten Peptidantigenen ermöglichen werden (**WP4**), damit mit diesem System eine rasche modulare Entwicklung von Nanovakzinen gegen infektiöse Krankheiten oder sogar gegen Krebs realisierbar bleibt.

3. Ergebnisse

Während der Projektdurchführung konnte das Prinzip des nanopartikulär medierten, kovalenten Co-Transports von TLR7/8 Agonisten und Protein-Antigenen erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei wurde auf das bereits etablierte, nicht biodegradierbare Methacrylat-System zurückgegriffen, womit sogar erfolgreiche therapeutische Antigen-spezifische Immunantworten gegen verschiedene Tumore eingeleitet werden konnten, mit denen sich das Tumorwachstum kontrollieren ließ.⁴

Zusätzlich konnten während der Projektdurchführung erstmals Nanogel-Systeme auf Basis hydrolytisch spaltbarer Poly(trimethylencarbonat)-Blockcopolymeren hergestellt werden, die mit TLR7/8 Agonisten kovalent beladen wurden und *in vivo* auf Grund des hydrolytischen Abbauverhaltens zu einer transienten Lymphknoten-fokussierten Immunstimulation führten.⁵

Basierend auf diesen positiven Entwicklungen wurde in Arbeitspaket **WP1** die weitere Darstellung von Polycarbonat-Polymeren verfolgt, an deren Endgruppen nach der Nanogelsynthese weitere Modifikationen möglich sind. Damit wurde neben der Konjugation eines TLR7/8-Agonisten als Adjuvans im Kern mittels Reaktivesterchemie auch eine flexible Peptid-Antigen Konjugation mittels bioorthogonale Clickreaktionen auf der Nanogeloberfläche ermöglicht. Unter der Vielzahl an Click-Chemie zugänglichen Reagenzien hatte sich dann doch die SPAAC (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*) als am praktikabelsten für diese Zwecke erwiesen. Azid-Endgruppen-haltige PEG-Makroinitiatoren wurden zur kationischen ringöffnenden Polymerisation des Reaktivester-Carbonatmonomers 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on (MTC-PFP) verwendet und daraus eng verteilte, reaktive Nanogel-Präkursor Blockcopolymeren gewonnen (**Abbildung 1**).

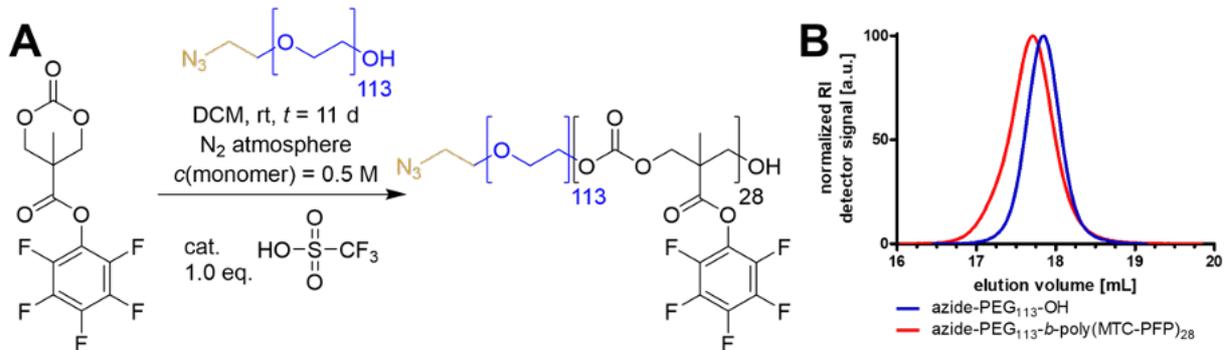


Abbildung 1: Synthese von Azid-haltigen Polycarbonat Blockcopolymeren mit reaktiven Seitenketten. **A:** Syntheschema zur Darstellung von N_3 -PEG₁₁₃-b-poly(MTC-PFP)₂₈. **B:** Größenausschlusselugramm des Makroinitiators N_3 -PEG₁₁₃-OH (blau, $\bar{M}_n = 1.10$) und des Nanogel-Präkursor Blockcopolymeren N_3 -PEG₁₁₃-b-poly(MTC-PFP)₂₈ (rot, $\bar{M}_n = 1.18$).

Die so Azid-haltigen Blockcopolymeren ließen sich in einem selektiven Lösungsmittel (hier: Ethanol) zu Blockcopolymer-Mizellen selbstassemblieren, die einen Durchmesser von rund 24 nm (PDI = 0.2) aufwiesen. Nach anschließender Aminolyse der Reaktivester-Einheiten im Kern der Mizellen durch sequenzielle Zugabe eines Farbstoffs (TMR-cadaverine), des TLR7/8 Agonisten (IMDQ), eines Vernetzers (1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan) und abschließend Ethanolamin (zur vollständigen Umsetzung aller Pentafluorphenylester) konnten Farbstoff-markierte und Adjuvanz-haltige Nanogele gewonnen werden. Deren Durchmesser von rund 25 nm (PDI = 0.1) spricht für eine erfolgreiche Überführung der selbstassemblierten Blockcopolymeren in kernvernetzte Nanogele (**Abbildung 2**).

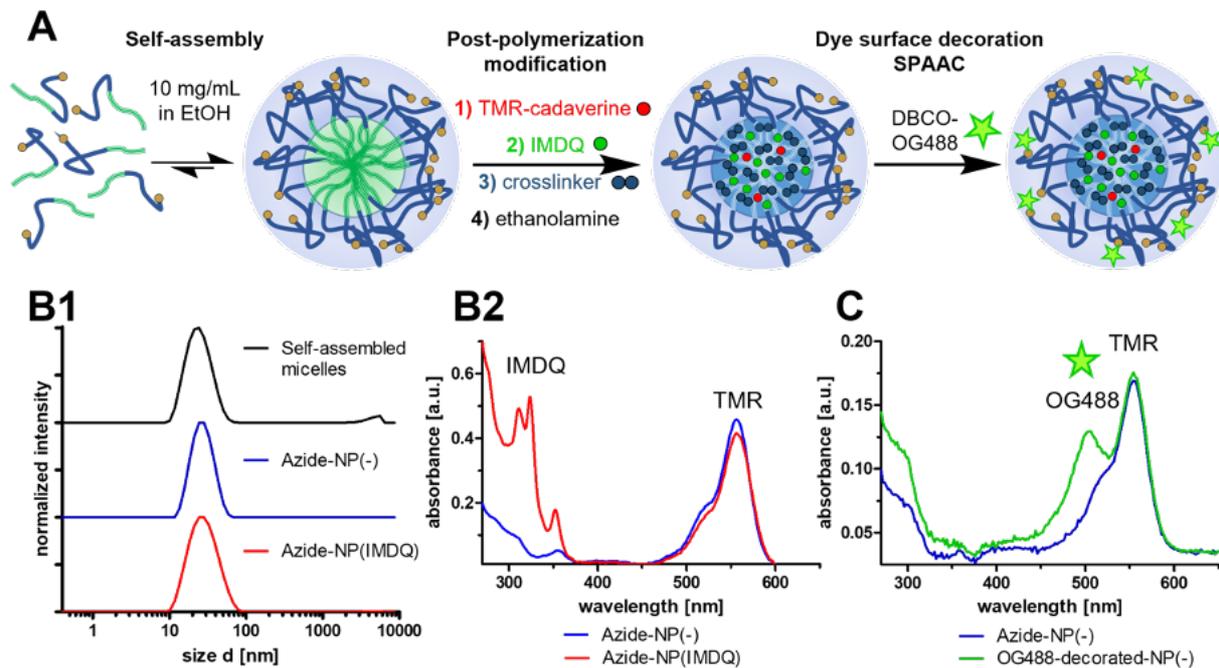


Abbildung 2: Synthese Azid-haltiger Nanogele zur bioorthogonalen Click-Funktionalisierung. **A:** Syntheschema zur Darstellung der Nanogele mit anschließendem Nachweis der Anwesenheit der Azidgruppen durch Umsetzung mit DBCO-OG488. **B1:** DLS Größenverteilung der Präkursormizellen (schwarz) sowie der daraus gewonnenen Nanogele ohne (blau) und mit (rot) dem TLR 7/8 Agonist (IMDQ). **B2:** UVvis Spektren der Nanogele ohne (blau) und mit (rot) dem TLR 7/8 Agonist (IMDQ). **C:** UVvis Spektren der Nanogele nach der Umsetzung mit OG488 (blau) und DBCO-OG488 (grün).

Der Nachweis der Azid-Gruppen auf der Nanogeloberfläche konnte durch Zugabe eines DBCO-haltigen Farbstoffs (DBCO-OG488, im Vergleich zu OG488 ohne DBCO) erbracht werden. Nach mehrfachen Waschschritten konnte die kovalente Anbindung des Farbstoffs mittels UV-Spektroskopie bestätigt werden (**Abbildung 2C**).

Im Arbeitspaket **WP 2** wurden Peptidsequenzen für die Anbindung an diese Nanogele selektiv mit komplementär clickbaren Einheiten versehen. Dafür wurden zunächst Fluoreszenz-markierte Modellantigen-Peptidsequenzen aus Ovalbumin, die über den MHC-II bzw. MHC-I Komplex zur Ausreifung Ovalbumin-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führen, ausgewählt und am N-Terminus mit einem Cystein versehen. An diese Einheiten erfolgte anschließend mittels Maleimid-Kopplungschemie durch DBCO-PEG₁₂-Maleimid eine selektive Funktionalisierung der Antigene mit DBCO-Einheiten, die eine bioorthogonale Konjugation der Peptide an die Azide auf der Nanogel-Oberfläche ermöglichen. Die erfolgreiche Modifikation der beiden Peptide konnte mittels LC-MS nachgewiesen werden (**Abbildung 3**).

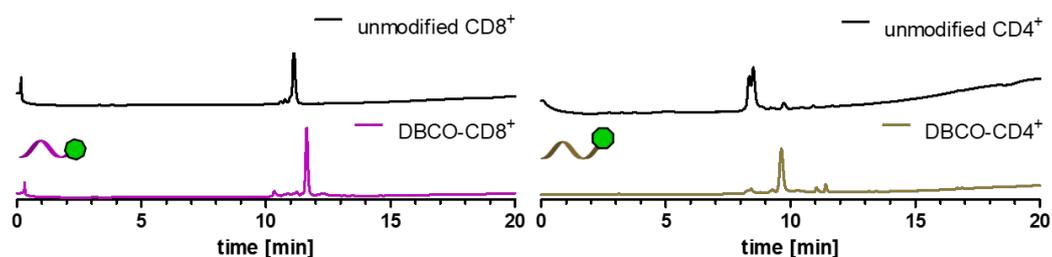


Abbildung 3: Modifikation der Ovalbumin abgeleiteten CD8⁺- und CD4⁺-Peptidantigenen mit DBCO-PEG₁₂-maleimid. Die HPLC Elugramme der entsprechenden Peptide zeigen eine Verschiebung des Peptidsignals zu höheren Elutionszeiten nach der Modifikation mit DBCO-PEG₁₂-maleimid.

Für das DBCO-PEG₁₂-CD8⁺ Peptid wurde eine Masse von 1108.3 g/mol nachgewiesen, was einer dreifachen Protonierung der gewünschten Produktmasse $[M+3H]^{3+}$ entspricht, während für das DBCO-PEG₁₂-CD4⁺ Peptid drei Massen von 816.8, 1020.7 und 1360.4 g/mol gefunden wurden, welche jeweils der fünffachen, vierfachen und dreifachen Protonierung der gewünschten Produktmassen $[M+5H]^{5+}$, $[M+4H]^{4+}$ und $[M+3H]^{3+}$ entsprechen.

Mit diesen Peptiden konnte anschließend eine Konjugation an die in WP1 hergestellten Nanogele durchgeführt werden. Durch einfaches Mischen beider Komponenten wurde die Click-Reaktion in einem leicht sauren wässrigen Puffer durchgeführt, damit ein Abbau des Polycarbonat-Rückgrats unterbunden wird. Die erfolgreiche Anbindung der mit 5-Carboxyfluorescein (5-FAM) markierten Peptide an die mit TAMRA-markierten Nanogele konnte entweder mittels UVvis-Spektroskopie oder durch SDS-PAGE mit anschließender Visualisierung unter UV-Belichtung nachgewiesen werden (**Abbildung 4**).

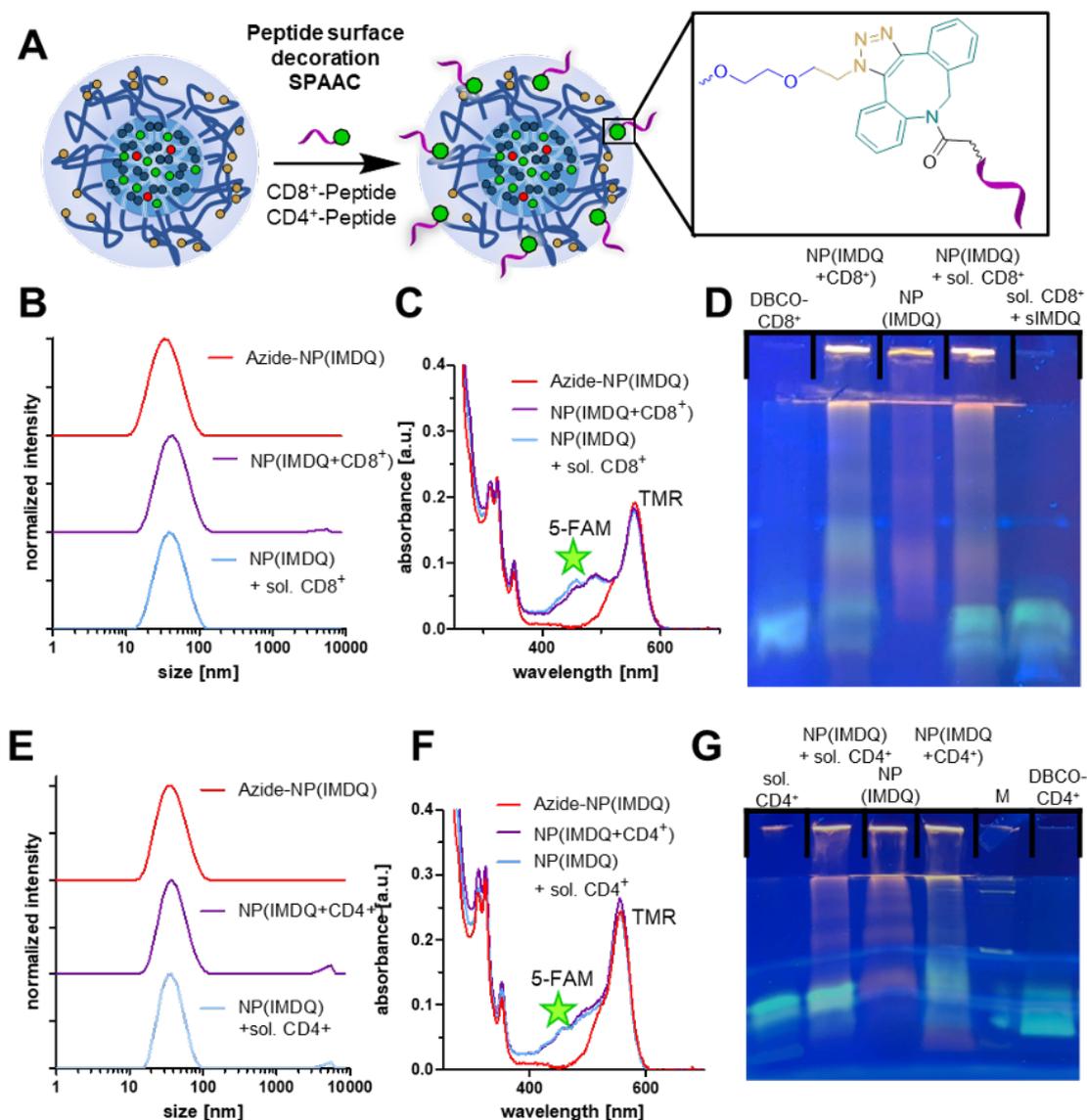


Abbildung 4: Konjugation der DBCO-funktionalisierten CD8⁺ und CD4⁺ Peptidantigene an die Azid-haltigen, mit IMDQ und TAMRA beladenen Nanogele. Syntheschema (**A**) sowie DLS Größenverteilung, UVvis-Spektren und mit UV-Licht beleuchtete SDS-PAGE Gele der Nanogele nach der Konjugation mit dem CD8⁺- (**B**, **C** und **D**) sowie dem CD4⁺- (**E**, **F** und **G**) spezifischen Ovalbumin-Peptid-Antigen.

Bei den mit DBCO-PEG₁₂-Peptid behandelten Nanogel-Proben konnte in der mit UV-Licht beleuchteten SDS PAGE im Vergleich zu den Nanogel-Mischungen mit unbehandelten Peptiden eine deutliche Reduktion der freien, grün gefärbten Peptidbanden gefunden werden, was auf eine fast vollständige kovalente Anbindung beider Peptide an die Nanogele hindeutete (**Abbildungen 4D** und **4G**).

Im dritten Arbeitspaket **WP3** wurden diese Konjugate dann auf ihre immunologische Wirkung untersucht. Für beide Konstrukte wurde ein Co-Transport des Farbstoff-haltigen Nanogels (rot) mit dem Farbstoff-haltigen Peptid (grün) sowohl konfokalmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch gefunden. Die Anbindung der beiden Peptide hatte keinerlei Einfluss auf das immunstimulatorische Verhalten der am Nanogel ange-bundenen TLR 7/8 Agonisten. In aus Maus-Knochenmark gewonnene, primäre dendritische Immunzellen konnte stets eine Hochregulierung der Reifungsmarker CD80, CD86 und MHC-II gefunden werden, welche für eine anschließende erfolgreiche Antigen-Prä-sentation und Vermehrung Antigen-spezifischer T-Zellen notwendig ist. In **Abbildung 5** sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen exemplarisch für das aus OVA abgeleitete CD4⁺-spezifische Peptidantigen dargestellt.

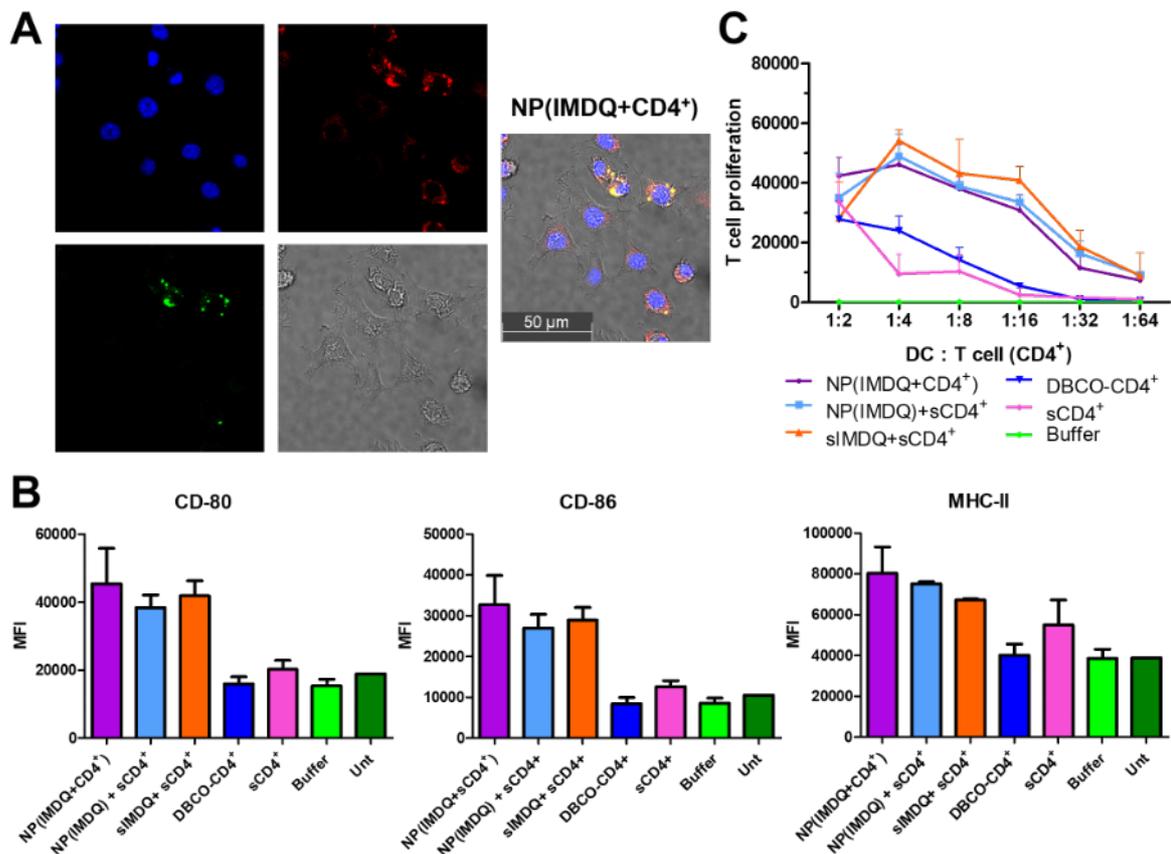


Abbildung 5: Immunologische Untersuchungen der mit CD4⁺-Peptid funktionalisierten IMDQ-haltigen Nanogele. **A:** Konfokalmikroskopische Untersuchungen zeigen einen Co-Transport der TAMRA-markierten IMDQ-Nanogele (rot) mit den FAM-markierten CD4⁺-Peptiden in das Innere von Antigen-präsentierenden Immunzellen (blau: Zellkern – grau: Hellfeldmikroskopie-Bild). **B:** Nach Inkubation mit den angegebenen Proben werden die Reifungsmarker von Knochenmarks-abgeleitete dendritische Zellen mittels Durchflusszytometrie erfasst. **C:** Nach anschließender Inkubation mit CD4⁺-spezifischen T-Zellen (gewonnen aus OT2-Mäusen) wurde eine starke Proliferation dieser Antigen-spezifischer T-Zellen für die Nanogel-Peptid-Konjugate gefunden, sodass auf kein Wirkverlust geschlossen werden kann, wenn alle Komponenten an den Polycarbonat-basierten Nanoträger kovalent angebunden wurden.

Die Peptid-dekorierten Nanogelee, die mit TLR7/8-Agonisten beladen sind, können daher erfolgreich von Antigen-präsentierenden Zellen verarbeitet werden und damit vielversprechende Antigen-spezifische Immunantworten einleiten, die in weiteren Versuchen noch näher auf ihre Qualität untersucht werden.

Im vierten und letzten Arbeitspaket **WP4** wurde die Modularität der untersuchten Nanovakzin-Plattform weiter ausgenutzt, um zusätzliche relevante Peptid-Antigene an die Nanogelee anzubinden, mit denen Immunisierungen gegen sich rasch ausbreitende Infektionskrankheiten oder sogar gegen Krebs eingeleitet werden könnten. Neben einem gegen das SARS-COV-2 Virus gerichtete Antigen-Peptid aus dessen Spike-Protein, welches sowohl ein CD4⁺- als auch ein CD8⁺-Epitop sowie eine Antikörper-Bindungsstelle enthielt, wurde auch ein relevantes Tumor-Neoepitop-Peptidantigen an die Nanogelee angebunden. Um zusätzliche Modifikationen solcher klinisch relevanten Peptide zu umgehen, wurde auf eine Farbstoff-Modifikation der Peptide verzichtet und stattdessen direkt der DBCO-Linker an die Peptide angebunden. Mittels HPLC und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung konnte danach eine kovalente Anbindung dieser Peptide an die Azid-haltigen IMDQ-Nanogelee nachgewiesen werden (**Abbildung 6**). Damit wurde das Prinzip einer raschen, individualisierbaren Anbindung von diversen Peptid-Antigenen an die immunstimulatorischen Nanogelee mehrfach bestätigt.

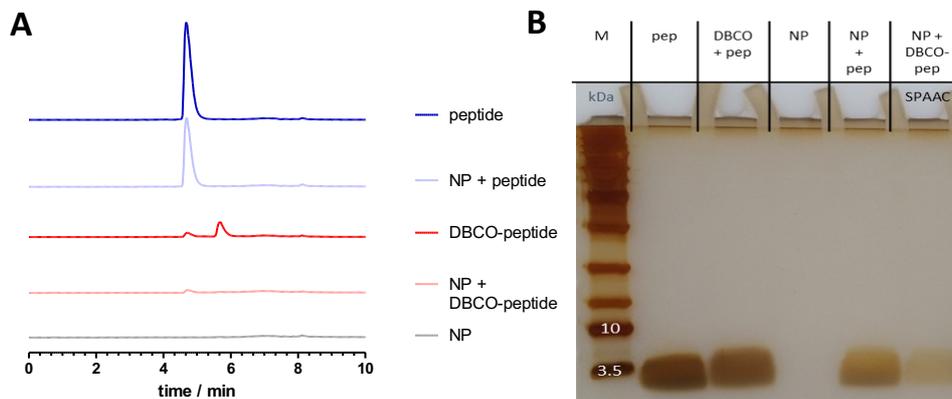


Abbildung 5: Modifikation und Anbindung eines klinisch relevanten Peptid-Antigens (Tumor-Neoantigens) an die Azid-haltigen IMDQ-Nanogelee. HPLC Elugramme (**A**) und SDS-PAGE mit anschließender Silber-Färbung (**B**) der Proben vor und nach Anbindung an die Azid-Nanogelee (zusammen mit entsprechenden Kontroll-Proben).

4. Fazit

Dank der Unterstützung durch die Max-Buchner-Stiftung konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals biodegradierbare Nanogelee hergestellt werden, die individuell mit unterschiedlichen Peptid-Antigenen kovalent beladbar sind und damit Antigen-spezifische Immunantworten einleiten, mit denen sich nicht nur Nanopartikel-basierte Impfstoffe zur Prävention gegen sich rasch ausbreitende Infektionskrankheiten herstellen lassen, sondern sogar eine therapeutische Immunisierungen gegen Tumore im Rahmen einer antigenspezifischen Krebsimmuntherapie erlauben würden. Nähere Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus und werden im Rahmen weiterer Projekte näher untersucht.^{6,7}

Insgesamt stellt die modulare Funktionalisierung der biodegradierbaren Nanopartikel mit jeweils relevanten Peptidantigenen eine relevante Nanovakzin-Plattform dar, mit der bei Bedarf auf entsprechende Krankheitsszenarien rasch reagiert werden könnte.

5. Literatur

- (1) Nuhn, L.; Vanparijs, N.; De Beuckelaer, A.; Lybaert, L.; Verstraete, G.; Deswarte, K.; Lienenklaus, S.; Shukla, N. M.; Salyer, A. C. D.; Lambrecht, B. N.; Grooten, J.; David, S. A.; De Koker, S.; De Geest, B. G. PH-Degradable Imidazoquinoline-Ligated Nanogels for Lymph Node-Focused Immune Activation. *Proc. Natl. Ac.Sci.* **2016**, *113*, 8098–8103.
- (2) Nuhn, L.; Hoecke, L. Van; Deswarte, K.; Schepens, B.; Li, Y.; Lambrecht, B. N.; Koker, S. De; David, S. A.; Saelens, X.; De Geest, B. G. Potent Anti-Viral Vaccine Adjuvant Based on PH-Degradable Nanogels with Covalently Linked Small Molecule Imidazoquinoline TLR7/8 Agonist. *Biomaterials* **2018**, *178*, 643–651.
- (3) Nuhn, L.; De Koker, S.; Van Lint, S.; Zhong, Z.; Catani, J. P.; Combes, F.; Deswarte, K.; Li, Y.; Lambrecht, B. N.; Lienenklaus, S.; Sanders, N. N.; David, S. A.; Tavernier, J.; De Geest, B. G. Nanoparticle-Conjugate TLR7/8 Agonist Localized Immunotherapy Provokes Safe Antitumoral Responses. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1803397.
- (4) Stickdorn, J.; Stein, L.; Arnold-Schild, D.; Hahlbrock, J.; Medina-Montano, C.; Bartneck, J.; Ziß, T.; Montermann, E.; Kappel, C.; Hobernik, D.; Haist, M.; Yurugi, H.; Raabe, M.; Best, A.; Rajalingam, K.; Radsak, M. P.; David, S. A.; Koynov, K.; Bros, M.; Grabbe, S.; Schild, H.; Nuhn, L. Systemically Administered TLR7/8 Agonist and Antigen-Conjugated Nanogels Govern Immune Responses against Tumors. *ACS Nano*, *2022*, *16*, 4426–4443.
- (5) Czysch, C.; Medina-Montano, C.; Zhong, Z.; Fuchs, A.; Stickdorn, J.; Winterwerber, P.; Schmitt, S.; Deswarte, K.; Raabe, M.; Scherger, M.; Combes, F.; De Vrieze, J.; Kasmi, S.; Sanders, N. N.; Lienenklaus, S.; Koynov, K.; Räder, H. J.; Lambrecht, B. N.; David, S. A.; Bros, M.; Schild, H.; Grabbe, S.; De Geest, B. G.; Nuhn, L. Transient Lymph Node Immune Activation by Hydrolysable Polycarbonate Nanogels. *Adv. Functional Mater.* **2022**, *32*, 2203490.
- (6) Czysch, C. Functional Polycarbonate Polymers for Drug Delivery. *Doktorarbeit JGU Mainz* **2023** (Betreuung: Lutz Nuhn).
- (7) Stickdorn, J. Multifunctional Nanogels for Cancer Immunotherapy. *Doktorarbeit JGU Mainz* **2023** (Betreuung: Lutz Nuhn).