

**Induction of T cell responses with virus-like particles: Combining adaptive
and innate immunity for optimal efficacy**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
TAZIO STORNI
Dipl. Natw. ETH
born 4th January 1975
citizen of Bidogno, TI

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hengartner, examiner
Prof. Dr. M. Kopf, co-examiner
Prof. Dr. R.M. Zinkernagel, co-examiner
Dr. M.F. Bachmann, co-examiner

Summary

The immune system may be subdivided into two main compartments termed the innate and the adaptive immune systems. Although they have distinct functions, successful immune responses are often the result of a tight cooperation between their different defence mechanisms. Dendritic cells (DCs) are key players of innate immunity and have been previously shown to be the most prominent T lymphocyte activators. DCs have the capability to sense and take up antigens (pathogens) in peripheral tissues and, upon maturation, migrate to secondary lymphoid organs where they present antigens to specific T cells. While antigens (Ags) of exogenous origin fuel the MHC class II pathway, endogenous Ags are presented in association with MHC class I molecules. In addition, various observations have indicated that depending on the form of the antigen and its concentration, exogenous antigens may reach the MHC class I pathway as well. Chapter 1 shows that virus-like particles (VLPs), which are structured protein capsids of viral origin, are efficiently taken up by professional antigen-presenting cells and presented on MHC class I and class II molecules. Despite this, significant cytotoxic T cell (CTL) responses were only generated when adjuvants required for APC activation were co-administered. In chapters 2 and 3 the mechanisms that govern T cell proliferation and the induction of effector functions *in vivo* and *in vitro* are investigated in more detail. The key findings from this work were that both prolonged Ag presentation (for up to three days) and APC activation are necessary for T cell activation *in vivo*, whereas APC activation is dispensable *in vitro*. Chapter 4 describes improvements of the formulation of VLP-vaccines. Most notably, VLPs mixed with CpG-containing DNA oligonucleotides were shown to be toxic and induced systemic side-effects, whereas packaging CpG-DNA into the VLPs avoided these side-effects and significantly improved immunogenicity. A study of the efficiency of cross-priming of viral proteins is detailed in chapter 5. The surprising finding from this investigation was that the efficiency of cross-presentation of exogenous VLP-derived Ags is only marginally lower than the classical MHC class II presentation pathway (1 – 10-fold). Taken together, these data show that cross-priming, provided Ag is presented by activated DCs, is an effective process. Since effector CTLs may be able to cope with tumors and chronic viral infections, VLPs represent promising candidates for a new generation of therapeutic vaccines.

Zusammenfassung

Generell kann ein sogenanntes „angeborenes“ von einem „erworbenen“ Immunsystem unterscheiden werden. Obwohl beide unterschiedliche Funktionen ausüben, ist eine erfolgreiche Immunantwort häufig das Ergebnis einer engen Zusammenarbeit zwischen den verschiedenen Abwehrmechanismen der beiden. Dendritische Zelle (DCs) sind zentrale zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems und es konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie zu den wichtigsten Aktivatoren von T-Lymphozyten gehören. Dendritische Zellen haben die Fähigkeiten, Antigene bzw. Krankheitserreger in peripheren Geweben aufzuspüren und aufzunehmen und wandern, nachdem sie gereift sind, zu den sekundären lymphoiden Organen, wo sie die aufgenommenen Antigene spezifischen T-Zellen präsentieren.

Während extrazelluläre Antigene in den MHC-Klasse II Weg münden, werden endogene Antigene im Verbund mit MHC-Klasse I Molekülen präsentiert. Darüber hinaus haben verschiedene Beobachtungen gezeigt, dass in Abhängigkeit von ihrer Struktur und ihrer Konzentration, auch extrazelluläre Antigene den MHC-Klasse I Weg erreichen können.

In Kapitel 1 der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Virus-ähnliche Partikel (sogenannte „VLPs“), bei denen es sich um Proteinhüllen viralen Ursprungs handelt, effizient von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen und auf MHC-Klasse I („Cross-Präsentation“) und –Klasse II Molekülen präsentiert werden können. Für eine bedeutende zytotoxische T-Zell Antwort müssen jedoch gleichzeitig Adjuvantien, die für die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen benötigt werden, verabreicht werden.

In Kapitel 2 und 3 wurden die Mechanismen genauer untersucht, die der T-Zell Vermehrung und der Induktion von Effektorfunktionen *in vivo* und *in vitro* zugrunde liegen. Die wichtigsten Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine zeitlich längere Präsentation des Antigens (für bis zu drei Tagen) als auch die Aktivierung von APCs für die T-Zell Aktivierung *in vivo* benötigt werden; dahingegen kann unter *in vitro* Bedingungen auf die Aktivierung der APCs verzichtet werden.

In Kapitel 4 wird beschrieben, wie die Formulierung von Impfstoffen, die auf VLPs beruhen, verbessert werden kann. Bemerkenswerter Weise konnte gezeigt werden, dass VLPs, die mit CpG-enthaltenden Oligodeoxynukleotiden gemischt wurden, toxisch sind und systemische Nebeneffekte hervorrufen. Das „Beladen“ von VLPs mit diesen CpG-

enthaltenen Oligodeoxynukleotiden verhindert hingegen das Auftreten dieser Nebeneffekte und verstärkt darüber hinaus die Immunogenität des Impfstoffes.

Eine genauere Studie zur Effizienz des sogenannten „Cross-Primings“ viraler Proteine folgt in Kapitel 5. Eines der überraschenden Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt, dass die Wirksamkeit des MHC-Klasse I-abhängigen „Cross-Primings“ durch extrazelluläre VLP-Antigene nur unwesentlich geringer ist (ein- bis zehnfach), als die des klassischen MHC-Klasse II Weges. Unter der Voraussetzung, dass Antigene durch aktivierte DCs präsentiert werden, wird „Cross-Priming“ zu einem effektiven Prozess.

Da Effektor-CTLs in der Lage sind, Tumoren und chronische virale Infektionen zu beherrschen, könnten VLPs vielversprechende Kandidaten einer neuen Generation therapeutischer Impfstoffe darstellen.