



Doctoral Thesis

Generation and characterization of a polyvalent vaccine against *Salmonella typhi* and evaluation of porin-specific immune responses in humans

Author(s):

Carreño Quiroz, Juan Manuel

Publication Date:

2017

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000235575> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 24418

**Generation and characterization of a polyvalent vaccine
against *Salmonella typhi* and evaluation of porin-specific
immune responses in humans.**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc ETH Zurich)

presented by

JUAN MANUEL CARREÑO QUIROZ

Master of Science, National Autonomous University of Mexico (UNAM)

Born on 03.10.1987

citizen of Mexico

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Dr. Burkhard Ludewig

Prof. Dr. Bruno Gander

Prof. Dr. Nicole Joller

2017

1. Summary

Salmonella (S.) enterica infections are an important global health problem affecting mainly low-income countries with scarce sanitation conditions. Despite the presence of two vaccines against typhoid fever, more than 20 million individuals suffer from enteric fever annually, resulting in more than 200,000 lethal cases per year. The vaccines available in the market exhibit short-term protection, are not suitable for younger infants and require special temperature conditions for transport. Therefore, there is a significant need for identification and study of new molecular targets from *Salmonella* that contribute to develop safe and cost-effective vaccines against Typhoid fever that induce long-term protection.

Outer membrane proteins (Omps) from *S. typhi* represent *sui generis* molecular targets that induce long-term protective immune responses in animal models and humans. In the present work we focused on the development and characterization of a vaccine formulation based on *S. typhi* OmpC/OmpF porins. As a second aim, we studied the specific immune responses directed against OmpC/OmpF porins from the vaccine strain Ty21a after its administration to healthy volunteers.

The microencapsulation of *S. typhi* porins into poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) protected the multimeric structure of the vaccine antigen from acidic degradation and enhanced its immunogenicity following oral administration to mice. Moreover, the vaccine induced strong *S. typhi*-specific B cell responses in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes. Hence, this PLGA-microencapsulated porin-based formulation substantially enhanced the efficacy of oral vaccination against *S. typhi* and may represent a suitable formulation to be tested in clinical trials.

In the second part of this work, the administration of Ty21a to healthy volunteers allowed us to study the evolution of the immune responses elicited against *S. typhi* porins. B cell responses, namely antibody and cellular measurements, as well as characterization of T cell responses was assessed before vaccination and at day 7, 21 and 56 after the last vaccine dose administration. The majority of the participants (80-85%) exhibited specific anti-porin IgM/IgG antibodies in serum, with a significant increase at all time points tested that peaked at day 7 after vaccination for IgM and at day 21 for IgG. Likewise, Ty21a administration induced a significant increase in circulating Antibody Secreting Cells (ASCs) at days 21 and 56. Moreover, vaccinated subjects displayed high frequencies of CD4⁺ cells expressing the activation marker CD40L that could be detected at days 21 and 56 after vaccination. Additionally, measurement of the specific IgA levels in stool samples showed an increase in antibody levels at day 56 after vaccination. Altogether, these results showed that porin-specific immune responses presented in a concerted manner upon priming of immune cells with the outer membrane proteins contained in the vaccine strain Ty21a.

In sum, this work describes the generation of a vaccine formulation containing the well characterized *S. typhi* porins OmpC/OmpF, and demonstrates that even within the pool of antigenic determinants contained in the vaccine strain Ty21a; porins are capable of inducing detectable immune responses by conventional laboratory assays, reinforcing the notion that these proteins represent promising targets for vaccination.

2. Zusammenfassung

Salmonella (S.) enterica Infektionen stellen ein weltweites Gesundheitsproblem dar, das hauptsächlich einkommensschwache Länder mit schlechten sanitären Bedingungen betrifft. Trotz des Vorhandenseins zweier Impfstoffe gegen Typhus, erkrankten mehr als 20 Millionen Personen jährlich an Typhus von denen über 200.000 Fälle pro Jahr tödlich verlaufen. Die auf dem Markt verfügbaren Impfstoffe gewähren lediglich einen kurzfristigen Schutz, sind nicht für Kleinkinder geeignet und benötigen spezielle Temperaturbedingungen während des Transports. Daher sind weitere Studien zur Identifikation neuer molekularer Zielstrukturen von *Salmonella* dringend erforderlich. Dies soll dazu beitragen Impfstoffe gegen Typhus zu entwickeln, die sowohl sicher und kosteneffizient sind, als auch einen langfristigen Schutz gewähren.

Proteine aus der äußeren Membran (Outer membrane proteins, Omps) von *S. typhi* sind einzigartige molekulare Zielstrukturen, die langanhaltende und schützende Immunantworten in Tiermodellen und Menschen induzieren. In dieser Arbeit legten wir den Schwerpunkt auf die Entwicklung und Charakterisierung einer Impfstoffformulierung basierend auf *S. typhi* OmpC/OmpF Porinen. Des Weiteren befasst sich diese Arbeit mit der Analyse spezifischer Immunantworten gegen OmpC/OmpF Porine aus dem Impfstamm Ty21a nach Verabreichung an gesunde Freiwillige.

Die Mikroverkapselung der *S. typhi* Porine in Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) schützte die Multimerstruktur der Impfstoffantigene vor Zersetzung durch Säure und verstärkte deren Immunogenität nach oraler Verabreichung an Mäuse. Außerdem induzierte der Impfstoff starke *S. typhi*-spezifische B Zellantworten in Peyer-Plaques und mesenterischen Lymphknoten. Daraus lässt sich schließen, dass diese PLGA-mikroverkapselte, auf Porinen

basierende Impfstoffformulierung die Effizienz der oralen Impfung gegen *S. typhi* erheblich verbesserte und eine geeignete Formulierung für klinische Studien darstellen könnte.

Die Verabreichung von Ty21a an gesunde Freiwillige ermöglichte uns die Entwicklung von Immunantworten gegen Porine von *S. typhi* zu untersuchen. Sowohl B-Zellantworten, basierend auf Antikörper- und zellbasierten Messungen, als auch T-Zellantworten wurden vor der Impfung und an den Tagen 7, 21 und 56 nach Gabe der letzten Impfstoffdosis analysiert. Bei der Mehrheit der Studienteilnehmer (80-85%) waren spezifische IgM/IgG-Antikörperantworten im Serum feststellbar, die zu jedem gemessenen Zeitpunkt signifikant höher waren und 7 Tage nach der Impfung für IgM bzw. 21 Tage nach der Impfung für IgG ihre Spitzenwerte erreichten. Des Weiteren rief die Gabe von Ty21a einen signifikanten Anstieg von antikörpersekretierenden Zellen (Antibody Secreting Cells, ASCs) an den Tagen 21 und 56 hervor. Zudem waren in geimpften Probanden hohe Zahlen an CD4⁺ Zellen nachweisbar, welche die Aktivierungsmarker CD40L an den Tagen 21 und 56 nach Impfung exprimierten. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass porinspezifische und feinabgestimmte Immunantworten nach Immunzellaktivierung mit Proteinen der äußeren Membran des Ty21a Impfstammes generiert wurden.

Alles in allem beschreibt diese Arbeit die Erzeugung einer Impfstoffformulierung, die auf den gut beschriebenen *S. typhi* Porinen OmpC/OmpF basiert. Zudem beweist diese Arbeit, dass die verwendeten Porine selbst im Kontext einer Vielzahl verschiedener potentiell antigener Faktoren, die im Impfstamm Ty21a enthalten sind, durch herkömmliche Laboranalysen nachweisbare Immunantworten hervorrufen können. Daraus kann geschlossen werden, dass die Proteine vielversprechende Zielstrukturen für zukünftige Impfungen darstellen.