

**ENTWICKLUNG VON IMMUNISIERUNGSSTRATEGIEN ZUR INDUKTION  
HOHER FUNKTIONALER ANTIKÖRPERANTWORTEN**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Rebecca Schmidt  
aus Frankfurt am Main/Höchst

Frankfurt am Main 2018  
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz  
1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek, Institut für Pharmazeutische Biologie,  
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
2. Gutachter: Prof. Dr. Veronika von Messling, Paul-Ehrlich-Institut,  
Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel,  
Abteilung Veterinärmedizin

Datum der Einreichung: 04.04.2018

Datum der Disputation: 04.07.2018

„Auch die Wissenschaft ist nicht ein Ziel, sondern eine Art unseres Geistes.“

—FRANZ MARC—

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Akute virale Infektionskrankheiten</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Influenzaviren.....	4
2.1.2 Die H1N1-Influenza-A-Pandemie 2009 .....	6
2.1.3 Ebolaviren .....	8
2.1.4 Die Zaire-Ebolavirus-Epidemie 2014.....	9
<b>2.2 Antivirale Strategien im Angesicht akuter viraler Infektionen</b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Antikörper gegen virale Infektionen.....	11
<b>2.3 Aktive Immunisierung</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 Der saisonale Influenza-Impfstoff.....	14
2.3.2 Der pandemische Influenzaimpfstoff A(H1N1)pdm09 .....	15
<b>2.4 Passive Immunisierung – temporärer Schutz und Therapie-Option</b> .....	<b>17</b>
2.4.1 Antiseren gegen akute virale Infektionen: sofortige Immunität durch passiven Immuntransfer .....	20
<b>2.5 Die Notwendigkeit von Plattform-Technologien zur Beurteilung von Antikörperantworten gegen ZEBOV</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>23</b>
2.6.1 Impfstrategie im Angesicht einer Pandemie: verbesserte Immunogenität durch Adjuvantien .....	23
2.6.2 Antiseren gegen akute virale Infektionen: sofortige Immunität durch passiven Immuntransfer .....	24
<b>3 Material</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Geräte und Laborinstrumente</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Chemikalien, Puffer und Reagenzien</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Kommerzielle Kits</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Enzyme und Reaktionspuffer</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6 Plasmide</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7 Oligonukleotide</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8 Antikörper und Seren</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9 Bakterien</b> .....	<b>33</b>
<b>3.10 Viren</b> .....	<b>33</b>
<b>3.11 Zelllinien</b> .....	<b>34</b>
<b>3.12 Tiere</b> .....	<b>34</b>
<b>3.13 Software und Datenbanken</b> .....	<b>34</b>
<b>4 Methoden</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>35</b>
4.1.1 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese.....	35
4.1.2 Amplifizierung, Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	37
4.1.3 Enzymatische Modifikation von DNA und Klonierung von Plasmiden.....	39
4.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	41
4.1.5 Isolation und Analyse von Plasmid-DNA.....	41
4.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten.....	44

<b>4.2 Zellkultur- und virologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
4.2.1 Arbeiten mit Zelllinien .....	44
4.2.2 Virologische Arbeiten .....	46
<b>4.3 Charakterisierung von Proteinproben .....</b>	<b>47</b>
4.3.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.....	48
4.3.2 SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung.....	48
4.3.3 Western-Blot-Analyse .....	49
<b>4.4 In-vivo-Studien.....</b>	<b>50</b>
4.4.1 Immunisierung, Blutentnahme und Infektion von Frettchen.....	50
4.4.2 Immunisierung und Blutentnahme bei Mäusen .....	50
4.4.3 Hyperimmunisierung und Blutentnahme bei Kaninchen.....	51
<b>4.5 Reinigung und Modifikation von Antikörpern aus Hyperimmunseren.....</b>	<b>51</b>
4.5.1 Serumgewinnung aus Vollblut.....	51
4.5.2 Zwei-Schritt-Ammoniumsulfat-Präzipitation .....	51
4.5.3 IgG-Affinitätschromatographie und Pufferaustausch.....	52
4.5.4 Quantifizierung des Protein- und IgG-Gehalts .....	53
4.5.5 Enzymatische IgG-Spaltung mit Pepsin .....	54
<b>4.6 Charakterisierung und Quantifizierung von Antikörpern .....</b>	<b>54</b>
4.6.1 Quantifizierung totaler Antikörperlevel.....	54
4.6.2 Quantifizierung funktionaler Antikörperlevel.....	56
<b>4.7 Phylogenetische Analyse .....</b>	<b>57</b>
<b>4.8 Statistische Analyse .....</b>	<b>57</b>
<b>5 Eigener Beitrag.....</b>	<b>59</b>
<b>6 Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
<b>6.1 Untersuchung der Wirkung squalenbasierender Adjuvanzien auf die Qualität und Spezifität der Antikörperantworten.....</b>	<b>61</b>
6.1.1 Funktionale Antikörperantworten gegen das pandemische Isolat A/Hamburg/05/2009 (H1N1) .....	62
6.1.2 Funktionale Antikörperantworten gegen phylogenetisch nah verwandte pandemische und gegen ältere saisonale H1N1-Influenzaisolate.....	63
6.1.3 Klonierung von Plasmiden für die rekombinante Expression verschiedener HA- und NA-Proteine .....	64
6.1.4 Vergleich der totalen Antikörperantwort gegen das gesamte Virus und gegen das rekombinant exprimierte HA-Protein .....	67
6.1.5 Untersuchung kreuzreaktiver Antikörperantworten .....	68
6.1.6 Krankheitsverlauf nach Infektion.....	69
6.1.7 Immunschutz nach Infektion.....	69
<b>6.2 Entwicklung therapeutischer Antiseren gegen akute virale Infektionen.....</b>	<b>71</b>
6.2.1 Produktion von ZEBOV-VLPs .....	72
6.2.2 Einfluss des Immunisierungs-Designs auf VLP-induzierte Antikörpertiter .....	74
6.2.3 Wirkung von Adjuvanzien auf die Entwicklung antigenspezifischer und neutralisierender Antikörper.....	75
6.2.4 Vergleich verschiedener Antigenexpressionssysteme .....	76
6.2.5 Skalierung der Antiserenproduktion in Kaninchen und Test der <i>In-vitro</i> -Effektivität gegen das ZEBOV .....	78
6.2.6 Optimierung der Antikörper-Reinigung und Bestimmung der Rückgewinnungsrate neutralisierender Antikörper.....	79

6.2.7	Untersuchung der Stabilität gereinigter IgG- und F(ab') <sub>2</sub> - Produkte im xenogenen <i>In-vivo</i> -Modell.....	85
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
7.1	Immunisierung mit squalenhaltigen Adjuvanzien erhöht signifikant die Antikörperantwort und reduziert die virale Replikation nach Infektion .....	88
7.2	Die Kombination von squalenhaltigen Adjuvanzien mit VLPs ermöglicht eine effektive Produktion neutralisierender Antisera gegen hochpathogene Erreger unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen .....	90
7.3	Vergleichbare Stabilität von homologen und xenogenen IgG-Präparaten <i>in vivo</i> .....	93
7.4	Aussagekraft der Ergebnisse von Surrogat-Analyseverfahren.....	95
7.5	Fazit .....	96
<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>IV</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>V</b>	<b>Erklärung und Versicherung .....</b>	<b>120</b>
<b>VI</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>121</b>
<b>VII</b>	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>123</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Neuartige Viren und Erreger, die sich antigenetisch tiefgreifend von bekannten Varianten unterscheiden, können verheerende Epidemien auslösen, da weder gegen diese Erreger eine Immunität in der Bevölkerung besteht, noch prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen verfügbar sind. Eine prophylaktisch vermittelte Immunität durch Impfung stellt die bei Weitem effektivste Methode zur Vorbeugung viraler Infektionen dar, jedoch sind die Entwicklungs- und Herstellungszeiten eines neuen Impfstoffs in der Regel mit der Ausbruchsdynamik nicht kompatibel. Inzwischen steht zwar eine überschaubare Anzahl antiviraler Medikamente zur Verfügung, doch ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass diese meist hoch spezifischen Wirkstoffe gegen neu auftretende Viren aktiv sind. Das beispiellose Ausmaß der Ebola-Epidemie 2014 führte zum Einsatz experimenteller antikörperbasierter Therapien, welche das Potential der passiven Vermittlung von temporärem Immunschutz naiver Personen verdeutlicht. Für viele neuartige Viren ist die Entwicklung von Therapieansätzen allerdings noch nicht entsprechend weit fortgeschritten. Zudem bedingt eine Verwendung des eigentlichen Erregers oft hohe Sicherheitsmaßnahmen, was die Arbeit erschwert. Aus diesem Grund werden Notfalltherapien benötigt, die schnell in klinisch relevanter Qualität und Quantität unter niedrigen biologischen Sicherheitsmaßnahmen produziert werden können.

Diese Arbeit basiert auf der zentralen Hypothese, dass die Induktion von hohen Titern funktioneller Antikörperantworten die Basis für einen breiteren Schutz gegen antigenetisch entferntere Virusstämme sowie für die schnelle Produktion von therapeutischen Antiseren darstellt.

Um diese Hypothese zu testen und Einblicke in verschiedene Aspekte dieses Prozesses zu bekommen, wurde zunächst die Nutzung von Adjuvanzen als Zusätze für Impfstoffe am Beispiel des pandemischen A(H1N1)pdm09-Impfstoffs untersucht. Neben den alljährlichen Epidemien, die von saisonalen Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1 oder H2N3 verursacht werden, können neuartige Subtypen zu weltweiten Pandemien führen. Während die saisonalen Influenza-Impfstoffe in der Regel keine Adjuvanzen enthalten, wurden einige pandemische H1N1-Impfstoffe aus 2009 mit einem reduzierten Antigengehalt formuliert und mit squalenbasierten Adjuvanzen kombiniert, um eine ausreichende Wirksamkeit bei größerer Verfügbarkeit zu gewährleisten. Zur Charakterisierung des Effekts dieser Adjuvanzen auf die Immunantworten wurden Frettchen mit 2 µg des kommerziellen H1N1pdm09-Impfstoffes alleine sowie in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen immunisiert, die Antikörpertiter gegen homologe und heterologe Influenzastämme untersucht und mit dem Schutz vor einer Infektion korreliert. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung squalenbasierter Adjuvanzen die funktionalen Antikörperantworten um das 100-fache erhöhte und zu einer signifikant reduzierten Viruslast nach der Infektion mit dem homologen pandemischen Virus führte.

Während in keiner Gruppe Antikörper gegen die heterologen Hämagglutinin-(HA-)Proteine H3, H5, H7 und H9 nachweisbar waren, induzierten mit squalenbasierten Adjuvanzen kombinierte Impfstoffe subtypenspezifische Antikörper gegen das N1 Neuraminidase-(NA-)Protein einschließlich H5N1. Darüber hinaus führte die Immunisierung mit squalenbasierten Adjuvanzen zu einer besseren Kontrolle der Influenzavirus-Replikation in den oberen Atemwegen.

Anschließend wurde im zweiten Teil dieser Arbeit unter Einbeziehung der gewonnenen Erkenntnisse eine Immunisierungsstrategie zur schnellen Produktion therapeutischer Hyperimmunseren entwickelt, wobei unterschiedliche Antigenexpressionssysteme miteinander verglichen wurden. Während in den frühen Stadien eines Ausbruchs Rekonvaleszenzseren nicht ohne weiteres verfügbar sind, können Antiseren tierischen Ursprungs innerhalb eines kurzen Zeitraums hergestellt werden. Die Herausforderung liegt in der schnellen Induktion einer schützenden Immunität, wobei die effiziente Produktion und Reinigung von Hyperimmunserum in klinisch relevanten Mengen ebenso essenziell ist wie die Anpassungsfähigkeit der Immunisierungsstrategie an neue oder hinsichtlich ihrer Antigenizität veränderte Viren. Hierzu wurden verschiedene Immunisierungsstrategien in Mäusen und Kaninchen verglichen, die unterschiedliche Expressionssysteme für das Modellantigen Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP) verwenden: (i) Ebolavirus-ähnliche Partikel (VLP), (ii) das rekombinante modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) sowie (iii) das rekombinante Virus der vesikulären Stomatitis (VSV). Im Ergebnis induzierte eine dreimalige Immunisierung mit VLPs in Kombination mit squalenhaltigem Adjuvans neutralisierende Antikörpertiter, die vergleichbar mit der Immunisierung mit replikationskompetentem VSV $\Delta$ G/EBOV-GP waren. Dies deutet darauf hin, dass nicht die *De-novo*-Antigenexpression, sondern vielmehr die mehrfache Präsentation des Antigens in nativer Konformation für die Produktion von neutralisierenden Antikörpern essenziell ist. Darüber hinaus waren die funktionalen Antikörpertiter aller Kaninchenserum in der *In-vitro*-Analyse gegen das Wildtypvirus 10- bis 100-fach höher als der Durchschnitt, der in mit VSV $\Delta$ G/EBOV-GP geimpften Probanden beobachtet wurde. Die Etablierung eines optimierten mehrstufigen Reinigungsverfahrens unter Verwendung einer zweistufigen Ammoniumsulfat-Präzipitation, gefolgt von einer Protein-A-Affinitätschromatographie, führte zu aufgereinigten IgG-Präparationen mit nahezu unveränderter neutralisierender Aktivität, die über neun Tage im xenogenen *In-vivo*-Modell stabil waren. Die signifikante Erhöhung von totalen und funktionalen Antikörpertitern in Kombination mit einer größeren Breite der Antikörperantwort im Kontext von squalenbasierten Adjuvanzen stützt die Hypothese dieser Arbeit. Adjuvantierte Immunisierungsstrategien sind damit ein vielversprechender Ansatz nicht nur zur Wirksamkeitssteigerung von Subunit- und Proteinimpfstoffen, sondern auch zur schnellen Herstellung von therapeutischen Antiseren.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Akute virale Infektionskrankheiten

Weltweit sind Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache. Im Jahr 2015 starben daran laut Statistik der Weltgesundheitsorganisation (WHO) fast neun Millionen Menschen, das sind 16 % aller erfassten Todesfälle (WHO 2015b). Überproportional betroffen waren hierbei die ärmeren Staaten der Welt (WHO 2015a). Doch die von Infektionskrankheiten ausgehende Gefahr ist nicht auf Entwicklungsländer beschränkt. Durch die hohe Mobilität von Personen und Gütern können Infektionserreger wie Bakterien, Viren oder Parasiten fast ungehindert über den Globus verbreitet werden.

Neben den sozialen Auswirkungen sind auch die volkswirtschaftlichen Folgen nicht zu vernachlässigen. So wird die Influenza-Pandemie 2009 für eine Reduktion der mexikanischen Wirtschaftsleistung in diesem Jahr um 0,3–0,5 % verantwortlich gemacht, was 2,7–4,5 Milliarden US-Dollar entspricht (UNSCIC & WORLD BANK 2010), der Ausbruch von SARS in den Jahren 2002 und 2003 global gar für mehr als 50 Milliarden (FAN 2003).

Besondere Gefahren gehen von zwei Arten von Infektionskrankheiten aus: neuartige Erkrankungen, welche bei Menschen zuvor nicht auftraten oder nur eine geringe Personenzahl an isolierten Orten betrafen, und solche, die sich so tiefgreifend von bekannten Subtypen unterscheiden, dass es in der Bevölkerung weder eine bestehende Immunität gegen den Erreger gibt noch prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen verfügbar sind (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH 2007).

Hinzu kommt, dass ein Zusammenhang mit der globalen Erwärmung diskutiert wird, da diese mit einer schnelleren und weiteren Verbreitung von Viren einhergehen könnte, welche durch Stechmücken übertragen werden (MEDLOCK & LEACH 2015; DANIEL et al. 2018). So wird ausgehend von der pazifischen Region seit 2012 eine beispiellose epidemische Welle mit Ausbrüchen des Dengue-, Chikungunya- sowie Zikavirus dokumentiert (CAO-LORMEAU & MUSSO 2014; ROTH et al. 2014). 2015/2016 verbreitete sich das Gelbfieber in Afrika überraschend schnell und führte zum größten Ausbruch seit 30 Jahren (ZHAO et al. 2018).

Bei den meisten der in jüngerer Zeit neu auftretenden humanen Infektionskrankheiten handelt es sich um Zoonosen (JONES et al. 2008). Diese Erreger werden von Tieren auf den Menschen übertragen. Zwar sind nur 15 % aller bekannten humanen Krankheitserreger virale Zoonosen, doch macht diese Gruppe zusammen mit vektorübertragenen Infektionen mehr als 65 % der seit 1980 dokumentierten Ausbruchsgeschehen aus (WOOLHOUSE & GAUNT 2007). Hierbei kann die Übertragung von zoonotischen Viren entweder von landwirtschaftlichen Nutztieren ausgehen, wie beispielsweise das pandemische Schweinegrippe-Influenza-A-Virus H1N1/2009 (A(H1N1)pdm09) (SMITH, GAVIN J. D. et al. 2009), oder auch von wildlebenden Tie-

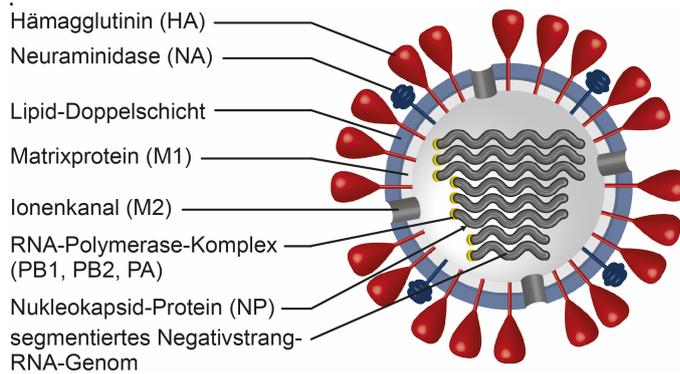
ren wie im Falle des Ausbruchs des Ebolavirus (EBOV) 2014 in Westafrika (REWAR & MIRDHA 2014). Wird ein Erreger außerdem von Mensch zu Mensch übertragen, kommt es aufgrund der weltweiten Reiseaktivitäten und des globalem Handels zu einer schnellen Ausbreitung (KREUDER JOHNSON et al. 2015; STÄRK & MORGAN 2015). Diese jüngsten Ausbrüche haben aufgezeigt, wie entscheidend es ist, Strategien für eine zügige Produktion von Impfstoffen sowie antivirale Therapien zu entwickeln, um für zukünftige Epidemien gewappnet zu sein.

In den nächsten Kapiteln werden Ausbrüche neuer viraler Infektionen und die damit verbundenen Herausforderungen für die Entwicklung von Notfalltherapien beispielhaft anhand der in dieser Arbeit verwendeten Modellerreger A(H1N1)pdm09 und EBOV beschrieben.

### **2.1.1 Influenzaviren**

Influenzaviren verursachen saisonale Epidemien und sind für eine erhebliche Morbidität und Mortalität verantwortlich. Schätzungen der WHO zufolge verursachen diese jährlichen Epidemien weltweit etwa 3–5 Millionen schwere Erkrankungen und neuesten Studien zufolge bis zu 650.000 Todesfälle (IULIANO et al. 2017; WHO 2018). Schwere Krankheitsverläufe und Todesfälle werden überwiegend bei Personen mit einem weniger robusten Immunsystem beobachtet, wie älteren Menschen, Kindern und chronisch Kranken (ZHOU et al. 2012; IULIANO et al. 2017). Zusätzlich zu diesen saisonalen Epidemien kann das Auftreten neuer Influenza-Subtypen, gegen die in der Populationen keine Immunität vorhanden ist, globale Pandemien auslösen (TAUBENBERGER & MORENS 2010).

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*, die ein Ribonukleinsäure-Genom (RNA-Genom) aus einzelsträngigen Segmenten mit negativer Polarität haben. Die acht RNA-Segmente des Influenza-A-Virus kodieren die Strukturproteine – die Polymerase-Untereinheiten (PB1, PB2, PA, PB1-F2), das Nukleokapsidprotein (N), die beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein (M1, M2) – sowie zwei akzessorische Proteine (NS1 und NS2) (GIRARD et al. 2010) (Abbildung 1). Influenza-A-Viren werden anhand der Kombinationen ihrer verschiedenen HA- und NA-Oberflächenproteine in Subtypen eingeteilt. Bisher sind 18 verschiedene HA-Subtypen und 11 unterschiedliche NA-Subtypen bekannt (TONG et al. 2012; SCHRAUWEN & FOUCHIER 2014).

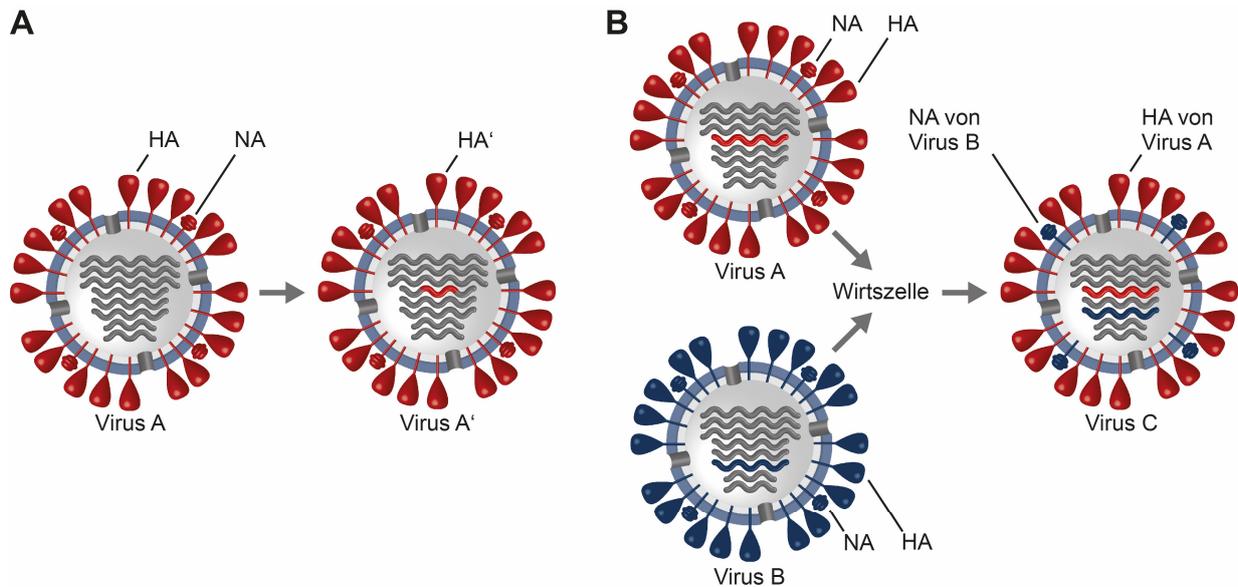


**Abbildung 1: Struktur eines Influenza-A-Virus.** Schematische Darstellung eines Influenza-A-Viruspartikels mit den beiden Oberflächenglykoproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie dem Ionenkanal (M2), eingebettet in die Virushülle aus einer Lipid-Doppelschicht und dem Matrixprotein (M1), welche die acht Segmente des negativ-strängigen RNA-Genoms mit dem Nukleokapsid-Protein (NP) und dem Polymerasekomplex (PB1, PB2 und PA) umschließt

Die in der Lipidhülle verankerten HA- und NA-Proteine sind beide von essenzieller Bedeutung für den viralen Lebenszyklus (MATSUOKA et al. 2013). Die endozytotische Aufnahme des Virus in die Zellen wird hierbei maßgeblich durch die Bindung des HA-Proteins an Sialinsäure-Rezeptoren vermittelt, während das NA-Protein die Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel durch die Abspaltung vom Rezeptor katalysiert (SU et al. 2009; SHAO et al. 2017). Während das aktive NA-Protein sich aus vier identischen NA-Monomeren zusammensetzt (AIR 2012), ist für die Synthese des aktiven HA-Proteins eine proteolytische Spaltung des HA-Vorläuferproteins HA<sub>0</sub> in seine beiden Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> notwendig. Diese mit Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> bilden dann eines von drei identischen Monomeren, aus denen das aktive HA-Protein aufgebaut ist (LAZAROWITZ et al. 1973; KLENK et al. 1975).

Aufgrund der fehlenden Korrektur- und Reparaturfunktionen der viruseigenen RNA-Polymerase entstehen bei der Virusreplikation kontinuierlich zufällige, minimale Veränderungen im Genom des Influenza-A-Virus. Betreffen diese Punktmutationen die Oberflächenproteine HA oder NA, so sprechen wir von einem Antigendrift (SANDBULTE et al. 2011) (Abbildung 2 A). Die hohe Variabilität dieser Proteine hat einen Selektionsvorteil zur Folge, da die veränderte Antigenstruktur von der bestehenden Immunantwort nur noch schlecht oder gar nicht mehr erkannt wird und damit keine oder nur noch eine stark eingeschränkte Immunität gegeben ist (LAMBERT & FAUCI 2010). Aus diesem Grund muss der saisonale Grippeimpfstoff jährlich angepasst werden (WHO 2007).

Bei einer Koinfektion mit unterschiedlichen Influenza-Subtypen kann es zum sogenannten Reassortment kommen, einer Neuordnung einzelner oder mehrerer Gensegmente verschiedener Viren (LAMBERT & FAUCI 2010; SHAO et al. 2017). Geht hieraus ein Virus mit einer neuen Kombination der Oberflächenproteine HA und NA hervor, spricht man von einem Antigenshift (Abbildung 2 B). Treffen auf diese Weise neu hervorgegangene humanpathogene Influenzaviren auf eine immunologisch naive Population, kann diese neue Virusvariante globale Pandemien auslösen (LAMBERT & FAUCI 2010; TAUBENBERGER & MORENS 2010).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von Antigen-Drift und Antigen-Shift bei Influenzaviren.** (A) Die Akkumulation zufälliger, minimaler Änderungen in der Gensequenz der HA- und NA-Proteine führt zu leicht veränderten Virusstämmen. (B) Bei der Koinfektion mit unterschiedlichen Influenza-A-Viren kommt es beim Verpacken neuer Viruspartikel zum Austausch von RNA-Segmenten, wodurch ein neuer Subtyp entstehen kann.

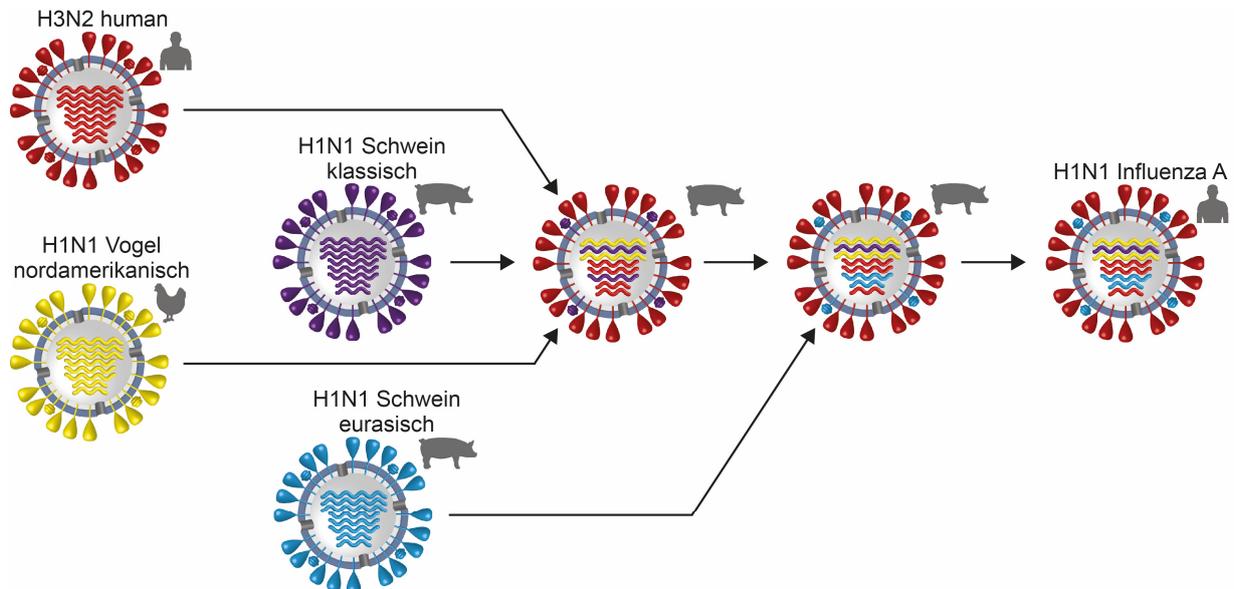
Reservoir-Wirte für Influenza-A-Viren sind wildlebende Wasser- und Seevögel, bei denen das Virus im Darmtrakt repliziert. Allerdings können Influenza-A-Viren ein breites Spektrum unterschiedlicher Säugerarten infizieren, darunter Meeressäuger, Hunde, Katzen, Pferde, Schweine, sowie auch Menschen (SHORT et al. 2015). Zwischen den unterschiedlichen Spezies besteht eine Wirtsbarriere, die eine Adaption der Viren an den neuen Wirt erforderlich macht (SCHRAUWEN & FOUCHIER 2014). Human adaptierte Influenza-A-Isolate haben diese Speziesbarriere überwunden, indem sie ihre Rezeptorpräferenz von  $\alpha(2,3)$ -verknüpften Sialinsäureresten, die von aviären Viren genutzt werden, zu  $\alpha(2,6)$ -verknüpften Sialinsäureresten ändern, welche beim Menschen im Epithel des oberen respiratorischen Trakts vorkommen (SHINYA et al. 2006; JOSEPH et al. 2015). Im respiratorischen Trakt von Schweinen sind sowohl  $\alpha(2,6)$ - als auch  $\alpha(2,3)$ -verknüpfte Sialinsäure-Rezeptoren zu finden, wodurch sie von Viren mit beiden Rezeptorspezifitäten infiziert werden können und als Zwischenwirt in der Adaptierung zum Menschen angesehen werden (GARTEN et al. 2009; TREBBIEN et al. 2011; CRISCI et al. 2013).

Die Kombination aus Wirten, welche beiden Rezeptorpräferenzen bedienen können, und der Möglichkeit, dass aus einem Reassortment bei Koinfektion mit unterschiedlichen Subtypen ein neues Virus hervorgeht, erhöht das Risiko neu auftretender Influenzaviren in der menschlichen Bevölkerung zusätzlich (TAUBENBERGER & KASH 2010; SCHRAUWEN & FOUCHIER 2014).

### 2.1.2 Die H1N1-Influenza-A-Pandemie 2009

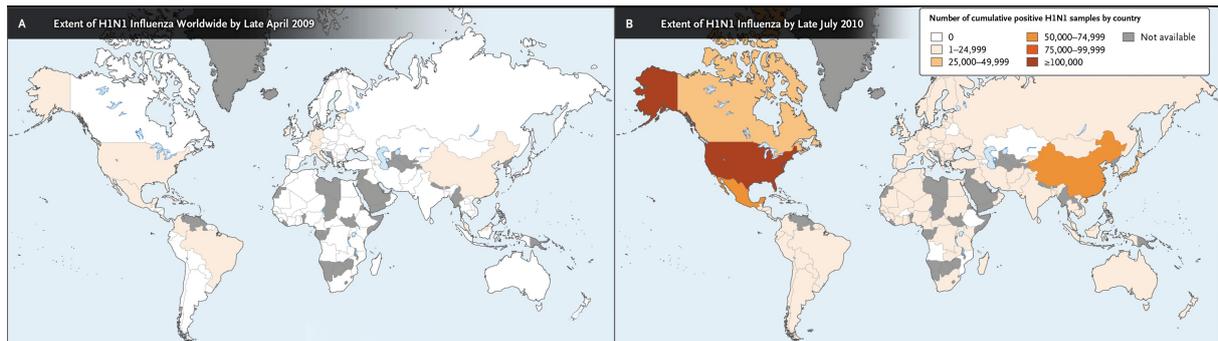
Im April 2009 wurde eine neue Variante des Schweinegrippevirus aus Patienten in Nordamerika und Mexico isoliert (DAWOOD et al. 2009; FRASER et al. 2009). Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass keine Verwandtschaft mit den bislang zirkulierenden H1N1-Viren bestand.

Vielmehr war das pandemische Virus A(H1N1)pdm09 das Resultat eines Multi-Reassortments von vier Influenza-A-Viren aus drei Quellen: Schwein, Mensch und Vogel, wobei die Hauptantigene, das HA- und das NA-Protein, eine Verwandtschaft zum klassischen Schweinegrippevirus aufzeigten (NEUMANN et al. 2009; SMITH, GAVIN J. D. et al. 2009) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Reassortment am Beispiel des pandemischen Influenzavirus A(H1N1)pdm09.** (A) Entstehung des pandemischen H1N1-Schweinegrippevirus 2009. In den 1990er Jahren kam es zu einem Triple-Reassortment zwischen dem humanen Influenzavirus H3N2, dem nordamerikanischen Vogelgrippevirus H1N1 und dem klassischen Schweinegrippevirus H1N1, welches seitdem in der nordamerikanischen Schweinepopulation zirkuliert. Ein weiteres Reassortment mit dem eurasischen Schweinegrippevirus H1N1 führte zu einer Vierfach-Reassortment-Variante, welche auf den Menschen übertragbar war und seither in der menschlichen Bevölkerung zirkuliert.

Das Virus A(H1N1)pdm09 verursachte eine plötzliche Häufung von Atemwegserkrankungen und verbreitete sich – von den USA und Mexiko ausgehend – schnell über die ganze Welt (HAQ et al. 2016) (Abbildung 4). Nach Beginn der Pandemie im April 2009 erreichte die Anzahl der Patienten im Oktober 2009 ihren Höhepunkt. Aus Sorge vor einer bevorstehenden schweren Krankheitswelle wurde anfangs von der WHO ein internationaler Gesundheitsnotstand des höchsten Grades VI erklärt (LÖWER 2010; HAQ et al. 2016). Im Laufe der Zeit zeigte sich jedoch, dass die klinischen Verläufe wesentlich milder waren als befürchtet und nur gelegentlich Fälle schwerer Erkrankungen auftraten (DAWOOD et al. 2009; SEITZ & KRAUSE 2010).



**Abbildung 4: Globale Verbreitung des pandemischen Influenzavirus A(H1N1)pdm09.** Verbreitung von bestätigten Fällen humaner Infektionen mit dem pandemischen Influenzavirus A(H1N1)pdm09 (A) Ende April 2009 und (B) Ende Juli 2010. (A und B) Länderfarbe entsprechend der Anzahl bestätigter Fälle. Weiß: keine bestätigten Fälle, hellorange: bis 24.999 Fälle, hellorange: 25.000–49.999 Fälle, orange: 50.000–74.999 Fälle, dunkelorange: 75.000–99.999 Fälle, rot: mehr als 100.000 Fälle und grau: keine Daten verfügbar. Vervielfältigung mit Genehmigung von The New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society (FINEBERG 2014).

Auch wenn die anfangs befürchteten Folgen ausblieben, so können retrospektiv wesentliche Lehren zur Herstellungsdauer von Impfstoffen gegen das Influenzavirus A(H1N1)pdm09 gezogen werden, um auf zukünftige Pandemiefälle bestmöglich vorbereitet zu sein (SEITZ & KRAUSE 2010).

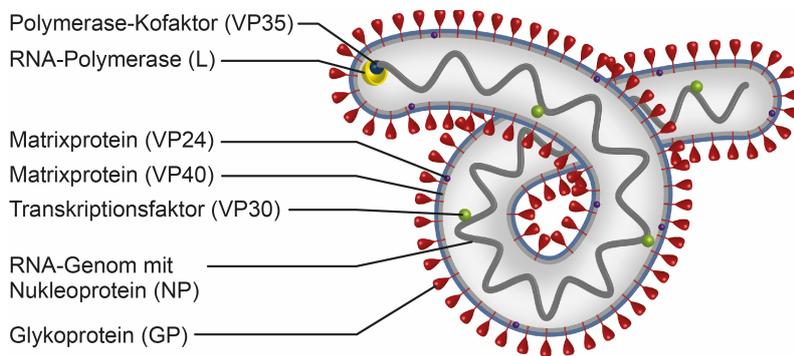
### 2.1.3 Ebolaviren

Die ersten durch das Ebolavirus verursachten Krankheits- und Todesfälle wurden 1976 in zwei benachbarten Regionen registriert: zuerst im Süd-Sudan und anschließend im Norden Zaires, der heutigen Demokratische Republik Kongo (FELDMANN & GEISBERT 2011). Seither gab es immer wieder regional begrenzte Ausbrüche in Zentral- und Westafrika mit Fallzahlen im ein- bis dreistelligen Bereich (KHAN et al. 1999). Der klassische Krankheitsverlauf geht einher mit Schwäche, Schwindel, Durchfall und hämorrhagischem Fieber – was das Ebolavirus ursprünglich zum Namensgeber für Erreger des Letztgenannten machte (FELDMANN & GEISBERT 2011). Die Sterblichkeitsraten variierten innerhalb der früheren Ausbrüche zwischen 25 und 90 % je nach Virusstamm (WHO 1978a; WHO 1978b).

Als natürliche Reservoirs der Ebolaviren werden sowohl wildlebende Nagetiere als auch Flughunde diskutiert (FELDMANN & GEISBERT 2011). Menschen werden durch engen Kontakt mit infizierten Tieren oder durch direkten Kontakt mit Blut oder Körperflüssigkeiten von Patienten und am Virus Verstorbenen infiziert (EMANUEL et al. 2018).

Ebolaviren gehören zu der Familie der *Filoviridae*. Sie haben ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität, welches für die sieben Strukturproteine des Nukleokapsidkomplexes (NP, VP35, VP30, L), der Matrixproteine (VP24, VP40) und das Oberflächenglykoprotein (GP) kodiert (MÜHLBERGER 2007; ROUGERON et al. 2015) (Abbildung 5). Durch posttranslationale Modifikation entstehen zusätzlich noch zwei lösliche Varianten des Glykoproteins (sGP, ssGP), die nicht in die Viruspartikel inkorporiert werden (LEE & SAPHIRE 2009). Das Ebolavirus mit seiner charakteristisch filamentösen Form ist von einer Lipidhülle umgeben. Das GP ist in dieser

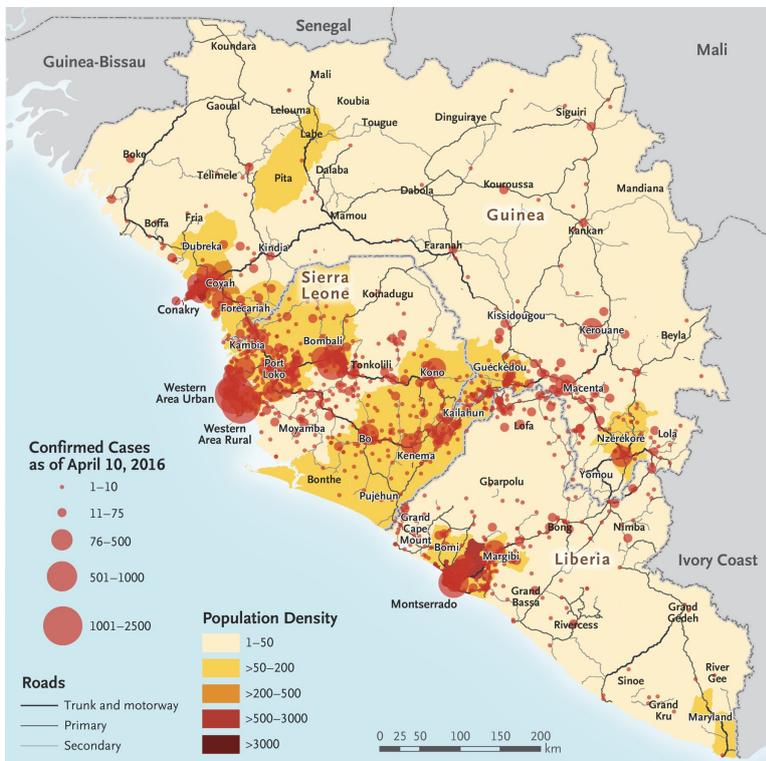
Virushülle verankert und durch Bindung an die Phosphoinositide-3 Kinase der Zielzelle löst es die rezeptor-vermittelte Endozytose des Virus aus (SAEED et al. 2008).



**Abbildung 5: Struktur eines Ebolavirus.** Schematische Darstellung eines Ebolaviruspartikels. Das virale Oberflächenglykoprotein (GP) ist eingebettet in die Virushülle aus einer Lipid-Doppelschicht und den Matrixproteinen (VP24 und VP40). Im Innern des Viruspartikels befindet sich das Nukleokapsid bestehend aus dem negativ-strängigen RNA-Genom, dem Nukleoprotein (NP), der RNA-Polymerase (L), dem Polymerase-kofaktor (VP35) und dem Transkriptionsfaktor (VP30).

### 2.1.4 Die Zaire-Ebolavirus-Epidemie 2014

Der Ausbruch 2014 in Westafrika verursacht durch den Zaire-Ebolavirus-Stamm (ZEBOV-Stamm) Makona führte zu 28.616 bestätigten Erkrankungen mit 11.310 Todesfällen und war damit der bisher größte registrierte Ausbruch (AGUA-AGUM et al. 2016; UYEKI et al. 2016) (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Verbreitung der Ebola-Epidemie 2014 in Westafrika.** Darstellung bestätigter Fälle einer Infektionen mit dem ZEBOV-Isolat Makona bis 10. April 2016, sowie der regionalen Populationsdichte und des Hauptstraßennetzes in Westafrika. Die Fallzahlen sind durch rote Kreise aufsteigender Größe dargestellt und wie folgt gruppiert: 1-10 Fälle, 11-75 Fälle, 76-500 Fälle, 501-1.000 Fälle und 1.001-25.000 Fälle. Die Regionen sind entsprechend ihrer Populationsdichte gefärbt, wobei hellgelb: 1-50 Menschen, gelb: >50-200 Menschen, orange: >200-500 Menschen, rot: >500-3.000 Menschen und dunkelrot: >3.000 Menschen entspricht. Vervielfältigung mit Genehmigung von The New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society (AGUA-AGUM et al., 2016).

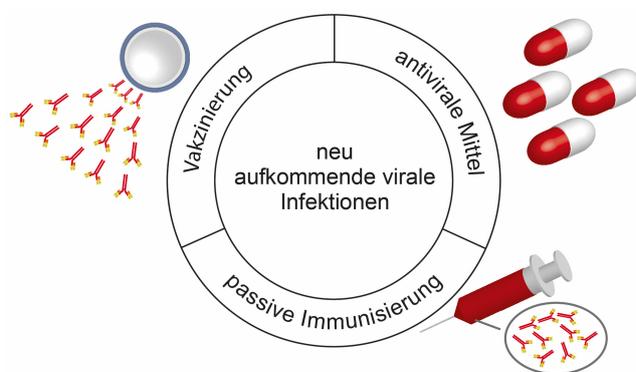
Interessanterweise war auch das Krankheitsbild dieses Ausbruchs anders, da nur 50 Prozent der Patienten das klassische hämorrhagische Fieber entwickelten, welches mit einem letalen Ausgang der Infektion korrelierte (SCHIEFFELIN et al. 2014). Die Patienten erhielten symptomati-

sche und unterstützende Behandlung, welche die Flüssigkeitszufuhr, die Gabe von Schmerz- und fiebersenkenden Mitteln und die Behandlung von Organversagen umfasst. Da keine zugelassenen Therapien oder Impfstoffe zur Verfügung standen waren dies und die Isolation von Patienten die primären Ansätze, um den Ausbruch zu kontrollieren (WHO 2014).

Angesichts der Schwere der Epidemie und nicht zuletzt aufgrund der Gefahr einer globalen Verbreitung von ZEBOV wurde die Entwicklung von Therapieansätzen forciert und auf experimentelle Therapiemaßnahmen zurückgegriffen (LYON et al. 2014; WHO 2014; DÖRNEMANN et al. 2017; GEISBERT 2017). Dabei hat die Ebola-Epidemie 2014 einmal mehr offengelegt, dass gegenwärtig auf einen Erreger anpassbare Notfallkonzepte zur schnellen Entwicklung und Produktion von Impfstoffen und Therapeutika fehlen.

## 2.2 Antivirale Strategien im Angesicht akuter viraler Infektionen

Eine prophylaktisch induzierte Immunität durch Impfung stellt die weitaus effektivste Methode zur Vorbeugung viraler Infektionen dar. Diese Immunität kann zur Prävention durch passive Übertragung und für einige Erreger auch kurz nach Exposition als Behandlungsoption eingesetzt werden (KELLER & STIEHM 2000; CASADEVALL et al. 2004). Außerdem steht für die Behandlung nach Exposition einiger Viren eine überschaubare Anzahl antiviraler Medikamente zur Verfügung (RAZONABLE 2011) (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Übersicht antiviraler Strategien.** Durch die aktive Immunisierung einer Impfung kann prophylaktisch eine schützende Immunität generiert werden. Der Transfer wirksamer Antikörper verleiht sofort eine zeitlich begrenzte Immunität und kann prophylaktisch und in manchen Fällen auch kurz nach der Virusexposition eingesetzt werden. Gegen manche Viren gibt es Medikamente als Therapieoption einer Infektion.

Da Viren als intrazelluläre Parasiten diverse Adaptionsstrategien entwickelt haben, ist es schwierig, Angriffspunkte für antivirale Medikamente zu finden, die gegen mehrere Virusfamilien wirken (LOU et al. 2014). Das Auftreten von Resistenzen birgt zudem die Gefahr, dass die aktuell in Verwendung befindlichen Medikamente ihre Wirksamkeit verlieren könnten (STRASFELD & CHOU 2010). Zwei Influzamedikamente werden aufgrund etablierter Resistenzen bereits global nicht mehr verwendet (HAYDEN & HAY 1992). Obwohl das zunehmend rationale Design antiviraler Medikamente eine bedeutende Verbesserung ihrer Zielgenauigkeit darstellt und bei der Vorhersage potentieller Nebenwirkungen hilfreich ist (ANDREI 2006; PAUWELS 2006; BRYAN-MARRUGO et al. 2015; MANDOUR et al. 2018), konzentriert sich die Entwicklung antiviraler

Medikamente dennoch hauptsächlich auf Erreger, deren genauer Lebenszyklus – inklusive der Einbeziehung von Wirtszellproteinen und deren Funktion bei der viralen Replikation – bekannt ist (LITTLER & OBERG 2005). Dieses Wissen kann für die Entwicklung von Notfallstrategien im Kampf gegen neu oder wieder auftretende virale Infektionen nicht vorausgesetzt werden. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit auf dem Potential von Antikörpern durch aktive oder passive Immunisierung.

### **2.2.1 Antikörper gegen virale Infektionen**

Um Pathogene wie Viren, aber auch Gifte, Allergene oder entartete körpereigene Zellen wie Tumorzellen zu erkennen und durch sie verursachte Schädigungen zu verhindern, verfügt der Körper über das Immunsystem, welches auf dem komplexen Zusammenspiel von lymphatischen Organen, humoralen Faktoren und Zytokinen basiert (PARKIN & COHEN 2001). Aufgrund ihrer Geschwindigkeit und Spezifität lässt sich die Immunreaktion in einerseits die schnell reagierende, angeborene, unspezifische und andererseits die erworbene, spezifische, aber langsamer reagierende Immunantwort unterteilen (PARKIN & COHEN 2001).

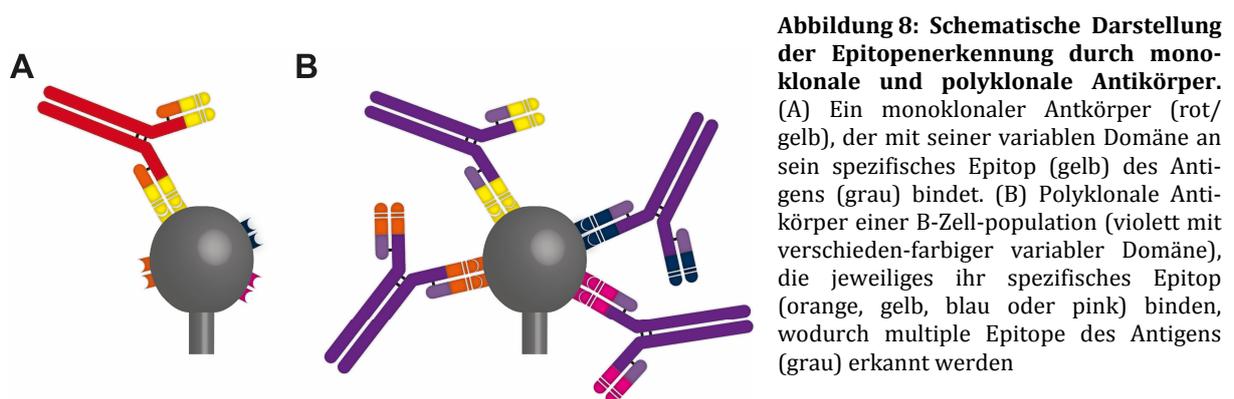
Um eine Virusinfektion effektiv kontrollieren zu können, bedarf es eines Zusammenspiels beider, der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Unmittelbar nach der Infektion, wenn das angeborene Immunsystem das Virus als fremdartig erkannt hat, werden Zytokine ausgeschüttet, die entweder selbst die virale Replikation hemmen können (SADLER & WILLIAMS 2008) oder durch Signalübertragung neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen dirigieren, damit diese den Erreger durch Phagozytose vernichten, während die adaptive Immunantwort induziert wird (BARRA et al. 2010).

Während das angeborene Immunsystem bei allen höher entwickelten Organismen vorhanden ist, verfügen Wirbeltiere zusätzlich über das adaptive Immunsystem, dessen Wirkprinzip in der Erkennung spezifischer Erregerstrukturen (den Antigenen) liegt (CLARK & KUPPER 2005). Dieses spezifische Immunsystem entwickelt sich ganz individuell entsprechend der Expositionsgeschichte eines Organismus. Die adaptiven Immunantworten werden vorrangig durch zwei Leukozytenarten vermittelt: Die T-Lymphozyten, die auf der Oberfläche der professionell antigenpräsentierenden Zellen gebunden Antigene erkennen, und die B-Lymphozyten, die für die Erkennung freier Antigene und die Bildung spezifischer Antikörper verantwortlich sind (PARKIN & COHEN 2001). Hierbei sind die sogenannten zytotoxischen T-Zellen, welche vor allem durch Viren infizierte Zellen und Tumorzellen erkennen und deren programmierten Zelltod auslösen können, für die zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems verantwortlich (ROCHA & TANCHOT 2004). Im Kampf gegen Viren ist insbesondere die sogenannte humorale Immunität von zentraler Bedeutung (DÖRNER & RADBRUCH 2007), welche das Sekretieren von Antikörpern beschreibt.

Nach der Infektion bleiben B- und T-Gedächtniszellen zurück, die eine längere und in manchen Fällen lebenslange Immunität gegen die Antigene aufrechterhalten können (AHMED & GRAY 1996). Bei erneuter Exposition werden diese Gedächtniszellen aktiviert, so dass die sekundäre Immunantwort signifikant schneller und intensiver als beim ersten Kontakt ist und so eine erneute Infektion effektiv kontrolliert (LEFEVRE et al. 2009). Dabei ist das humane Immunsystem durch ein Re-Arrangement von Gensegmenten, der sogenannten V(D)J-Rekombination, zur Bildung von  $10^{11}$  unterschiedlichen Antikörpern in der Lage (GREENSPAN 2017). Hinzu kommt die sogenannte somatische Hypermutation, die zufällige Mutationen in den Genen beschreibt, welche in einigen Fällen zu einer erhöhten Affinität der Antikörper führt. Schließlich werden die B-Zellen mit den effektivsten Antikörpern durch Selektion ausgewählt, was eine Affinitätsreifung der Antikörperpopulation zur Folge hat (WABL & STEINBERG 1996).

Drei Viertel aller im Blut zirkulierenden Antikörper – auch Immunglobuline (Ig) genannt – sind IgG-Antikörper (SCHROEDER & CAVACINI 2010). Sie haben eine Y-förmige Struktur und bestehen aus zwei identischen kurzen (*light chains*) und zwei identischen langen Aminosäureketten (*heavy chains*), welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. Am oberen Ende des IgG befinden sich die variablen Domänen, welche an das Antigen binden. Die konstante Stammregion des IgG, das Fc-Fragment, bindet an körpereigene Rezeptoren und ist zur Aktivierung des Komplementsystems essenziell (RASSOW et al. 2016).

Unterschieden werden monoklonale – einer B-Zelle entstammende – Antikörper, welche nur an ein einziges Epitope eines Antigens binden (Abbildung 8 A), und polyklonale – einer B-Zellpopulation entstammende – Antikörper, die multiple Epitope eines Antigens erkennen (NELSON et al. 2000; NEWCOMBE & NEWCOMBE 2007) (Abbildung 8 B).



Alleine Bindungsfähigkeit an ein Antigen bringt noch nicht zwingend eine Funktionalität mit sich. Daher wird unterschieden zwischen der Gesamtmenge der bindenden Antikörper (totale Antikörper) und der Menge der Antikörper mit einer neutralisierenden, die Funktionalität des Antigens beeinflussenden Wirkung (funktionale oder neutralisierende Antikörper) (PLOTKIN

2008). Die Herausforderung im Kampf gegen virale Infektionen liegt in der schnellen Induktion einer schützenden Immunität, die lange anhält und zu deren Induktion nach Möglichkeit keine Immunisierung mit dem lebenden Erreger selbst notwendig ist.

### 2.3 Aktive Immunisierung

Eine Impfung dient dem vorbeugenden Schutz gegen einen Krankheitserreger und beruht auf einer aktiven Immunisierung zur spezifischen Induktion des körpereigenen Immunsystems. Da der Schutz vor viralen Infektionen meist mit dem Vorhandensein antigenspezifischer, insbesondere neutralisierender Antikörper korreliert, wird die Wirksamkeit von antiviralen Impfstoffen nicht nur, aber hauptsächlich anhand der Induktion einer humoralen Immunantwort beurteilt (ZINKERNAGEL et al. 2001; BURTON 2002). Nach erstmaliger Exposition mit dem Erreger dauert es etwa zwei Wochen, bis ein ausreichendes Schutzniveau der Antikörperproduktion erreicht ist (SALLUSTO et al. 2010; CLEM 2011). Der Langzeitschutz erfordert die nachhaltige Induktion des Immungedächtnisses, damit der Körper nach erneuter Exposition mit dem Erreger zur schnellen und effektiven Reaktivierung der Immunreaktion fähig ist (SIEGRIST 2013).

Die gezielte Immunisierung mit einem Erreger, um einen Schutz zu induzieren, beruht im Wesentlichen auf Jenners Beobachtung, dass Melkerinnen, die sich mit einem Kuhpockenvirus infiziert hatte, gewöhnlich nicht an dem humanen Pockenvirus erkrankten. 1796 unternahm Jenner den ersten Versuch einer Immunisierung eines Menschen mit einem Kuhpockenvirus und stellte fest, dass die Kuhpocken bei Menschen abgeschwächte Symptome hervorriefen und vor einer Infektion mit dem humanen Pockenvirus schützten (JENNER 1799; BAXBY 1999).

Das serielle Kultivieren eines Virus in einer fremden Spezies *in vivo* oder in einer Zellkultur *in vitro* hat sich als Technik zur empirischen Attenuierung bewährt. Erfolgreiche Beispiele hierfür sind die Lebendimpfstoffe, welche durch eine einzige Immunisierung eine oft Jahrzehnte andauernde Immunität hervorrufen, wie beispielsweise solche gegen Gelbfieber (THEILER & SMITH 1937), Japanische Encephalitis (TRENT et al. 2013), Masern (KATZ et al. 1960), Mumps (HILLEMANN et al. 1968) und Röteln (PLOTKIN et al. 1969). Im Wesentlichen führt das Passagieren in der Zellkultur zu einer Anpassung an das Wachstum in dem entsprechenden Zelltyp der Spezies. Aber auch die Anpassung der Viren an das Wachstum bei Temperaturen unter 37 °C – der Normaltemperatur des Menschen – senkt die Virulenz (PLOTKIN 2014). Allerdings besteht bei Lebendimpfstoffen stets das Risiko einer Revision zur virulenten Form, wie es schon beim Poliovirus oder auch im Falle des Gelbfieberimpfstoffes zu beobachten war (HENDERSON et al. 1964; LINDSEY et al. 2008). Für immunsupprimierte Menschen besteht zudem eine erhöhte Gefahr, dass ein attenuierter Lebendimpfstoff eine Erkrankung verursacht, so dass bei dieser Personengruppe in vielen Fällen von einer solchen Impfung abgeraten wird (ARVAS 2014).

Diese Gefahr ist bei Inaktivimpfstoffen ausgeschlossen (THE AMERICAN LUNG ASSOCIATION ASTHMA CLINICAL RESEARCH CENTERS 2001; HAKIM et al. 2016). Allerdings besteht das Risiko, dass beim Inaktivierungsprozess wichtige Epitope verändert werden und eine Immunisierung zur Induktion nicht funktionaler Antikörper führt (MURPHY & WALSH 1988). Im Falle der meisten inaktivierten Grippeimpfstoffe werden die Viren mithilfe von Detergenzien aufgebrochen, die viralen Proteine gereinigt und das HA-Protein als Impfstoff-Antigen genutzt (DORMITZER et al. 2012). Im Gegensatz zu den Lebendimpfstoffen, die eine lang anhaltende Immunität hervorrufen können (HAMMARLUND et al. 2003; AHMED & AKONDY 2011), ist die Wirkung von inaktivierten Impfstoffen meist von kürzerer Dauer und eine Auffrischungsimpfung ist notwendig, um eine schützende Immunität aufrechtzuerhalten (PULENDRAN & AHMED 2011). Zusammenfassend war die klassische Impfstoffentwicklung geprägt von der Abwägung zwischen Immunogenität und Sicherheit.

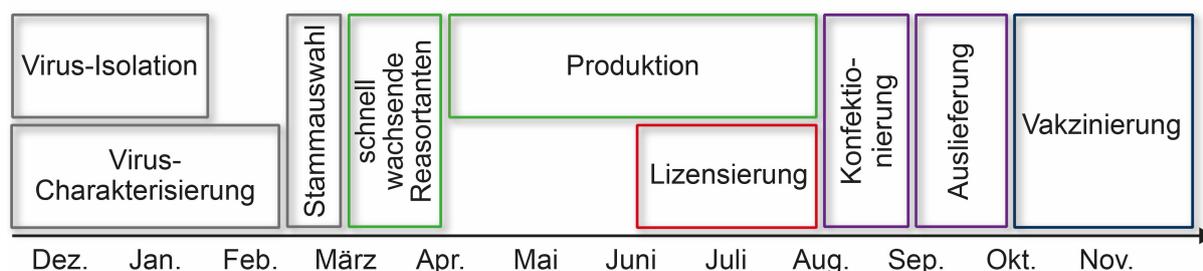
Während Impfstoffe außerordentlich wirksam gegen stabile Viren sind, stellen einige sehr variable Viren, zu denen auch die Influenzaviren zählen, eine besondere Herausforderung für die Impfstoffentwicklung dar (BAROUCH 2008; DORMITZER et al. 2012).

### **2.3.1 Der saisonale Influenza-Impfstoff**

Auch wenn die heutigen saisonalen Influenzaimpfstoffe keine sterile Immunität vermitteln, so reduzieren sie doch in Abhängigkeit von der Übereinstimmung mit den zirkulierenden Viren die virale Replikation und damit die Ausbreitung der Infektion (SOEMA et al. 2015). Vor allem Schwangere, Kinder zwischen sechs Monaten und fünf Jahren, ältere Menschen über 65 Jahre, Personen mit chronischen Erkrankungen sowie immunsupprimierte Personen haben ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf, während Beschäftigte im Gesundheitswesen aufgrund einer erhöhten Exposition generell unter einem höheren Risiko der Ansteckung stehen (THOMPSON et al. 2004; LAMBERT & FAUCI 2010).

Die HA- und NA-Oberflächenproteine des Influenzavirus sind die Hauptantigene. Während funktionale Antikörper gegen das HA die Infektion einer Wirtszelle völlig verhindern können und damit in der Lage sind, das Virus zu neutralisieren, können NA-spezifische Antikörper die Ausbreitung neu gebildeter Viruspartikel am Ablösen von der Wirtszelle hindern und haben so einen erheblichen Einfluss auf die virale Ausbreitung (COUCH 2003; SOEMA et al. 2015). Aufgrund der höheren Konservierung des NA-Proteins gelten die gegen NA gerichteten Antikörper als aussichtsreiche Kandidaten für einen Universalimpfstoff (DOYLE et al. 2013; EICHELBERGER & WAN 2015). Aber auch das M2-Protein (FILETTE et al. 2006; FIERS et al. 2009) oder weniger variable HA-Epitope kommen als potentielle Antigene in Frage (LINGWOOD et al. 2012). Nichtsdestotrotz werden saisonale Influenzaimpfstoffe bis heute ausschließlich auf 15 µg HA-Protein standardisiert (SOEMA et al. 2015).

Das globale Influenza-Überwachungs- und Reaktionssystem (GISRS) der WHO beobachtet kontinuierlich die beim Menschen zirkulierenden Influzaviren und aktualisiert die Zusammensetzung der Influenza-Impfstoffe zweimal jährlich. Die Zeit von der Auswahl der Influenza-Stämme bis hin zur Verfügbarkeit der Impfstoffe beträgt etwa sechs Monate (LAMBERT & FAUCI 2010; WHO 2018) (Abbildung 9), so dass der Impfstoff zu Beginn der Grippesaison zur Verfügung steht.



**Abbildung 9: Zeitverlauf der saisonalen Influenza-Impfstoffentwicklung.** Beispielhafter Zeitverlauf von der Isolation und Charakterisierung zirkulierender Viren bis zur Stammauswahl (grau), über die Produktion (grün), Lizenzierung (rot) bis zur Fertigstellung und Auslieferung (violett) des Influenzaimpfstoffes für die Vakzinierung (blau) in der nördlichen Hemisphäre.

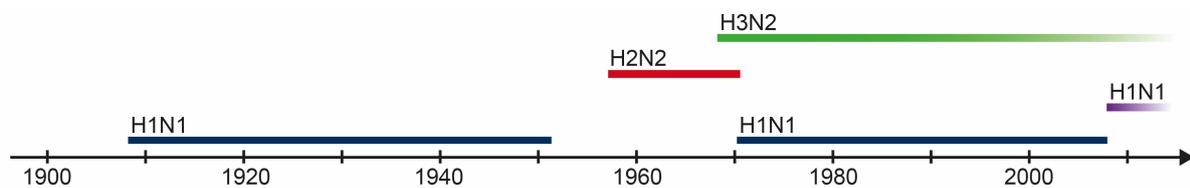
Aktuell werden Influenzaimpfstoffe vorwiegend in bebrüteten Hühnereiern produziert. Virusisolate, wie sie zu Beginn der Produktion zur Verfügung stehen, lassen sich meist schlecht in Hühnerembryonen kultivieren. Daher werden zunächst Reassortanten zwischen dem Isolat und einem Virusstamm hergestellt, der sich gut auf Eiern vermehren lässt (LAMBERT & FAUCI 2010; LÖWER 2010). Bei den im Ei vermehrten Viren wurden bereits in den 1980er Jahren Veränderungen in der Aminosäuresequenz des HA-Proteins festgestellt (ROBERTSON et al. 1987; ROBERTSON et al. 1993; GAMBARYAN et al. 1999; WIDJAJA et al. 2006), welche zu einer veränderten Rezeptorspezifität führen (STEVENS et al. 2010) und die Effizienz des Impfstoffes herabsetzen können (SKOWRONSKI et al. 2014; RAYMOND et al. 2016). Um das Risiko einer solchen Antigenveränderung zu verringern und aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Hühnereiern zur Herstellung biologischer Arzneimittel sowie der eingeschränkten Anwendbarkeit der Ei-basierten Impfstoffe bei Personen mit einer Allergie gegen Hühnereiweiß, wurde in den vergangenen Jahren zunehmend die zellkulturbasierte Produktion optimiert (HARDING et al. 2017) und inzwischen sind erste in Zellkultur produzierte Impfstoffe zugelassen (FREY et al. 2010; PANDEY et al. 2010).

### 2.3.2 Der pandemische Influenzaimpfstoff A(H1N1)pdm09

Neben saisonalen Epidemien leicht veränderter Influzaviren kommt es auch zu Pandemien, wenn aufgrund eines Austauschs der HA- oder NA-Oberflächenproteine nach dem Reassortment verschiedener Influzaviren ein neues Virus entsteht, das die Fähigkeit besitzt, Menschen zu infizieren und übertragbar ist. Diese pandemischen Viren besitzen Antigene, welche in der Be-

völkerung zuvor noch nicht zirkulierten, so dass keine oder nur eine marginale Immunität gegen die Antigene vorhanden ist (LAMBERT & FAUCI 2010; TAUBENBERGER & KASH 2010).

Von 1918 bis 1920 kostete die Spanische Grippe, ausgelöst durch eine Influenza-Variante A/H1N1, 40–50 Millionen Menschen das Leben. Die Asiatische Grippe (Influenza A/H2N2, 1957–1958) und die Hong-Kong-Grippe (Influenza A/H3N2, 1968–1970) bedeuteten jeweils für bis zu zwei Millionen Menschen den Tod (Abbildung 10). Im Jahre 2009 wurde das humane Influenzavirus A/H1N1 durch das Schweinegrippevirus Influenza A(H1N1)pdm09 abgelöst, welches im Zuge der Pandemie bis zu 575.000 Menschen tötete (TAUBENBERGER & MORENS 2010) (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung von in der Bevölkerung zirkulierenden Influenza-A-Viren.** Seit Beginn des 20. Jahrhunderts pandemisch gewordene Influenza-A-Viren, umfassen drei verschiedene HA-Proteine (H1, H2 und H3) und zwei verschiedene NA-Proteine (N1 und N2). Die Spanische Grippe wurde 1918 von einem H1N1-Virus (blau) ausgelöst. 1957 zirkulierte erstmalig eine H2N2-Variante (rot) und löste die Asiatische Grippe aus, bevor 1986 der Subtyp H3N2 (grün) für die Hongkong-Grippe verantwortlich war. 1977 zirkulierte erneut die H1N1-Variante (blau) von 1950, welche 2009 von einer neuen H1N1-Variante (violett) abgelöst wurde. Grafische Darstellung basiert auf (PALESE 2004).

Da die saisonalen Impfstoffe keinen Infektionsschutz gegen neuartige pandemische Viren bieten, müssen zur Bekämpfung einer Influenzapandemie spezifisch an den neuen Subtyp angepasste, pandemische Impfstoffe hergestellt werden (LÖWER 2010). Das bedeutet aber, dass die Produktion eines Pandemieimpfstoffs erst begonnen werden kann, wenn die Pandemie bereits ausgebrochen ist und das verantwortliche Virus isoliert werden konnte. Eine möglichst kurze Produktionszeit ist daher essenziell (LÖWER 2010). Im Falle der Schweinegrippepandemie war der Herstellungsprozess für den saisonalen Impfstoff 2009–2010 bereits angelaufen und aufgrund der Unsicherheit über das zu erwartende Ausmaß des Ausbruchs wurde beschlossen, parallel mit der Produktion eines pandemischen Impfstoffs zu beginnen (COLLIN & DE RADIGUÈS 2009). Während der abgeschwächte Lebendimpfstoff hohe Titer bei der Vermehrung in Eiern erreichte (CHEN et al. 2010), war die Ausbeute an HA-Protein für die Produktion des inaktivierten Pandemieimpfstoffes wesentlich geringer als erwartet und stellte damit die Hersteller vor eine Herausforderung (LAMBERT & FAUCI 2010; FARNSWORTH et al. 2011; ROBERTSON et al. 2011). Zugleich muss ein Pandemieimpfstoff immunogen genug sein, um in einer naiven Population rasch zu einem Immunschutz zu führen, da eine Mehrfachverabreichung inklusive der Einhaltung strikter Intervalle im Zuge einer Pandemie nur schwer realisierbar ist (LÖWER 2010). Zugunsten einer Verringerung der Antigenmenge pro Impfdosis und damit einer Erhöhung der Anzahl an Impfdosen wurde der pandemische Impfstoff A(H1N1)pdm09 mit verschiedenen Ad-

juvanzien versetzt (JOHANSEN et al. 2009; SKOWRONSKI et al. 2011). Bereits 2006 und 2007 wurde der Einsatz von Adjuvanzien in Influenzaimpfstoffen für Personen über 65 Jahre grundsätzlich genehmigt (BANZHOFF et al. 2008; VILLA et al. 2013), so dass die Verwendung möglich war.

Adjuvanzien verstärken die Immunantwort gegen ein Antigen, indem sie seine Präsentation sowie die Rekrutierung von entzündlichen und immunkompetenten Zellen verstärken – insbesondere im Zusammenhang mit inaktivierten oder proteinbasierten Impfstoffen (LAMBERT & FAUCI 2010; GREGORIO et al. 2013; APOSTÓLICO et al. 2016). Aluminiumsalz, das am häufigsten in Impfstoffen verwendete Adjuvans, zeigte jedoch in Kombination mit dem pandemischen Impfstoff A(H1N1)pdm09 keine verbesserte Wirkung (MANZOLI et al. 2011). Squalenbasierte Öl-in-Wasser-Emulsionen hingegen erwiesen sich als geeignet (VOGEL et al. 2009). Sie rekrutieren Immunzellen zur Injektionsstelle und erhöhen die lokale Zytokin-Produktion, was wiederum zu einer erhöhten Anzahl aktiver Antigen-präsentierender Zellen führte (MOREL et al. 2011; GREGORIO et al. 2013). Der squalenbasierte Wirkverstärker AS03 wurde in Kanada und Europa erstmals in Kombination mit dem pandemischen Impfstoff A(H1N1)pdm09 im Jahre 2009 eingesetzt (GARÇON et al. 2012), während MF59 bereits seit 1997 für einen inaktivierten Drei-Komponenten-Impfstoff in Europa zugelassen war (O'HAGAN et al. 2013). Letztlich zeigte sich, dass die niedrigeren Antigendosen von 3,75 µg und 7,5 µg HA in Kombination mit entweder AS03 oder MF59 eine anhaltende Antikörperreaktion von mindestens sechs und bis zehn Monaten induzierten (FERGUSON et al. 2012; SONG et al. 2012). Darüber hinaus zeigten die adjuvantierten Impfstoffe eine hohe Immunogenität bei älteren Impfungen, bei denen die Impfung mit dem saisonalen Impfstoff ohne Wirkverstärker oft weniger effektiv ausfällt (SONG et al. 2013).

Die schnelle Produktion des pandemischen Impfstoffs A(H1N1)pdm09 im Angesicht der bereits begonnenen Pandemie war ohne Zweifel ein Erfolg. Allerdings erfordert die ständig notwendige Anpassung der saisonalen Influenzaimpfstoffe eine bestehende, adaptierbare Produktionspipeline sowie die notwendige Erfahrung in der zügigen Komponentenanpassung. Diese besonderen Voraussetzungen sind im Falle eines Ausbruchs neuartiger Viren leider nicht gegeben. Die Implementierung völlig neuer Impfstoffproduktionsabläufe inklusive des Zulassungsverfahrens würde vermutlich den zeitlichen Rahmen einer erfolgreichen Impfkampagne im Angesicht eines bereits begonnenen Ausbruchs sprengen.

## 2.4 Passive Immunisierung – temporärer Schutz und Therapie-Option

Die Grundlage zur medizinischen Verwendung von Immunsereen wurde im 19. Jahrhundert von Behring und Kitasato gelegt (BROWNING 1955), noch bevor die biochemische Natur von Antikörpern überhaupt bekannt war. Durch die Identifizierung und Isolation von *Corynebacterium diphtheriae*, dem Erreger der Diphtherie, wurde die Voraussetzung zur gezielten Immunisierung geschaffen und ein empirischer Prozess führte letztlich zu der entscheidenden

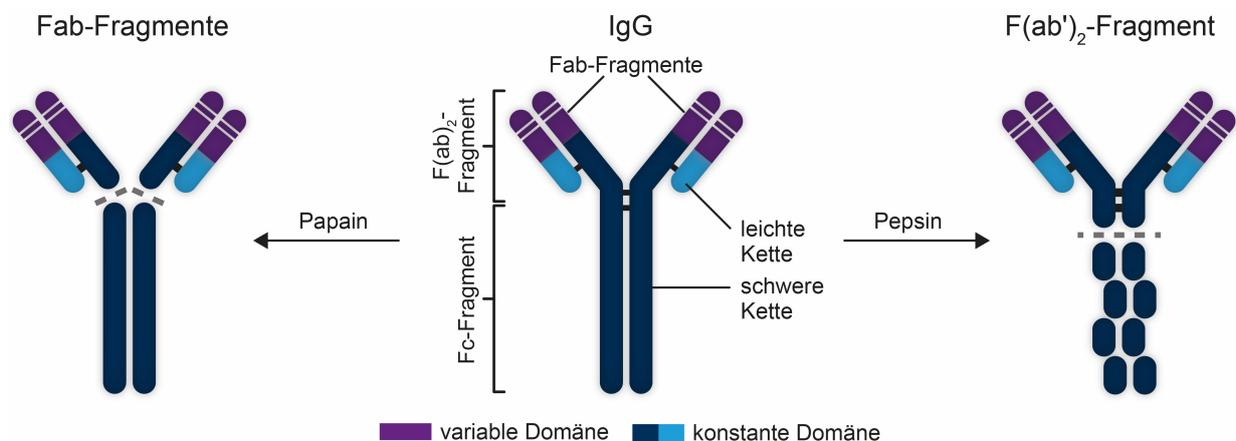
Entdeckung, dass durch Blut- und später Serumtransfusionen immunisierter Tiere auf naive Tiere diese vor der Erkrankung geschützt werden konnten (BEHRING & KITASATO 1890; SIMON 2007). Die Produktion von Hyperimmunseren und deren Verwendung zur Behandlung und Vorbeugung verschiedener viraler und bakterieller Erreger sorgte für einen Durchbruch im Kampf gegen Infektionskrankheiten (BROWNING 1955; GRAHAM & AMBROSINO 2015). Weil humanes Rekonvaleszenten-Serum von Patienten, die eine Infektion überstanden haben, seit jeher nur begrenzt zur Verfügung steht, wurden von Beginn an Tiere zur Produktion der Antiseren eingesetzt (BEHRING & KITASATO 1890). Gemeinsam mit Ehrlich gelang eine Verbesserung der bislang schwankenden Effizienz der Serumtherapie und die Etablierung der Produktion in Milchvieh (WINAU & WINAU 2002). Außerdem erarbeitete Ehrlich die ersten Methoden zur Standardisierung der Wertbestimmung von Seren (PAUL EHRlich 1897).

Im Zusammenhang mit der Gabe heterologen Serums traten bei 10–50 % der Patienten Nebenwirkungen auf (RACKEMANN 1943). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben Clemens von Pirquet und Bela Schick die Serumkrankheit erstmalig (SILVERSTEIN 2000) und in den darauf folgenden Jahren wurden ihre Beobachtungen mehrfach bestätigt, bevor 1953 die ersten Analysen zum Mechanismus publiziert wurden (GERMUTH 1953a; GERMUTH 1953b; DIXON et al. 1961). Die Bildung von Immunkomplexen präzipitierender Antikörper kann zu einer solchen Typ-III-Allergie führen, die in der Regel verzögert auftritt und mild verläuft. Das Komplementsystem führt dabei zur Phagozytose und dem Abbau der Immunkomplexe, wodurch die Serumkrankheit meist spontan innerhalb von wenigen Tagen wieder ausheilt (LEÓN et al. 2013; SILVA et al. 2016). Weitaus gefährlicher sind akute Reaktionen auf passive Immunisierung, welche auf eine Kombination von IgG-basierter Typ-I-Überempfindlichkeit, Komplementaktivierung und der Wirkung von Aggregaten der Immunglobuline oder deren Fragmente, einschließlich des Fc-Teils, zurückzuführen sind (SILVA et al. 2016). Mit wiederholter Gabe heterologen Serums derselben Donor-Spezies steigt auch das Risiko, einen anaphylaktischen Schock als unmittelbare allergische Reaktion auf die Proteine xenogenen Ursprungs zu induzieren (SILVA et al. 2016). Diese Problematik und nicht zuletzt auch die Entwicklung effektiver antimikrobieller Wirkstoffe führten dazu, dass der Einsatz von Immunseren im Laufe des 20. Jahrhunderts stark zurückgegangen (CASADEVALL 1996) und heute auf wenige Anwendungen beschränkt ist.

Das wachsende Verständnis der Funktionsweise unseres Immunsystems und der Wirkung von Antikörpern sowie die Entwicklung von Technologien zur spezifischen Identifikation (ADKINS et al. 2002), Isolation und Reinigung des IgG aus den verschiedenen Serumproteinen (STEINBUCH & AUDRAN 1969; GHOSH 2002; HUSE et al. 2002; GAGNON 2012) brachten bedeutende Fortschritte im Bereich der Therapie mit polyklonalen Seren (GRAHAM & AMBROSINO 2015). Heute ersetzen aus gepooltem Serum gewonnene und von anderen Serumproteinen gereinigte intravenöse Immunglobuline (IVIG) den ursprünglichen Transfer des rohen Serums. Das mindert speziell die Gefahr von hypersensitiven allergischen Reaktionen gegen die nicht not-

wendigen Serumproteine. Sollte es dennoch zu einem anaphylaktischen Schock kommen, stehen etablierte Therapien zur Verfügung (ALVAREZ-PEREA et al. 2017).

Speziell im Bereich der Notfallbehandlung wird die passive Immunisierung auch heute noch genutzt: IVIG humaner Herkunft wird routinemäßig zur Behandlung viraler Infektionen wie Tollwut, Tetanus oder bei schweren Maserninfektionen verwendet und im Falle von Hepatitis B zur Prävention eingesetzt (GUPTA et al. 1980; JHAVERI et al. 1980; KELLER & STIEHM 2000; CDC 2008; CDC 2010). Die humanen Antikörperpräparationen werden aufgrund ihrer geringeren Immunogenität den heterologen, im Tier produzierten, Antikörperpräparationen vorgezogen. Für die Nutzung als Antitoxin stehen jedoch keine humanen Seren zur Verfügung, so dass zur Toxinneutralisierung weiterhin Seren tierischen Ursprungs herangezogen werden (BOYER et al. 2013). Die Immunogenität dieser Produkte tierischen Ursprungs wird dem spezies-spezifischen Fc-Teil des Antikörpers zugeschrieben (COCHRANE & KOFFLER 1973). Durch proteolytische Spaltung kann die antigen-bindende Domäne in Form des F(ab')<sub>2</sub>- oder Fab-Fragmentes vom Fc-Teil abgespalten, isoliert und gereinigt werden (NELSON 2010) (Abbildung 11). Die Halbwertszeit dieser Antikörperfragmente ist zwar deutlich geringer als die des vollständigen IgG, allerdings trifft dies auch auf die Immunogenität zu (KUUS-REICHEL et al. 1994).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und der Antikörperfragmente Fab und F(ab')<sub>2</sub>.** Der IgG-Antikörper setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammen, die durch Disulfidbrücken (schwarz) miteinander verbunden sind. Die beiden Antigenbinderegionen des Antikörpers bestehen aus den vier variablen Domänen (in violett dargestellt), während die konstanten Regionen in blau dargestellt sind. Durch proteolytische Spaltung mit Papain lassen sich die beiden Antigenbinderegionen in Form zweier Fab-Fragmente aus jeweils einem Teil einer leichten und einem Teil einer schweren Kette von der Stammregion (dem Fc-Teil) des Antikörpers abspalten. Bei einer proteolytischen Spaltung mit Pepsin wird der Fc-Teil des Antikörpers verdaut, wodurch ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment entsteht, welches die beiden Antigenbinderegionen sowie einen Teil jeder Kette umfasst.

In den 1970er Jahren wurde zudem die Hybridoma-Technologie entwickelt. Diese ermöglichte fortan die Herstellung monoklonaler Antikörper (KÖHLER & MILSTEIN 1975; REICHERT et al. 2005). Meist stammten diese hochspezifischen Antikörper aus der Maus und bargen damit die gleichen Gefahren wie andere xenogene Proteine für den Einsatz im Menschen. Die Entwicklung rekombinanter Antikörper ermöglichte fortan eine Kombination der Immunglobulin-Gene zweier Spezies wodurch erst der xenogene konstante Fc-Teil des Antikörpers gegen den Fc-Teil

des Menschen ausgetauscht wurde (chimäre Antikörper) bis letztlich humanisierte Antikörper entstanden, die nur noch die variablen, antigenbindenden Domänen der xenogenen Spezies tragen (HARDING et al. 2010). Im Zuge ihrer Fortentwicklung eröffneten diese hochspezifischen Antikörper neue Therapiemöglichkeiten gegen Autoimmunerkrankungen (BAERT et al. 1999; SCHREIBER et al. 2007; INMAN et al. 2008; CHAN & CARTER 2010) und zunehmend auch gegen Krebs (ADAMS & WEINER 2005; SCOTT et al. 2012; SHUPTRINE et al. 2012).

Die passive Immunisierung hat sich im Kampf gegen zahlreiche akute Infektionen als nützlich erwiesen und angesichts des wissenschaftlichen Fortschrittes und der Entwicklung neuer Technologien im Bereich der Immunglobulinforschung erleben antikörperbasierte Therapien derzeit eine Renaissance (CASADEVALL et al. 2004). Eine Monotherapie mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern war beispielsweise im Nager-Modell für Infektionen mit dem Ebolavirus effektiv (PARREN et al. 2002). Zwar zeigte eine solche Monotherapie keinen Schutz in Primaten (OSWALD et al. 2007), aber der Erfolg des monoklonalen Antikörper-Cocktails ZMapp deckte das Potential auf, das die gezielte Blockade multipler Epitope, einschließlich einiger nicht-neutralisierender Epitope, mit sich bringt (DAVIDSON et al. 2015; MENDOZA et al. 2017). Die Entwicklungsdauer dieser hochspezifischen monoklonalen Antikörper ist allerdings vergleichbar mit der von Impfstoffen und somit in der Regel nicht kompatibel mit Ausbrüchen neuer Infektionskrankheiten.

#### **2.4.1 Antiseren gegen akute virale Infektionen: sofortige Immunität durch passiven Immuntransfer**

Der ZEBOV-Ausbruch in Westafrika hat das therapeutische Potenzial von antikörperbasierten Therapien erneut aufgezeigt. In der Vergangenheit war es nicht möglich, eindeutige Ergebnisse aus den experimentellen Therapien der passiven Immunisierung mit Vollblut oder Plasma von rekonvaleszenten Patienten abzuleiten. So überlebten sieben von acht Patienten eine Infektion, nachdem ihnen Vollblut von rekonvaleszenten Spendern während des Kikwit-Ausbruchs 1995 verabreicht wurde (MUPAPA et al. 1999). Im Versuch mit nicht-humanen Primaten konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden (JAHRLING et al. 2007). Die Behandlung von 84 Patienten mit Rekonvaleszenz-Plasma während des Ausbruchs in Westafrika 2014 zeigte keine signifikante Änderung der Überlebensrate (GRIENSVEN et al. 2016), jedoch ist die Interpretation dieser Daten schwierig, da weder die totalen Antikörpertiter noch die virusneutralisierende Aktivität im transferierten Plasma bestimmt wurde. Studien, bei denen Primaten nach Infektion mit hohen Titern gereinigten IgGs aus rekonvaleszenten Tieren behandelt wurden, zeigten einen vollständigen Schutz (DYE et al. 2012), was darauf hindeutet, dass die funktionalen Antikörpertiter der bestimmende Faktor bei der Entscheidung über die Effektivität des Antiserums sein könnten.

Die Entwicklungen der modernen Proteinbiochemie mit ihren Verfahren zu Trennung, spezifischen Isolation und Modifikation von Antikörpern hat auch die Nutzung therapeutischer Seren tierischen Ursprungs deutlich attraktiver gemacht. Gerade weil zu Beginn von Ausbrüchen Rekonvaleszentenserum noch nicht zur Verfügung steht, kann Hyperimmunserum tierischen Ursprungs eine probate Notfalltherapie darstellen. Die Herausforderung bei der Produktion eines effektiven Antiserums besteht einerseits in der Schnelligkeit und gleichzeitig in der Induktion hoher funktionaler Antikörpertiter. Vor allem bei hochpathogenen Viren wird eine Immunisierung von Donor-Tieren wie Schafen, Ziegen oder Pferden mit dem replikationsfähigen, lebenden Virus durch die notwendigen biologischen Sicherheitsmaßnahmen deutlich erschwert. Immunisierungsversuche von Pferden zur Produktion effektiven Antiserums Ende des 20. Jahrhunderts mit inaktiviertem Ebolavirus blieben ohne Erfolg (JÄHRLING et al. 1996), was darauf hindeutet, dass die Präsentation des nativen Antigens oder sogar die *De-novo*-Antigenpräsentation notwendig sind, um funktionale Antikörperantworten zu induzieren.

Im 20. Jahrhundert haben moderne molekularbiologische Methoden eine Revolution in der Antigenexpression ausgelöst. Gentechnische Methoden ermöglichen es, die Sicherheit proteinbasierter Impfstoffe mit der Immunogenität von Lebendimpfstoffen zu kombinieren. So werden wenig immunogene Antigene beispielsweise nicht als rekombinante Proteine alleine, sondern in Form von virusähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLPs) dem Immunsystem präsentiert. VLP-basierte Impfstoffe wurden bereits gegen das humane Papillomavirus (HPV) (WANG & RODEN 2013), das Hepatitis-B-Virus sowie gegen Malaria zugelassen (MOHSEN et al. 2017).

Eine temporäre intrazelluläre Expression des Antigens kann außer durch Impfstoffe auf Basis von Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) (KHAN 2013; HASSON et al. 2015) auch durch den Gentransfer viraler Vektoren erreicht werden, darunter beispielsweise das in humanen Zellen replikationsinkompetente modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA), das replikationskompetente Masernvirus oder das replikationskompetente Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) sowie replikationskompetente oder -inkompetente Adenoviren (ROBERT-GUROFF 2007; URA et al. 2014). Mehrere präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass virale Vektoren sowohl eine humorale wie auch eine zelluläre Immunreaktion induzieren können, und die Sicherheit dieser Plattformen unterstrichen, darunter Impfstoffkandidaten gegen ZEBOV (HUTTNER et al. 2015; TAPIA et al. 2016; GROBUSCH & GOORHUIS 2017) und gegen Folgeerkrankungen viraler Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (KAUFMAN et al. 2010).

Bereits heute sind mehrere virale Vektoren im Bereich der Veterinärimpfstoffe zugelassen (BROCHIER et al. 1989; POULET et al. 2007), was deren Nutzung zur Produktion von Antiseren attraktiv macht. Durch die Immunisierung von Pferden mit Ebola-VLPs konnte 2017 Hyperimmunserum hergestellt werden, das im Nager-Modell erfolgreich gegen eine Infektion schützte (ZHENG et al. 2016).

Immunglobuline haben ein vielversprechendes Potential für die Prophylaxe und Therapie neuartiger viraler Infektionen. Dieses noch nicht vollständig ausgeschöpfte Potential stellt eine Möglichkeit im Kampf gegen wiederkehrende und auch gegen neu auftretende akute Krankheitserreger dar. Neben der Effektivität des Serums sind eine schnelle Produktion und Reinigung klinisch relevanter Mengen ebenso essenziell wie die Anpassungsfähigkeit der Immunisierungsstrategie an neue oder hinsichtlich ihrer Antigene veränderte Viren.

## **2.5 Die Notwendigkeit von Plattform-Technologien zur Beurteilung von Antikörperantworten gegen ZEBOV**

Die Entwicklung von Impfstoffen und Therapeutika beinhaltet die Analysen von Proben aus vorklinischen und klinischen Studien. Wenn die Verwendung des eigentlichen Erregers hohe Sicherheitsmaßnahmen bedingt (KONDURU et al. 2018), ist die Entwicklung von Surrogattests notwendig, um eine Infrastruktur zur schnellen Herstellung und klinischen Bewertung von antiviralen Therapien zu gewährleisten (GRAHAM & SULLIVAN 2018). Die Ebola-Epidemie 2014 hat einmal mehr gezeigt, dass gegenwärtig auf einen Erreger anpassbare Notfallkonzepte zur schnellen Entwicklung und Produktion von Impfstoffen und Therapeutika fehlen und ein erheblicher Bedarf an analytischen Methoden besteht, die eine Wirksamkeitsanalyse unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen zulassen.

Für die Beurteilung der Wirksamkeit von Impfstoffen sowie von Therapeutika gegen ZEBOV ist die Bewertung der Antikörper gegen das ZEBOV-GP essenziell. Studien in verschiedenen Tiermodellen haben gezeigt, dass ausreichende humorale und zelluläre Immunantworten gegen das ZEBOV-GP notwendig sind, um vor einer Infektion mit ZEBOV zu schützen (SULLIVAN et al. 2000; BRADFUTE & BAVARI 2011; MARZI & FELDMANN 2014), und auch die erfolgreiche passive Immunisierung mit neutralisierenden monoklonalen (OLINGER et al. 2012; QIU et al. 2012) oder hochtitrigen polyklonalen Antikörperpräparaten (DYE et al. 2012) unterstreicht den Bedarf an Surrogattests, die eine Analyse der gegen das ZEBOV-GP gerichteten Antikörper unter niedrigen biologischen Sicherheitsanforderungen möglich machen. Der Goldstandard für die Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern gegen ZEBOV sind ein Plaquereduktionstest (PRNT) (SHURTLEFF et al. 2012) oder Virusneutralisationstest (VNT) (AGNANDJI et al. 2016) unter Verwendung des Wildtypvirus. Im Zuge der Ebola-Epidemie 2014 wurden verschiedene Plattforttechnologien wie pseudotypisierte lentivirale Vektoren (LUCZKOWIAK et al. 2016; SINN et al. 2017) oder VSVΔG/ZEBOV-GP sowie verschiedene Immunfärbemethoden (KRÄHLING et al. 2016) zur Untersuchung von totalen und neutralisierenden Antikörperantworten eingesetzt. Um die Auswertung zu erleichtern, wurden in einigen Fällen die Vektorviren mit einer Fluoreszenz- oder Luziferasemarkierung versehen (LEE et al. 2017; KONDURU et al. 2018). Diese Surrogattests können grundsätzlich an andere hochpathogene Erreger angepasst werden und haben somit das

Potential, zu einem wertvollen diagnostischen Tool gegen neu auftretende Erreger zu werden. So könnten sie für die Bestimmung von Antikörperantworten zur Beurteilung der Wirksamkeit von immunologischen Therapeutika wie Rekonvaleszenzplasma und anderen Antikörperpräparaten herangezogen werden oder im Zuge klinischer Studien für die Diagnostik und serologische Erhebung von Antikörpertitern Anwendung finden. Eine vergleichende Studie der WHO stellte allerdings eine hohe Variabilität der quantitativen Ergebnisse innerhalb der 22 verschiedenen Surrogattests und gegenüber dem Wildtypneutralisationstest fest, wohingegen die auf VSV basierenden Methoden eine gute Korrelation zeigten (WILKINSON et al. 2017).

## **2.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung von Immunisierungsstrategien zur Induktion hoher funktionaler Antikörperantworten als Notfalltherapie in Ausbruchsszenarien. Um Einblicke in verschiedene Aspekte dieses Prozesses zu bekommen, wurde zunächst die Nutzung von Adjuvantien als Zusätze für Impfstoffe am Beispiel des pandemische A(H1N1)pdm09-Impfstoffs untersucht. Anschließend wurde unter Einbeziehung der gewonnenen Erkenntnisse eine Immunisierungsstrategie zur Produktion therapeutischer Hyperimmunseren entwickelt, wobei unterschiedliche Antigenexpressionssysteme miteinander verglichen wurden.

### **2.6.1 Impfstrategie im Angesicht einer Pandemie: verbesserte Immunogenität durch Adjuvantien**

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Wirkung der beiden squalenbasierten Adjuvantien MF59 und AS03 auf die Amplitude und Spezifität der Antikörperantworten im Frettchen untersucht. Hierbei wurde zwischen totalen Antikörperantworten gegen die Oberflächenproteine HA und NA einerseits und den funktionalen Antikörpern andererseits unterschieden.

Bei Verwendung von Adjuvantien wurde in der Vergangenheit bereits die Induktion kreuzreaktiver und kreuzneutralisierender Antikörper beobachtet (KAHN et al. 1994; BIHARI et al. 2012). Herangezogen wurden hierzu verschiedene Isolate des pandemischen Influenzavirus A(H1N1)2009 sowie phylogenetisch weiter entfernte, saisonale A(H1N1)2009-Isolate. Die Kreuzreaktivität der totalen Antikörper wurde darüber hinaus auch gegen rekombinante HA- und NA-Proteine anderer Influenza-Stämme wie beispielsweise A(H5N1) untersucht. Abschließend wurde die aus der Immunisierung der Frettchen resultierende Immunantwort mit dem Schutz vor einer Infektion korreliert. Nach der Infektion mit dem homologen pandemischen Influenzavirus A(H1N1)2009 wurden der Einfluss auf den Krankheitsverlauf sowie die Viruslast im Respirationstrakt untersucht.

### **2.6.2 Antiseren gegen akute virale Infektionen: sofortige Immunität durch passiven Immuntransfer**

Das beispiellose Ausmaß des EBOV-Ausbruchs in Westafrika führte zum Einsatz neuer Therapien, die sich bereits in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befanden (WONG & KOBINGER 2015). Für viele andere neuartige Viren ist die Entwicklung jedoch noch nicht so weit fortgeschritten, so dass Behandlungsoptionen benötigt werden, die schnell in klinisch relevanter Qualität und Menge hergestellt werden können. Immunglobuline haben ein vielversprechendes Potential für die Vorbeugung und Therapie viraler Infektionen (WALKER & BURTON 2018). Dieses noch nicht vollständig ausgeschöpfte Potential stellt eine potente Möglichkeit im Kampf gegen wiederkehrende und neu auftretende akute Krankheitserreger dar.

Die Arbeit mit hochpathogenen Erregern ist in der Regel auf biologische Hochsicherheitseinrichtungen beschränkt, was eine Antigenproduktion im größeren Umfang und die Immunisierung von großen Tieren, die für die Serumproduktion benötigt werden, erschwert. In Kombination mit dem ZEBOV-Glykoprotein als Modellantigen wurden in dieser Arbeit drei Systeme zur Antigenexpression verglichen, die entweder keine oder nur geringe biologische Sicherheitsanforderungen haben: VLPs, MVA und VSV.

In einem ersten Schritt wurde ein möglichst zügiges Immunisierungsprotokoll in der Maus etabliert, wobei die Effektivität der Antigenexpressionssysteme anhand der Induktionsdauer sowie der Amplitude totaler und funktionaler Antikörpertiter beurteilt wurde. Im nächsten Schritt wurden Kaninchen entsprechend diesem Protokoll immunisiert, um ausreichende Mengen des Antiserums für die Optimierung des IgG- Reinigungsprozess herzustellen. Die totalen Antikörpertiter gegen das ZEBOV-GP sowie neutralisierende Titer gegen ein pseudotypisiertes Virus wurden zunächst mithilfe von Surrogattests in unserem Labor gemessen. Um eine relevante Einschätzung der Effektivität des Antiserums zu bekommen, wurden die Seren außerdem in dem validierten Vollvirus-ELISA sowie dem ZEBOV-Virusneutralisationstest getestet. Im nächsten Schritt sollte ein Reinigungsprozess etabliert werden, der die Immunogenität des Serums reduziert, ohne dass dieses dabei an Funktionalität und Stabilität verliert. Die Funktionalität der Antigenpräparationen wurde anhand neutralisierender Titer über den Reinigungsprozess hinweg dokumentiert. Die Stabilität der finalen Antigenpräparation wurde in einem letzten Schritt in einem xenogenen *In-vivo*-Modell getestet.

## 3 MATERIAL

### 3.1 Geräte und Laborinstrumente

Gerät/Instrument: Bezeichnung	Hersteller, Ort (Land)
Bunsenbrenner: Laborgaz 206	Campinggaz, Hungen-Inheiden (DE)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Zellkultur (32/37 °C): Heracell 150i	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Eisschrank (-20 °C): GG4010-20	Liebherr, Biberach an der Riss (DE)
Eisschrank (-80 °C): HERAfreeze Top	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Elektrophorese-Energieversorger: PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Lumineszenz-Dokumentations-Gerät: MicroChemi 4.2, Kamera MicroLine ML 4022	DNR Bio Imaging Systems, Jerusalem (IL)
Gelelektrophorese-Laufkammer horizontal: RunOne Electrophoresis Cell	EmbiTec, San Diego, CA (US)
Gelelektrophorese-Laufkammer vertikal: Mini-Protean	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
Geldokumentationssystem: G-Box	Syngene, Cambridge (UK)
Heizblock, Heiz-Thermomixer: MHR 13	Ditabis, Pforzheim (DE)
Kühlschrank Mikrobiologie (4 °C): FKS 1800-20	Liebherr, Biberach an der Riss (DE)
Kühlschrank Molekularbiologie (4 °C): FKS 1800-20	Liebherr, Biberach an der Riss (DE)
Kühlschrank Zellkultur (4 °C): FKS 5000-20	Liebherr, Biberach an der Riss (DE)
Magnetrührer/Heizrührer: MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach (DE)
Mehrkanalpipette: Finnpipette F2	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Mikroskop, Durchlicht: Eclipse TS100-F	Nikon, Düsseldorf (DE)
Mikrowelle: Typ 7809	Severin, Sundern (DE)
Neubauer-Zählkammer: Neubauer Brightlight	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf (DE)
PCR-Cycler: TProfessional TRIO 48	Biometra, Göttingen (DE)
Pipetten: Reference 2 (0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipettierhelfer: accu-jet pro	Brand, Wertheim (DE)
Reagenzschüttler: Reax top	Heidolph, Schwabach (DE)
Schüttler Zellkultur: SSL4	Stuart, Villepinte (FR)
Schüttelinkubator Mikrobiologie (37 °C): Innova 42	New Brunswick Scientific, Edison, NJ (US)
Sicherheitswerkbank: MSC-Advantage 1.2	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Spektrophotometer: NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Transfersystem: Trans-Blot SD Semy-Dry	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
Trockenofen: WTC	Binder, Tuttlingen (DE)
Waage: VWR 1502	Sartorius, Göttingen (DE)
Wasserbad Mikro-/Molekularbiologie: ECO TW8	Julabo, Seelbach (DE)
Wasserbad Zellkultur	GFL, Burgwedel (DE)
Highspeed-Zentrifuge: Avanti® J-26S XPI	Beckmann Coulter, Krefeld (DE)
Tischzentrifuge: 5418, Rotor: FA-45-18-11	Eppendorf, Hamburg (DE)
Tischzentrifuge: 5417R gekühlt, Rotor: FA-45-24-11	Eppendorf, Hamburg (DE)

<b>Gerät/Instrument: Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Ultrazentrifuge: Optima L-80 XP, Swinging-Bucket-Rotoren: SW 32 Ti, SW 41 Ti, SW 60 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld (DE)
Zentrifuge: 5810R, gekühlt, Rotor A-4-81	Eppendorf, Hamburg (DE)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material, Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA-Platten: Nuc MaxiSorp, 8-Loch Streifen mit C-Boden und Rahmen im 96-Loch-Format	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)
Filter für Spritzen (1,2, 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen (DE)
Filterpapier: Whatmann	GE Healthcare, Backinghamshire (UK)
Dialyse-Kassetten: Slide-A-Lyzer, MWCO 20 kDa	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Durchlaufhahn 3-Way-StopCock für Luer Lock Spritzen	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Konzentratorsäule: Vivaspin (500, 20 ml)	Sartorius, Göttingen (DE)
Kryoröhrchen: Cryo S	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Pasteur-Pipetten ohne Filter, Flintglas	VWR, Darmstadt (DE)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Fisher/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Polyvinylidendifluorid-(PVDF-) Membran	Millipore/Merck, Darmstadt (DE)
Protein A-Säulen: Vivapure mini (≤ 1mg Kapazität)	Sartorius, Göttingen (DE)
Protein A-Säulen: Vivapure midi (≤ 20 mg Kapazität)	Sartorius, Göttingen (DE)
Protein G-Säulen: Vivapure mini (≤ 1mg Kapazität)	Sartorius, Göttingen (DE)
Pipettenspitzen (20, 200, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipettenspitzen mit Filter (10, 100, 300, 1.000 µl)	4titude, Berlin (DE)
Reagenz-Reservoir	VWR, Darmstadt (DE)
Reaktionsgefäß (1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Reaktionsgefäß (15, 50 ml), Cellstar Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Röhrchenhalter für Kanülen: VACUETTE-System	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Sicherheitskanülen 21 G (0,8 x 40 mm), 27 G (0,4 x 20 mm)	BD, Heidelberg (DE)
Sicherheitskanülen 20 G (0,9 x 38 mm), 21 G (0,8 x 35 mm), 25 G (0,5 x 24 mm)	B. Braun, Melsungen (DE)
Skalpell	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Spritzen (1, 3, 5 ml)	B. Braun, Melsungen (DE)
Spritzen Luer Lock (3, 5, 10 ml)	B. Braun, Melsungen (DE)
Serumröhrchen Z-Serum-Sep Gerinnungsaktivator und inerternem Trenngel: VACUETTE-System	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Serumröhrchen mit Silica-Partikel_Beschichtung der Innenseite: VACUETTE-System	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Zellkulturplatten (6-, 12- und 96-Loch mit flachem Boden, 96-Loch mit U-Boden)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)

### 3.3 Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Lieferant/Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid Gel 30 (37, 5:1)	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
AEC-Substrat	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Alsever's Lösung	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Aluminiumhydroxid-Gel Adjuvant 2%	InvivoGen, San Diego, CA (US)
APS	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumsulfat (gesättigt, 4,32 M)	Pierce/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
AS03	GlaxoSmithKline, London (UK)
Avicel RC-591-Overlay	Avicel, FMC Corporation, Philadelphia, PA (US)
$\beta$ -Mercapto-EtOH	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Bromphenol-Blau	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Fisher/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Diluvac Forte	Intervet/MSD, Unterschleißheim (DE)
DMEM	Biowest, Nuaille (FR)
DMSO	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
DNA-Ladepuffer 6x	Fermentas/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
DNA-Marker GenRuler1kb Plus DNA Ladder	Fermentas/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
dNTPs	Agilent Technologies, Waldbronn (DE)
DTT 0,1 M	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
ECL Western-Blot Substrat	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Essigsäure	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
EtOH	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
FKS	Gibco/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
GelRed 10.000x in Wasser	Biotium, Fremont, CA (US)
Glutamin (L-Glutamin)	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Hydrogencarbonat ( <i>Carbonate-Bicarbonate</i> )	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Isopropanol	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Ketamin 10 % (Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml Injektionslösung)	bela-pharm, Vechta (DE)
Kristallviolett	Fisher/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
LB-Medium 1 % (w/v) Trypton aus Casein, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0 in RW	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
LB-Agar-Platten 100 $\mu$ g/ml Ampicillin	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)

## MATERIAL

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
MF59	Novartis, Basel (CHE)
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Meerschweinchen-Erythrozyten	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
MeOH	Medienküche
Natrium/Sodium	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Natriumacetat	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid 0,9 % (w/v), isotonische Kochsalzlösung	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
PBS ohne Magnesium und Calcium 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in RW, pH 7,1	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
PEI	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
PFA	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Protein-Marker PageRuler Plus Prestained	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
Reinstwasser, RW	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Saccharose	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Sedin (Medetomidinhydrochlorid, 1 mg/ml)	ALVETRA, Neumünster (DE)
SDS 10 % (w/v) in RW	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Sigma Adjuvant System	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
SOC-Medium 2 % (w/v) Trypton aus Casein, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM D(+)- Glukose, pH 7,0 in RW	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
TAE-Puffer 50x 2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA; in RW; pH 8,5	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
TBS 10x 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7,4	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
TiterMax Gold Adjuvant	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
TMB-Färbelösung	KPL/Seracare, Milford, MA (US)
TPCK-Trypsin	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Tris base	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Tris-HCl	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Tris/Glycin-Puffer 10x 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
Trypanblau	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Trypsin/EDTA 0,25 % (v/v) Trypsin, 0,1 % (v/v) EDTA in PBS	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
<i>Vibrio cholerae</i> Neuraminidase-Filtrat (RDE)	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Xylacin/Rompun 2 % (Xylazium, 20 mg/ml)	Bayer Vital, Leverkusen (DE)

### 3.4 Kommerzielle Kits

Kit-Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Kolorimetrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, Detergenzkompatibel	Pierce/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
RNeasy Mini Kit	Isolierung und Reinigung von <100 µg RNA aus Zellkultur unter Verwendung von Siliciumdioxid-Säule	Qiagen, Hilden (DE)
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen	Qiagen, Hilden (DE)
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten bis 10 kb unter Verwendung eines Bindung-Wasch-Eluat-Verfahrens an Silica-Membran-Säulen	Qiagen, Hilden (DE)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolierung von <20–30 µg Plasmid-DNA	Qiagen, Hilden (DE)
QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit	Isolierung von <100 µg (Midi) respektive <500 µg (Maxi) Plasmid-DNA mittels eines schwerkraftabhängigen Bindung-Wasch-Eluat-Verfahrens durch Anionenaustausch-Säulen	Qiagen, Hilden (DE)
Quick Start Bradford Assay	Kolorimetrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
Rabbit IgG ELISA Quantification Set	ELISA-Set zur Quantifizierung von Kaninchen-IgG in Serum oder Plasma	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)

### 3.5 Enzyme und Reaktionspuffer

Enzym und Komponenten	Hersteller
<u>FastAP</u> thermosensitive alkalische Phosphatase (1 U/µl) <u>Reaktionspuffer 10x</u> : 100 mM Tris-HCl, pH 8 bei 37 °C; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M KCl; 0,2 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml BSA	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
<u>Pfu DNA-Polymerase</u> (2–3 U/µl) <u>Reaktionspuffer 10x</u> : 200 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 20 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 % Triton X-100; 1 mg/ml nucleasefreies BSA	Promega, Mannheim (DE)
<u>Restriktionsendonukleasen</u> EcoRI (20.000 U/ml), PmeI (10.000 U/ml), Sall (100.000 U/ml), SphI (10.000 U/ml), XbaI (20.000 U/ml), XhoI (20.000 U/ml) <u>Reaktionspuffer 1x</u> NEB 2: 50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 µg/ml BSA; pH 7,9 NEB 3: 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 µg/ml BSA; pH 7,9 CutSmart: 50 mM Kaliumacetat; 20 mM Tris-Acetat; 10 mM Magnesiumacetat, 100 µg/ml BSA; pH 7,9	New England Biolabs, Frankfurt (DE)
<u>SuperScript III</u> Reverse Transkriptase (200 U/µl) <u>Reaktionspuffer 5x</u> : 250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 µM KCl; 15 µM MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)
<u>T4-Ligase</u> <u>Reaktionspuffer 2x</u> : 132 mM Tris-HCl; 20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 2 mM DTT; 2 mM ATP; 15 % PEG 6000; pH 7,6	New England Biolabs, Frankfurt (DE)

### 3.6 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung, Quelle	Quelle
pCG-IRESzeomut (pCG1)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit SV40-Replikationsursprung und einem CMV-Promotor, Ampicillin-Resistenz	Prof. Dr. V. v. Messling (MESSLING et al. 2001)
pCG1-H7(H7N7)	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/chicken/Rostock/1934 (H7N7) zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert	Dr. R. Wagner, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
pCG1-H9(H9N2)	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/chicken/Beijing/2/1997 (H9N2) zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert	Dr. R. Wagner, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
pCG1-H1(H1N1pdm09)-FLAG	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/California/07/2009 (H1N1pdm09) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 7.096 bp	eigene Arbeit
pCG1-H3(H3N2)-FLAG	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/Victoria/36/2011 (H3N2) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 7.096 bp	eigene Arbeit
pCG1-H5(H5N1)-FLAG	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 7.096 bp	eigene Arbeit
pCG1-H7(H7N7)-FLAG	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/chicken/Rostock/1934 (H7N7) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 7.078 bp	eigene Arbeit
pCG1-H9(H9N2)-FLAG	pCG1-Plasmid, HA-Gen des Influenzavirus A/chicken/Beijing/2/1997 (H9N2) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 7.078 bp	eigene Arbeit
pCG1-N1(H1N1pdm09)-FLAG	pCG1-Plasmid, NA-Gen des Influenzavirus A/California/07/2009 (H1N1pdm09) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen XbaI und SphI kloniert, 6.790 bp	eigene Arbeit
pCG1-N1(H5N1)-FLAG	pCG1-Plasmid, NA-Gen des Influenzavirus A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen PmeI und SphI kloniert, 6.730 bp	eigene Arbeit
pCG1-N2(H3N2)-FLAG	pCG1-Plasmid, NA-Gen des Influenzavirus A/Victoria/36/2011 (H3N2) mit FLAG-Epitop am 3'-Ende zwischen die monovalenten Spaltsequenzen XbaI und SphI kloniert, 6.790 bp	eigene Arbeit

## MATERIAL

Bezeichnung	Beschreibung, Quelle	Quelle
pCAGGS-ZEBOV-GP	Eukaryotisches Expressionsplasmid pCAGGS mit Ampicillin-Resistenz, kodiert für die membrangebundene Form des Glykoproteins des ZEBOV Stammes Mayinga 1976 unter Kontrolle des AG-Promotors	Prof. Dr. S. Becker (MITTLER et al. 2011)
pCAGGS-ZEBOV-VP40	Eukaryotisches Expressionsplasmid pCAGGS mit Ampicillin-Resistenz, kodiert für das Matriyprotein VP40 des ZEBOV Stammes Mayinga 1976 unter Kontrolle des AG-Promotors	Prof. Dr. S. Becker (HOENEN et al. 2005)

### 3.7 Oligonukleotide

#### Genspezifische Primer für Klonierung oder Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
H1(H1N1pdm09)-S (PmeI)	ATTgtttaaacATGAAGCAATACTAGTAG
H1(H1N1pdm09)-FLAG-AS (SphI)	ATTgcatgcTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAATACATATTCTACTACTGTAG
H1(H1N1pdm09)-Seq1	TCCATCTACTAGTGCTGACC
H3(H3N2)-S (PmeI)	ATTgtttaaacATGAAGACTATCATTGCTTTGAG
H3(H3N2)-FLAG_AS (SphI)	ATTgcatgcTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAATGCAAATGTTGCACCTAATG
H3(H3N2)-Seq1	GTACGGACAATGACCAATC
H5(H5N1)-S (PmeI)	GATCgtttaaacATGGAGAAAATAGTGCTTC
H5(H5N1)-FLAG-AS (SphI)	GATCgcatgcTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAATGCAAATTCTGCATTGTAACG
H5(H5N1)-Seq1	TAATGATGCGGCAGAGCAGAC
H7(H7N7)-S (PmeI)	ATTgtttaaacATGAACACTCAAATCCTGG
H7(H7N7)-FLAG-AS (SphI)	ATTgcatgcTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCTATACAAATAGTGCACCG
H7(H7N7)-Seq1	AGGATCAACCACCGAACAGACC
H9(H9N2)-S (PmeI)	ATTgtttaaacATGAAAGTAGTATCACTAATAAC
H9(H9N2)-FLAG-AS (SphI)	ATTgcatgcTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCTATACAAATGTTGCATCTGC
H9(H9N2)-Seq1	ACCCACCGATACTGTACAGAC
N1(H1N1pdm09)-FLAG-S (XbaI)	ATTtctagaATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGAATCCAAACAAAAGATAATAACCATTGG
N1(H1N1pdm09)-AS (SphI)	ATTgcatgcTTACTTGTCAATGGTAAATGGCAACTCAGC
N1(H1N1pdm09)-Seq_internal-S-728	CCGATGGACCAAGTAATGGACAGG
N1(H1N1pdm09)-Seq_internal-AS-751	CCTGTCCATTACTTGGTCCATCGG
N1(H5N1)-FLAG-S (XbaI)	ATTtctagaATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGG
N1(H5N1)-AS (SphI)	ATTgcatgcCTACTTGTCAATGGTGAATGGC
N1(H5N1)-Seq_internal-S-648	GAATGTGCATGTGTAAATGGCTCTTGC

## MATERIAL

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
N1(H5N1)-Seq_internal-AS-674	GCAAGAGCCATTTACACATGCACATTC
N2(H3N2)-FLAG-S (XbaI)	ATTtctagaATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGAATCCAAATCAAAGATA ATAACGATTGG
N2(H3N2)-AS (SphI)	ATTgcatgcTTATATAGGCATGAGATTGAGG
N2(H3N2)-Seq_internal-S-686	CTCAGGACCCAGGAGTCAG
N2(H3N2)-Seq_internal-AS-704	CTGACTCCTGGGTCCTGAG
pCAGGS-ZEBOV-GP_Seq_internal-S	CCCGGTGCCGGTATGTGCAC
pCAGGS-ZEBOV-GP_Seq_internal-AS	TCCGGCGCGAACTTCTTCCG

### Sequenzier-Primer für Vektoren und Viren

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pCG-IRESzeomut-Seq_S	TTGTGCTGTCTCATCATTTTGGC
pCG-IRESzeomut-Seq_AS	ATAGACAAAAGCACACCCGGCC
pCAGGS-Seq_S	TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTG
pCAGGS-Seq_AS	AGAAGTCAGATGCTCAAGG
VSV-M-Seq_S	AGCCTCTCGAACAACTAATATCC
VSV-L-Seq_AS	TCATTGAACTCGTCGGTCTC

## 3.8 Antikörper und Seren

### Polyklonale Antikörper

Antigen	Spender	Verdünnung (Verwendung)	Quelle
Influenza H1N1 A/California/07/2009	Frettchen	1:500 (IPMA)	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Influenza H3N2 A/Victoria/36/2011	Frettchen	1:500 (IPMA)	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Influenza H5N1 A/Viet Nam/1194/2004	Frettchen	1:500 (IPMA)	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Kaninchen IgG-Fc (1 mg/ml)	Ziege	1:100 (ELISA)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)
Zaire Ebolavirus	Ziege	1:400 (Western-Blot)	Prof. Dr. S. Becker, Philipps-Universität Marburg (DE)

### Konjugierte Antikörper

Antigen (Konjugat)	Spender	Verdünnung (Verwendung)	Hersteller
FLAG-Epitop (HRP)	Maus, monoklonal M2	1:2.500 (Western-Blot) 1:750 (IPMA)	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt (DE)
Frettchen (HRP)	Ziege, polyklonal	1:750 (IPMA)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)
Kaninchen F(ab') <sub>2</sub> (HRP)		1:750 (IPMA)	Biomol GmbH, Hamburg (DE)
Kaninchen IgG-Fc (HRP)	Ziege, polyklonal	1:200.000 (ELISA)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)

Antigen (Konjugat)	Spender	Verdünnung (Verwendung)	Hersteller
Kaninchen IgG-Fc (HRP)	Ziege, polyklonal	1:750 (IPMA)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX (US)
Maus (HRP)	Ziege, polyklonal	1:750 (IPMA)	Jackson ImmunoResearch Europe, Ely (UK)
Ziege IgG (HRP)	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (Western-Blot) 1:750 (IPMA)	Calbiocam/Merck, Darmstadt (DE)

### 3.9 Bakterien

Bakterienname, Typ	Genotyp	Hersteller
One Shot™ TOP10 <i>E. coli</i> , chemisch kompetent	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ( araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe (DE)

### 3.10 Viren

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
Influenza A/California/07/2009 (H1N1)	Influenza-A-Virus, pandemischer Subtyp H1N1 (Schweinegrippe) aus 2009, humanes Isolat	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich- Institut, Langen (DE)
Influenza A/Victoria/36/2011 (H3N2)	Influenza-A-Virus, Subtyp H3N2 aus 2011, humanes Isolat	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich- Institut, Langen (DE)
Influenza A/Viet Nam/1194/2004- A/PR/8/34 (H5N1)	Influenza-A-Virus-Reassortment, HA und NA des pandemischen Subtyps H1N1 aus 2009 exprimiert von laboradaptierten Subtyp H5N1 aus 1934	Prof. Dr. V. v. Messling, Paul-Ehrlich- Institut, Langen (DE)
VSVΔG/EBOV-GP	Rekombinantes Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), welches das Glykoprotein des ZEBOV-Isolats Kikwit 1995 anstelle des eigenen Glykoproteins exprimiert	Prof. Dr. S. Becker (GEISBERT et al. 2008)
MVA/EBOV-GP	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), welches eine Expressionskassette für das ZEBOV-GP des Isolates Guéckédou 2014 trägt	Prof. Dr. G. Sutter und Dr. A. Volz, Ludwig-Maximilians-Universität München (DE), nicht publiziert
MVA/EBOV-VP40/GP	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), welches eine Expressionskassette für das ZEBOV-GP sowie ZEBOV-VP40 des Isolates Guéckédou 2014 trägt	Prof. Dr. G. Sutter und Dr. A. Volz, Ludwig-Maximilians-Universität München (DE), nicht publiziert

### 3.11 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
HEK-293	Humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie, adhären wachsend	ATCC® CRL-1573
MDCK	Epithel-Zelllinie aus der Hundeniere, adhären wachsend	ATCC® CCL-34
Vero E6	Epithel-Zelllinie aus der grünen Meerkatze, adhären wachsend	ATCC® CRL-1586

### 3.12 Tiere

Tierart, Bezeichnung	Beschreibung	Lieferant/Quelle
Frettchen	Auszuchtlinie für Frettchen	Institutseigene Zucht, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (DE)
Kaninchen, New Zealand White	Auszuchtlinie für Kaninchen von Charles River (Kanada) 1991 aus Japan übernommen	Charles River, Sulzfeld (DE)
Mäuse, BALB/cJrj	Inzuchtmauslinie für Verwendung in der Immunologie und Antikörperproduktion	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle (FR)

### 3.13 Software und Datenbanken

Hersteller, Programmbezeichnung	Anwendung
Citavi (Swiss Academic Software)	Literaturverwaltung
FigTree 1.4.3 ( <a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree</a> )	Grafische Darstellung phylogenetischer Analysen
Excel für Mac 2011, (Microsoft)	Archivierung von Rohdaten, Auswertung von ELISA-Daten
GelCapture Version 7.0.15 (DNR Bio Imaging Systems)	Detektion von Lumineszenz, Dokumentation von Western-Blots
GenBank (NCBI)	Datenbank für Gensequenzen
GeneSnap (Syngene)	Dokumentation von DNA-Agarosegelen
Illustrator CS6 (Adobe)	Erstellung von Vektorgrafiken
Omega 2.1 (Clustal)	Programm für multiples Sequenzalignment
Photophop CS6 (Adobe)	Erstellung von Grafiken
Prism 6 (GraphPad)	Grafische Darstellung und statistische Auswertung
SeaView (Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique)	Plattformübergreifende, grafische Benutzeroberfläche für phylogenetische Analyse
Sequencher 5.3 (Gene Code Corporation)	Analyse der SNA-Sequenzierdaten
SnapGene 2.3.2. (GSL Biotech)	Primer-Design <i>in silico</i> , Klonierung, Erstellung und Archivierung von Plasmidkarten

## 4      **METHODEN**

### 4.1    **Molekularbiologische Methoden**

#### 4.1.1   **Isolierung von RNA und cDNA-Synthese**

##### RNA-Isolation aus infizierten Zellen

Für die Amplifikation viraler Gene wurden Zellen mit dem entsprechenden Virus infiziert und die zellulär synthetisierten Ribonukleinsäuren (RNA) mittels RNeasy Mini Kit unter Verwendung einer Siliciumdioxid-Säule gemäß Anweisung des Herstellers isoliert und gereinigt. Für die Klonierung der HA- und NA-Gene in eukaryotische Expressionsplasmide wurde die RNA der Influenzaviren A/California/07/2009 (H1N1), A/Victoria/36/2011 (H3N2) sowie das rekombinante PR8-Virus, welches HA und NA des Isolates A/Viet Nam/1194/2004-A/PR/8/34 (H5N1) exprimiert, aus infizierten MDCK-Zellen gewonnen. Für die Sequenzierung des ZEBOV-GP, welches vom rekombinanten VSVΔG/EBOV-GP exprimiert wird, wurden die RNA nach gleicher Methode aus infizierten Vero-E6-Zellen isoliert.

##### Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels spektralphotometrischer Analyse unter Verwendung des NanoDrop 2000c bestimmt. Unter Berücksichtigung der Nullwert-Messung des verwendeten Puffers wurde die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm – dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren – und 280 nm – dem Absorptionsmaximum von Proteinen – gemessen. Zur Bestimmung der Probenreinheit wurde der Quotient aus beiden Messungen ermittelt. Während reine RNA einen Quotienten von 2,0 erreicht, sollte der Quotient reiner DNA bei 1,8 liegen.

##### Reverse Transkription – cDNA Synthese

Aus der gereinigten RNA wurde unter Verwendung der SuperScript-III-Reverse-Transkriptase, einer modifizierten viralen RNA-spezifischen DNA-Polymerase, mit Oligodesoxyribonukleotiden (*Primern*) einer zufälligen Sequenz [d(N)6] (*random hexamers*) gemäß Anweisung des Herstellers cDNA herstellt. Hierzu wurde das Nukleinsäure-Gemisch des Ansatzes A für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert um RNA-Sekundärstrukturen zu lösen und 1 Minute auf Eis abgekühlt, bevor die Enzyme mit Ansatz B zugeben wurden (Tabelle 1). Anschließend wurde mit dem unten aufgeführten Programm mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert (Tabelle 2).

**Tabelle 1: Standard-Ansatz einer reversen Transkription**

Ansatz A		Ansatz B	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Primer (random hexamers) 50–250 ng	1 µl	Reaktionspuffer 5x	4 µl
dNTP-Mix, 10 mM je dNTP	1 µl	DTT 0,1 M	1 µl
RNA-Matrize (10 pg–5 µg)	1 µl	RNase Out	1 µl
RNase-freies RW	10 µl	SuperScript III (200 U/µl)	1 µl
Finales Volumen	13 µl	Finales Volumen	7 µl

**Tabelle 2: Standard-Programm einer reversen Transkription**

Ansatz		Zeit	Temperatur
A	Denaturierung RNA-Sekundärstrukturen	5 min	65 °C
		1 min	auf Eis
A + B	Primer-Hybridisierung	5 min	25 °C
	Elongation	50 min	50 °C (cDNA < 5 kb)
	Inaktivierung	15 min	70 °C
	Kühlung	∞	4 °C

### cDNA-Analyse mittels Gelelektrophorese

Zur Bestätigung der cDNA-Amplifikation wurden die Produkte der reversen Transkription mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurden 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und nach dem Auspolymerisieren in die mit 200 ml 1x TAE-Puffer gefüllte horizontale Gelelektrophorese-Kammer überführt. Geladen wurde 1 µl des cDNA-Produkts und als Größenvergleich diente 1 µl des DNA-Markers GenRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Beide Ansätze wurden mit 1 µl DNA-Ladepuffer gemischt und mit Reinstwasser (RW) auf 6 µl aufgefüllt. Die entsprechenden Komponenten sind in (Tabelle 3) aufgeführt. Die DNA-Fragmente wurden bei 100 V für 20 Minuten aufgetrennt. Der dem Ladepuffer beigemischte Farbstoff GelRed interkaliert zwischen die Basenpaare der Polynukleotide, emittiert Photonen bei Anregung mit UV-Licht und macht die DNA-Banden durch Emission bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm sichtbar, die anschließend mit dem Geldokumentationssystem G-Box dokumentiert wurden. Die Konzentration der amplifizierten cDNA wurde gemessen und der Ansatz ohne vorheriges Entfernen der RNA zur Amplifikation spezifischer DNA verwendet.

**Tabelle 3: Komponenten einer DNA-Gelelektrophorese und deren Zusammensetzungen**

Komponente	Zusammensetzung
TAE-Puffer 1x	20 ml TAE 50x, 980 ml RW
1 % Agarose Gel	1 % (w/v) Agarose in 50 ml TAE 1x
DNA-Ladepuffer 6x	1 ml 6x DNA-Ladepuffer, 50 µl Gel Red 10.000x (1:1.000 in RW)
Ansatz cDNA	1 µl Produkt der reversen Transkription, 1 µl DNA-Ladepuffer, 5 µl RW
DNA-Marker	1 µl GenRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1 µl DNA-Ladepuffer, 5 µl RW

#### 4.1.2 Amplifizierung, Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten

##### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte werden zwei flankierende, spezifische *Primer* und eine thermostabilen DNA-Polymerase verwendet. In dieser Arbeit wurde die thermostabile Pfu-DNA-Polymerase von Promega verwendet, welche durch ihre Korrekturlese-Aktivität eine hohe Genauigkeit aufweist. Als Matrize diente entweder Plasmid-DNA oder synthetisierte cDNA. Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95 °C folgt die *Primer*-Hybridisierung an den komplementären Sequenzen der Einzelstrang-DNA bei einer *primer*-spezifischen Schmelztemperatur, bevor durch die Elongation bei einer polymerase-abhängigen Temperatur von 72 °C der neue DNA-Doppelstrang synthetisiert wird. Durch eine Wiederholung dieses Zyklus' wird der spezifische DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Ein beispielhafter Ansatz ist in Tabelle 4 und das PCR-Programm in Tabelle 5 beschrieben.

Die HA- und NA-Gene wurden entweder auf Basis von cDNA oder zur Klonierung der HA-Gene der Influenzaviren A/chicken/Rostock/1934 (H7N7) und A/chicken/Beijing/2/1997 (H9N2) aus den Plasmiden pCG1-H7(H7N7) oder pCG1-H9(H9N2) amplifiziert. In beiden Fällen fügten die verwendeten Vorwärts- (*sense*, S) und Rückwärts-*Primer* (*antisense*, AS) eine spezifische monovalente Spaltstelle für ein NEB-Restriktionsenzym hinzu. An das Typ-I-Transmembranprotein HA wurde C-terminal und an das Typ-II- Transmembranprotein NA wurde N-terminal ein intrazelluläres FLAG-Epitop (DYKDDDDK) zur Markierung angehängt.

Aus der cDNA VSVΔG/EBOV-GP infizierter Zellen wurde mittels VSV-spezifischer, das GP flankierender Primer das ZEBOV-GP-Gen amplifiziert.

**Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase-Puffer 10x	5 µl
dNTP-Mix, 10 mM je dNTP	2 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	3 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	3 µl
DNA/cDNA-Matrize	1 µl (< 0,5 µg)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2–3 U/µl)	0,5 µl
RW	35,5 µl
Finales Volumen	50 µl

**Tabelle 5: Standard-PCR-Programm**

Schritt (Temperatur)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung (95 °C)	2 min	
Denaturierung (95 °C)	10 sec	
Primer-Hybridisierung (53 °C, –0,2 °C/Zyklus)	30 sec	26x
Elongation (72 °C)	2,5 min	
Finale Elongation (72 °C)	7 min	
Kühlung (4 °C)	∞	

#### Analyse mittels Gelelektrophorese und Reinging amplifizierter Fragmente

Zur Analyse der Fragmentgrößen wurden die amplifizierten PCR-Produkte mittels DNA-Gelelektrophorese wie zuvor beschrieben aufgetrennt und mit den Ergebnissen der *In-silico*-Klonierung abgeglichen. Geladen wurden 5 µl des PCR-Produkts gemischt mit 1 µl DNA-Ladepuffer. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker GenRuler 1kb Plus DNA Ladder. Die PCR-Produkte, deren Größe mit den *in silico* klonierten Fragmenten übereinstimmte, wurden nach Herstelleranweisung mit dem QIAquick PCR Purification Kit von *Primern*, Nukleotiden und Enzymen gereinigt. Hierzu wurde das fünffache Volumen des Bindepuffers mit hohem Salzgehalt zum PCR-Produkt gegeben und die DNA mittels Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 · g an einer Silica-Membran-Säule absorbiert. Nach einem alkoholbasierten Waschschrift wurde die DNA in 50 µl RW eluiert. Die entsprechenden Komponenten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Zusammensetzungen der Puffer zur Reinigung des PCR-Produkts**

Komponente	Zusammensetzung
Bindepuffer (PB)	5 M Gu-HCL, 30 % (v/v) Isopropanol
Waschpuffer (PE)	10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 80 % (v/v) EtOH

### 4.1.3 Enzymatische Modifikation von DNA und Klonierung von Plasmiden

#### Restriktionsverdau und elektrophoretische Isolation von *Insert*- und Vektor-DNA

Für die Klonierung mit überhängenden Enden wurden das gereinigte PCR-Produkt sowie der Plasmid-Vektor mit den Restriktionsenzymen von NEB entsprechend der gewählten monovalenten Spaltstellen geschnitten (Tabelle 7). Für die enzymatische Spaltung wurden Restriktionsansätze wie in Tabelle 8 beschrieben angesetzt und 3–8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente der Restriktionsansätze sowie ein DNA-Größenmarker wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese wie bereits beschrieben aufgetrennt. Hierzu wurden die 50 µl Restriktionsansatz mit je 10 µl DNA-Ladepuffer gemischt. Für die Laufweitenermittlung des *Inserts* (geschnittenes PCR-Produkt) sowie des Vektor-Plasmids wurden 2 µl-Proben beider Restriktionsansätze neben dem Größenmarker und die restlichen 58 µl der Restriktionsansätze in den benachbarten Vertiefungen platziert. Nachdem die DNA-Fragmente für 20 Minuten bei 100 V aufgetrennt wurden, konnte der Teil des Gels mit dem Größenmarker und den 2 µl-Proben der beiden Restriktionsansätze von den zur Klonierung bestimmten DNA-Fragmente mittels Skalpell getrennt werden. Die Anzahl und Größe der DNA-Fragmente der 2 µl-Proben wurde unter UV-Licht mit den durch *In-silico*-Restriktionsverdau ermittelten Eigenschaften abgeglichen und die *Insert*- und Vektor-Banden lokalisiert und ausgemessen. Die für die Klonierung bestimmten DNA-Fragmente wurden anhand der ermittelten Laufweite aus dem Gel ausgeschnitten, ohne diese dem UV-Licht auszusetzen.

**Tabelle 7: DNA-Fragmente mit den Enzym für ihre monovalenten Spaltstellen**

DNA	Enzym (Puffer)
HA- <i>Inserts</i>	PmeI, SphI (CutSmart)
NA- <i>Inserts</i>	SphI, XbaI (NEB 2)
Vektor pCG-IRESzeomut	PmeI, SphI (CutSmart)
Vektor pCG-IRESzeomut	SphI, XbaI (NEB 2)

**Tabelle 8: Restriktionsansatz für *Insert*- und Vektor-DNA der HA- und NA-Plasmide**

Komponente	Insert-DNA	Vektor-DNA
	Volumen	Volumen
BSA 10x	5 µl	5 µl
NEB-Puffer 10x	5 µl	5 µl
Enzym 1	1 µl (> 0,5 U)	1 µl (> 0,5 U)
Enzym 2	1 µl (> 0,5 U)	1 µl (> 0,5 U)
DNA	30 µl PCR-Ansatz	variabel (2,5 µg)
RW	8 µl	auf 50 µl auffüllen
Finales Volumen	50 µl	50 µl

### Extraktion elektrophoretisch aufgetrennter *Insert*- und Vektor-DNA

Die ausgeschnittenen DNA-Fragmente von *Insert* und Vektor wurden anschließend mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Anweisung des Herstellers aus dem Gel isoliert. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Gelfragmente im dreifachen Volumen (w/v) Bindepuffer (QG) mit hohem Salzgehalt bei 50 °C geschmolzen. Für eine Bindung der DNA an die Silica-Membran-Säule muss die Lösung einen pH < 7,5 haben, welcher bei Bedarf durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat mit pH 5 angepasst werden konnte. Nach der Zugabe von einem Gelvolumen (w/v) Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 · g an einer Silica-Membran-Säule absorbiert. Einem Waschschrift mit 500 µl Bindepuffer folgte ein zweiter mit 750 µl Waschpuffer (PE), bevor die Säule 1 Minute trocken zentrifugiert und die DNA in 30 µl RW eluiert wurde. Die entsprechenden Komponenten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Zusammensetzungen der Puffer zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen**

Komponente	Zusammensetzung
Bindepuffer (QG)	5,5 M GuSCN, 20 mM Tris HCl (pH 6,6)
Waschpuffer (PE)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 80 % (v/v) EtOH

### Dephosphorylierung linearer Vektor-DNA

Um die Eigenligation der Vektor-DNA zu unterbinden, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden des Vektors unter Verwendung der alkalischen Phosphatase FastAP nach Angaben des Herstellers entfernt. Hierzu wurde bis zu 1 µg Vektor-DNA mit 1 U der alkalischen Phosphatase in Phosphatase-Reaktionspuffer wie in Tabelle 10 beschrieben angesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch anschließende zehnmünütige Inkubation bei 75 °C wurde die Phosphatase hitzeinaktiviert.

**Tabelle 10: Ansatz für die Dephosphorylierung der Vektor-DNA**

Komponente	Volumen
Vector-DNA	variabel (<1 µg)
Reaktionspuffer 10x	2 µl
FastAP Phosphatase	1 µl (1 U)
RW	auf 20 µl auffüllen
Finales Volumen	20 µl

### Plasmid-Ligation von *Insert*- und Vektor-DNA

Für die Ligation mit der T4-Ligase wurden das *Insert* und das dephosphorylierte Vektor-Plasmid in einem Verhältnis von 7:1 unter der Berücksichtigung der Fragmentgrößen und DNA-Konzentrationen eingesetzt, mit dem Ligations-Reaktionspuffer gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Dephosphorylierung von der

Vektor-DNA wurde ein Ansatz ohne Zugabe des *Inserts* hergestellt und getestet, ob es zu einer Re-Ligation des Vektors kommt. Die Ansätze sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Ansätze für Plasmid-Ligation und Re-Ligations-Kontrolle des Vektors**

	<b>Ligation Vektor + <i>Insert</i></b>	<b>Re-Ligation Vektor</b>
<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Volumen</b>
Vektor-DNA	1 µl (~ 50 ng)	1 µl (~ 50 ng)
<i>Insert</i> -DNA	7 µl (~ 350 ng)	---
Reaktionspuffer	10 µl	10 µl
T4 Ligase	1 µl	1 µl
RW	9 µl	16 µl
Finales Volumen	20 µl	20 µl

#### 4.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA durch Bakterien. In dieser Arbeit wurden die chemisch kompetenten Bakterien *E. coli* Top10 verwendet. Für die Transformation nach einer Klonierung wurden 10 µl des Ligations-Ansatzes eingesetzt. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die DNA hinzugegeben und der Ansatz für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden und eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 60 Minuten bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute in einem Thermo-block inkubiert, bevor die Bakteriensuspension auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

#### 4.1.5 Isolation und Analyse von Plasmid-DNA

##### Isolation von Plasmid-DNA in verschiedenen Maßstäben

Für die Selektion positiver Bakterien nach Transformation mit einem Ligations-Ansatz wurden Klone von der Agarplatte in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und bei 200 rpm und 37 °C für 8 Stunden inkubiert. Die Isolation und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte im kleinen Maßstab mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Hierzu wurden die Bakterien der Suspensionkultur bei 6.800 · g für 3 Minuten zentrifugiert, in Puffer P1 gelöst und unter alkalischen Bedingungen durch Zugabe des Puffers P2 lysiert. Die Plasmid-DNA wird durch alkalische Lyse freigesetzt, RNA durch zugeführte RNAsen degradiert, Zelltrümmer durch Natronlauge denaturiert, so dass chromosomale DNA und Proteine ausflocken, bevor die Zugabe von N3 den Ansatz neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration eingestellt wird. Durch Zentrifugieren bei 17.900 · g für 10 Minuten setzen sich die denaturierten Bestandteile ab und das gereinigte Lysat kann in eine Silika-Membran-Säule überführt werden, an welcher die Plasmid-DNA während Zentrifugierens für

1 Minute bindet. Nach zwei Waschschriften mit dem Puffer PB und Puffers PE wird die Säule trocken zentrifugiert und in 50 µl RW eluiert. Die verwendeten Pufferzusammensetzungen sowie eingesetzten Volumina sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Pufferzusammensetzung für die Isolation von Plasmid-DAN im kleinen Maßstab**

Komponente	Volumen Mini-Kit	Zusammensetzung
Puffer (P1)	250 µl	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8,0), 50–100 µg/ml RNase
Lyse-Puffer (P2)	250 µl	200 mM NaOH, 1 % SDS
Neutralisationspuffer (N3)	350 µl	4,2 M Gu-HCl, 0,9 M Kaliumacetat (pH 4,8)
Bindepuffer (PB)	500 µl	5 M Gu-HCl, 30 % (v/v) Isopropanol
Waschpuffer (PE)	750 µl	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 80 % (v/v) EtOH

Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden einzelne Kolonien der transformierten Bakterien in Suspensionskulturen mit einem Volumen von 100 ml oder 200 ml für die Produktion im mittleren oder großen Maßstab überführt und über Nacht kultiviert. Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Übernackturen erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit für bis zu 100 µg oder dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit für bis zu 500 µg DNA entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Nach dem Pelletieren der Bakterien bei 6.000 · g und 4 °C für 15 Minuten wurden die Bakterien in Puffer P1 gelöst und durch Zugabe des Puffers P2 lysiert. Nach 5 Minuten wurde der Neutralisationspuffer P3 zugegeben und die denaturierten Zelltrümmer sowie durch Essigsäure ausgeflockte chromosomale DNA und Proteine von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA durch zweimaliges Zentrifugieren bei 20.000 · g und 4 °C für 30 Minuten getrennt. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde anschließend auf eine mit QBT-Puffer equilibrierte Säule gegeben. Die an der Säule gebundene DNA wurde zweimal mit QC-Puffer gewaschen und in QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe von Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und bei 15.000 · g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, bevor das Pellet mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und erneut bei 15.000 · g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten wurde es in 250 µl respektive 500 µl RW gelöst. Die verwendeten Pufferzusammensetzungen sowie eingesetzten Volumina sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13: Pufferzusammensetzung für die Isolation von Plasmid-DAN im mittleren und großen Maßstab**

Komponente	Volumen (Kit)	Zusammensetzung
Puffer (P1)	4 ml (Midi), 10 ml (Maxi)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 50–100 µg/ml RNase A
Lyse-Puffer (P2)	4 ml (Midi), 10 ml (Maxi)	200 mM NaOH, 1 % SDS
Neutralisationspuffer (P3)	4 ml (Midi), 10 ml (Maxi)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Equilibrierungspuffer (QBT)	4 ml (Midi), 10 ml (Maxi)	750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (v/v) Isopropanol; 0,15 % (v/v) Triton X-100
Waschpuffer (QC)	2 · 10 ml (Midi), 2 · 30 ml (Maxi)	1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (v/v) Isopropanol
Elutionspuffer (QF)	5 ml (Midi), 15 ml (Maxi)	1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 15 % (v/v) Isopropanol
Isopropanol	3,5 ml (Midi), 10,5 ml (Maxi)	
EtOH 70 %	2 ml (Midi), 5 ml (Maxi)	EtOH 70 % (v/v) in RW

Die DNA-Konzentration der gelösten Plasmide wurde bestimmt, durch Restriktionsverdau analysiert und die DNA bei –20 °C gelagert.

#### Kontrollanalyse durch spezifisches Fragmentieren mit Restriktionsenzymen

Für eine Analyse der in Bakterien vermehrten Plasmide wurde die DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, die enzymatisch gespaltenen DNA-Fragmente sowie die unverdaute Plasmid-DNA wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und Anzahl sowie Größe der Fragmente mit den durch *In-silico*-Restriktionsverdau ermittelten Eigenschaften abgeglichen. Ein beispielhafter Ansatz eines solchen Restriktionsverdaus ist in Tabelle 14 dargestellt. Die verwendeten Enzyme und Puffer sowie die durch *In-silico*-Restriktionsverdau ermittelten Größen der DNA-Fragmente sind Tabelle 15 zu entnehmen.

**Tabelle 14: Ansatz Kontrollspaltung von Plasmid-DNA**

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA	variabel (0,2 µg)
BSA 10x	1 µl
NEB-Puffer 10x	1 µl
Enzym 1	0,5 µl (> 0,2 U)
Enzym 2	0,5 µl (> 0,2 U)
RW	auf 10 µl auffüllen
Finales Volumen	10 µl

**Tabelle 15: Plasmide, Enzyme und Puffer sowie durch *In-silico*-Spaltung erwartete Fragmentgrößen**

Plasmid	Enzyme	Puffer	Fragmentgröße der <i>In-silico</i> -Spaltung
pCG1-H1(H1N1pdm09)-FLAG	PmeI, SphI	Cutsmart	1.734, 5.362 bp
pCG1-H3(H3N2)-FLAG	PmeI, SphI	Cutsmart	1.734, 5.362 bp
pCG1-H5(H5N1)-FLAG	PmeI, SphI	Cutsmart	1.728, 5.362 bp
pCG1-H7(H7N7)-FLAG	PmeI, SphI	Cutsmart	1.716, 5.362 bp
pCG1-H9(H9N2)-FLAG	PmeI, SphI	Cutsmart	1.716, 5.362 bp
pCG1-N1(H1N1pdm09)-FLAG	SphI, XbaI	Cutsmart	1.444, 5346 bp
pCG1-N1(H5N1)-FLAG	SphI, XbaI	Cutsmart	1.384, 5348 bp
pCG1-N2(H3N2)-FLAG	SphI, XbaI	Cutsmart	1.444, 5346 bp
pCAGGS-ZEBOV-GP	SalI	NEB 3	1.872, 4.944 bp
pCAGGS-ZEBOV-VP40	EcoRI	NEB 2	5.762 bp
pCAGGS-ZEBOV-VP40	EcoRI, XhoI	NEB 2	1.014, 4.748 bp
pCAGGS-ZEBOV-VP40	XhoI	NEB 2	5.762 bp

#### 4.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Alle Sequenzierungen wurden von der GATC Biotech AG (European Custom Sequencing Centre, Köln, Deutschland) nach der Sanger-Methode durchgeführt. Hierzu wurden für jeden *Primer*-Ansatz 5 µl der Matrizen-DNA mit einer Konzentration von 80–100 ng/µl für gereinigte Plasmid-DNA mit 5 µl des entsprechenden *Primers* in einer Konzentration von 5 µM gemischt. Für die Sequenzierung des ZEBOV-GP wurden nach der Amplifikation 20–80 ng/µl des gereinigten PCR-Fragments verwendet. Die Auswertung der Sequenzier-Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sequencher.

## 4.2 Zellkultur- und virologische Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit Zelllinien

#### Kultivierung

Die drei Zelllinien MDCK, Vero E6 und HEK-293 wurden bei –80 °C gelagert und in Dulbeccomodifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 5 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) und 200 mM L-Glutamin (DMEM<sup>+</sup>) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Subkultivierung und Aussaat wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit Trypsin-/EDTA-Lösung inkubiert.

#### Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die mit Trypsin/EDTA abgelösten Zellen einmal mit PBS gewaschen, 3 Minuten bei 500 · g pelletiert, in 80 % FKS und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und für 48 Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß auf –80 °C heruntergekühlt. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig auf 37 °C erwärmt, mit 1 ml vorgewärmten DMEM<sup>+</sup> mit

10 % FKS gespült, 3 Minuten bei 500 · g pelletiert und in adäquater Menge vorgewärmtem DMEM+ mit 10 % FKS ausgesät.

### Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 (v/v) mit Trypanblau gemischt und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die nicht angefärbten, lebenden Zellen konnten folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

### Proteinexpression mittels Transfektion und Lyse der Zellen

Für die Überprüfung der Proteinexpression klonierter Plasmide wurden 80 % konfluente MDCK- oder HEK-293-Zellen in 6-Loch-Platten mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. Hierzu wurde ein Ansatz mit 4 µg der Plasmid-DNA in 100 µl DMEM- (ohne Zusätze) sowie ein zweiter Ansatz des vierfachen Volumens 18 mM Polyethylenimin-Reagenz (PEI) in 100 µl DMEM- vorbereitet, 5 Minuten bei RT inkubiert und dann gemischt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei RT wurden die 200 µl Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und diese für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 250 µl RIPA-Puffer je Vertiefung und Inkubation bei 4 °C für 10 Minuten lysiert. Die Zell-Lysate wurden durch Zentrifugieren bei 21.000 · g und 4 °C für 20 Minuten von den Zelltrümmern befreit und bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Komponenten sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Komponenten für Transfektion und Lyse von Zellen zur Proteingewinnung**

Komponente	Zusammensetzung
PEI	18 mM in PBS
RIPA-Puffer (pH 7,1)	150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in RW

### VLP-Produktion und Reinigung

Für die Herstellung von ZEBOV-VLPs wurden HEK-293-Zellen in 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 80 % Konfluenz einem Mediumwechsel unterzogen. Für die Kotransfektion wurden jeweils 20 µg der Plasmide pCAGGS-ZEBOV-GP und pCAGGS-ZEBOV-VP40 mit dem vierfachen Volumen 18 mM PEI-Reagenz in DMEM ohne Zusätze gemischt und der Zellkulturflasche zugegeben. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium erneut gewechselt und die transfizierten Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert, bevor die VLP-haltigen Überstände geerntet und durch Zentrifugieren bei 2000 · g und 4 °C für 10 Minuten vom Zellresten gereinigt wurden. Die VLPs wurden anschließend durch Ultrazentrifugieren durch ein Kissen aus 20 % (w/v) Saccharose in PBS bei 100.000 · g und 4 °C für 3 Stunden pelletiert, in PBS (pH 7,4) gelöst und bei 4 °C gelagert.

## 4.2.2 Virologische Arbeiten

### Anzucht und Lagerung von Influenzaviren

Die pandemischen H1N1-Influenzaviren A/California/07/2009, A/Hamburg/05/2009, A/NRW/103/2009, A/MVP/06/2009, die saisonalen H1N1-Viren A/Brisbane/59/2007, A/Solomon Islands/03/2006, A/New Caledonia/20/99 und A/Puerto Rico/08/34 sowie die Influenza-Subtypen H3N2 A/Victoria/36/2011 und H5N1 A/Viet Nam/1194/2004-A/PR/8/34 wurden auf MDCK-Zellen in serumfreiem DMEM unter Zugabe von 0,75 µg/ml TPCK-Trypsin gezüchtet. Die Aktivierung des Oberflächenproteins HA bedarf einer proteolytische Spaltung des HA-Vorgängerproteins HA<sub>0</sub> in seine beiden Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>, welche in Zellkultur durch die Zugabe von TPCK-Trypsin initiiert wird (KLENK et al. 1975; LAZAROWITZ & CHOPPIN 1975). Zur Lagerung wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände geerntet und durch Zentrifugieren bei 2000 · g und 4 °C für 10 Minuten vom Zellresten gereinigt und bei -80 °C gelagert.

### Bestimmung von Virustitern der Influenzaviren

Zur Quantifizierung der Virustiter wurden MDCK-Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % mit einer seriellen Zehnfachverdünnungsreihe des Virus inokuliert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Platten mit PBS 1:3 (v/v) in RW verdünnt gewaschen, 15 Minuten an der Luft getrocknet und bei 65 °C für 8 Stunden hitzefixiert. Um infizierte Zellen sichtbar zu machen, wurde im Verhältnis 1:500 in PBS verdünntes polyklonales Frettchen-Serum gegen den entsprechenden Influenzavirus-Subtyp zugegeben und bei RT für 2 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBS für 10 Minuten wurde ein an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper gegen Frettchen-IgG in einer Verdünnung von 1:750 in PBS zugegeben und bei RT für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Immunfärbung durch Zugabe von 50 µl AEC-Färbelösung (Tabelle 17) je Vertiefung visualisiert. Eine Zugabe von 50 µl RW stoppte den Färbevorgang. Anschließend konnten die Platten im Dunkeln bei RT gelagert werden. Für jede Probe wurden Quadruplikate angesetzt und die Endpunkt-Antikörpertiter als geometrisches Mittel des Kehrwerts der letzten positiven Serumverdünnung angegeben.

**Tabelle 17: Zusammensetzungen der Komponenten für die AEC-Färbung**

Komponente	Zusammensetzung
AEC-Färbelösung	1 Tablette AEC in 3 ml DMSO gelöst, 300 µl gelöstes AEC-Substrat, 5 mL Natrium-Acetat-Puffer, 2,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5)	90,2 g/l Natriumacetat in RW, pH mit HCl eingestellt

### Arbeiten mit dem rekombinanten Virus der vesikulären Stomatitis VSVΔG/EBOV-GP

Das rekombinante Virus der vesikulären Stomatitis welches das GP des ZEBOV-Isolats Kikwit 1995 exprimiert (VSVΔG/EBOV-GP) (GEISBERT et al. 2008) wurde bei 37 °C auf Vero-E6-Zellen in

DMEM<sup>+</sup> gezüchtet. Der virushaltige Überstand wurde durch Zentrifugieren bei 2000 · g und 4 °C für 10 Minuten vom Zellresten gereinigt und mittels einstündiger Zentrifugieren bei 100.000 · g und 4 °C durch ein Kissen aus 20 % (w/v) Saccharose in PBS konzentriert. Das Pellet wurde in DMEM ohne Zusätze oder in PBS gelöst und bei -80 °C gelagert.

#### Bestimmung von Virustitern des VSVΔG/EBOV-GP

Der Virustiter wurde mittels Plaque-Test bestimmt und in plaquebildende Einheiten (PFU) angegeben. Hierzu wurden 200 µl einer seriellen 10-fach Verdünnungsreihe in die Vertiefung einer zu 90 % konfluenten 12-Loch-Platte mit Vero-E6-Zellen gegeben. Für die Überschichtung wurde 3 % (w/v) Avicel in PBS mit dem gleichen Volumen DMEM<sup>+</sup> gemischt. Nach einstündiger Inkubation der inokulierten Platten bei RT und leichtem Schwenken wurden der virushaltige Überstand abgenommen, 2 ml der 1,5 %-igen Avicel-Lösung zugegeben und die Platten anschließend bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Platten und damit die Avicel-Überschichtung nicht bewegen. Nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS mit 10 % (v/v) Kristallviolett, 12,5 % (v/v) Paraformaldehyd (PFA) und 25 % (v/v) MeOH sowie eine anschließende 30-minütige Inkubation bei RT, wodurch die Zellen fixiert und die Plaques sichtbar gemacht wurden.

#### Arbeiten mit den rekombinanten modifizierten Vacciniavirus Ankara

Die modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA), welche entweder das ZEBOV-GP des Isolates Guéckédou alleine (MVA/EBOV-GP) oder zusammen mit dem ZEBOV-Matrixprotein VP40 (MVA/EBOV-VP40/GP) exprimierten, wurden in der benötigten Konzentrationen und Quantität von Prof. Dr. Gerd Sutter und Dr. Asisa Volz (Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt (nicht publiziert). Im Wesentlichen wurden die MVA-Vektorimpfstoffe wie zuvor beschrieben durch Virusamplifikation in sekundären Hühnerembryofibroblasten vermehrt, durch Ultrazentrifugieren durch einen Kissen aus Saccharose-Kissen gereinigt, in TBS (pH 7,4) gelöst und bei -80 °C gelagert (KREMER et al. 2012). Das Virus wurde mittels Plaque-Test unter Verwendung einer MVA-spezifischen Immunfärbung titriert und die Titer in PFU angegeben.

### **4.3 Charakterisierung von Proteinproben**

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der mit einem FLAG-Epitop markierten HA- und NA-Proteine nach Transfektion von MDCK-Zellen mit den klonierten Plasmiden verifiziert. Weiter wurden die Reinheit und Qualität der VLP-Proben charakterisiert und im Zuge der Optimierung des Reinigungsverfahrens für Antiseren der Proteingehalt und die Reinheit der Intermediate und finalen Produkte analysiert.

### 4.3.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration der konzentrierten und in PBS gelösten VLP-Proben wurde kolorimetrisch unter Verwendung des Spektrophotometers bestimmt. Hierzu wurden gebrauchsfertiges Farbstoffreagens sowie der BSA-Standard des Kits Quick Start Bradford Assay von Bio-Rad nach Anweisung des Herstellers verwendet.

Die Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration von Seren und Intermediaten der Antikörperreinigung und -modifizierung wurde mittels detergenzkompatibler, kolorimetrischer Bestimmung mit dem Kit BCA Protein Assay von Pierce nach Herstellerangaben durchgeführt. Auch hier wurde die Standardkurve mit BSA kalibriert.

### 4.3.2 SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

#### Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Verifizierung der Proteinexpression und Qualität von Proteinproben wurden 10 µg Gesamtprotein der Proben entsprechend ihres Molekulargewichts von 25–250 kDa mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung von Gelen unterschiedlicher Konzentrationen in 10x SDS-Laufpuffer für 60–90 Minuten bei 160 V aufgetrennt. Für das Auftrennen der Proteine aus Zell-Lysaten oder gereinigte VLPs wurden SDS-PAGE-Gele bestehend aus einem 4 %-igen (v/v) Sammel- und einem 10 %-igen (v/v) Trenngel gegossen. Die Proben wurden durch Mischen mit 4x Laemmli-Ladepuffer mit 20 % β-Mecapto-EtOH reduziert und bei 75 °C für 10 Minuten denaturiert. Seren, Intermediate der Reinigung von Antiseren sowie die finalen IgG und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE-Gelen bestehend aus einem 4 %-igen (v/v) Sammel- und einem 8 %-igen (v/v) Trenngel aufgetrennt. Der verwendete 4x Laemmli-Ladepuffer enthielt kein β-Mecapto-EtOH, damit die Disulfidbrücken der Antikörper intakt blieben. Die Komponenten sind in Tabelle 18 beschrieben und die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 18: Komponenten der SDS-PAGE und ihre Zusammensetzungen**

Komponente	Zusammensetzung
Protein-Ladepuffer pH 8,3 (Laemmli) 4x, nicht reduzierend	250 mM Tris-HCl (pH6,8), 8 % SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Bromphenol-Blau in RW
Protein-Ladepuffer 4x, reduzierend	4x Laemmli + 20 % (v/v) β-Mecapto-EtOH
SDS Laufpuffer 10x	250 mM Tris, 1,9 M Glycine, 1 % (w/v) SDS in RW
Tris-HCl (pH 6,8)	1,5 M in RW
Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M in RW

**Tabelle 19: Zusammensetzung unterschiedlicher Gele für die SDS-PAGE**

SDS-Gele	Zusammensetzung
4 % Sammelgel (5 ml)	1,3 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 6,8), 0,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 50 µl 10 % (w/v) SDS, 5 µl TEMED, 25 µl APS, 3 ml RW
8 % Trenngel (10 ml)	2,5 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8), 2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 100 µl 10 % (w/v) SDS, 10 µl TEMED, 50 µl APS, 4,7 ml RW
10 % Trenngel (10 ml)	2,5 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8), 3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 100 µl 10 % (w/v) SDS, 10 µl TEMED, 50 µl APS, 4,1 ml RW

### Coomassie-Färbung von Proteinen

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt Proteine sequenzspezifisch. Eine Coomassie-Färbung der im Gel aufgetrennten Proteine ermöglicht eine Beurteilung des Proteingehalts und damit der Probenreinheit. Die Gele wurden durch Erhitzen in der Protein-Färbelösung A nach Fairbanks (Tabelle 20) angefärbt und die abgekühlten Gele durch mehrmaliges Erhitzen in frischem RW so lange entfärbt, bis diskrete blaue Proteinbanden sichtbar wurden.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Protein-Färbelösung**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fairbanks A	0,05 % (m/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure in RW

### 4.3.3 Western-Blot-Analyse

Für die Western-Blot-Analyse, eine spezifische Immunfärbung, wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran mit Methanol aktiviert und gemeinsam mit dem Proteingel zwischen in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Unter Verwendung des Transfersystems Trans-Blot SD Semy-Dry von Bio-Rad wurden die Proteine bei 12 V für 30 Minuten aus dem Gel in die Membran transferiert. Die freien Stellen der Membran wurden durch Inkubation für 60 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4 °C in milchpulverhaltigem Puffer blockiert. Nachdem die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, 2 Stunden bei RT mit dem in TBS-T verdünnten Primärantikörper inkubiert und erneut gewaschen wurde, folgte die einstündige Inkubation im HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei RT. Nach letztmaligem Waschen wurde die Membran nach Angaben des Herstellers im luminolhaltigen ECL-Reagenz von Pierce inkubiert. Das Luminol wird von der an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert, wodurch an den von den Antikörpern markierten Proteinbanden Lumineszenz entsteht. Diese wurde mit dem Lumineszenz-Dokumentations-Gerät MicroChemi 4.2 detektiert und fotografiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind in Tabelle 21 beschrieben.

**Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer für den Western-Blot**

Komponente	Zusammensetzung
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Protein-Transferpuffer (pH 8,3)	10 % (v/v) 1x Tris/Glycin-Puffer, 20 % (v/v) MeOH in RW
Waschpuffer TBS-T	100 ml 10x TBS (pH 7,4), 1 ml Tween-20 in 900 ml RW

## 4.4 *In-vivo*-Studien

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Frettchen stammten aus institutseigener Zucht, BALB/c-Mäuse wurden von Janvier S. A. S. und New-Zealand-White-Kaninchen von Charles River Deutschland gekauft.

### 4.4.1 Immunisierung, Blutentnahme und Infektion von Frettchen

Gemischtgeschlechtliche Gruppen adulter, für Influenza seronegativer Frettchen ( $n = 4$ ) wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen intramuskulär (i. m.) mit  $2 \mu\text{g}$  HA in  $200 \mu\text{l}$  des inaktivierten H1N1pdm09-Pandemieimpfstoffs in einem 1:1-Verhältnis (v/v) mit den Adjuvanzen MF59 (Novartis), AS03 (GSK) Diluvac Forte (Intervet) oder PBS geimpft. Für die Untersuchung der Antikörperantworten wurden 1, 3, 6, 11, 15 und 19 Wochen nach der Impfung Blutproben entnommen. Sechs Monate nach der zweiten Impfung wurden die immunisierten, sowie vier naive Tiere intranasal (i. n.) mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 (H1N1) infiziert. Gewichts- und Temperaturverlauf sowie der Gesundheitszustand wurden täglich kontrolliert und 4 Tage nach der Infektion wurden die Tiere mit 0,2 ml Sedin/Ketamin 1:1 (v/v) betäubt, final geblutet und Gewebeproben zur Bestimmung der Viruslast entnommen.

### 4.4.2 Immunisierung und Blutentnahme bei Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses von Mehrfachimmunisierungen auf die Entwicklung der Antikörperantworten wurden sechs Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse i. m. mit  $10 \mu\text{g}$  VLPs immunisiert. Eine Gruppe ( $n = 9$ ) wurde nur einmalig immunisiert, bei einer weiteren Gruppe ( $n = 9$ ) wurde nach 2 Wochen und bei einer dritte Gruppe ( $n = 9$ ) nach 2 und 4 Wochen die Immunisierung wiederholt. Für die Untersuchung der Wirkung von Adjuvanzen in Kombination mit VLPs auf die Antikörperreaktionen wurden Gruppen ( $n = 3$ ) sechs Wochen alter BALB/c-Mäuse dreimal im Abstand von 2 Wochen i. m. mit entweder  $10 \mu\text{g}$  VLP alleine oder in einem 1:1-Verhältnis (v/v) mit entweder dem Sigma-Adjuvant-System (Sigma), TiterMax Gold (Sigma) oder 2 % Alhydrogel (Invivogen) immunisiert. Für die Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Antigenexpressionssysteme auf die Antikörperreaktionen wurden die Tiere dreimal im Abstand von 2 Wochen i. m. mit  $2 \cdot 10^5$  PFU VSVΔG/EBOV-GP,  $1,5 \cdot 10^8$  PFU MVA/EBOV-GP oder MVA/EBOV-VP40/GP immunisiert. Der Gesundheitszustand wurde dreimal pro Woche kontrol-

liert und der Gewichtsverlauf dokumentiert. Für die Bestimmung der Antikörperlevel wurde eine Gruppe (n = 3) naiver Tiere nach 6 Wochen und jeweils drei Tiere jeder immunisierten Gruppe nach 2, 4 und 6 Wochen durch Herzpunktion final geblutet.

Um die Stabilität generierter Hyperimmunseren in einem xenogenen Transfermodell zu testen, bekamen drei Gruppen sechs Wochen alter BALB/c-Mäuse (n = 12) intraperitoneal (i. p.) 200 µl gereinigte IgG-Antikörpern der Maus oder des Kaninchens oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des Kaninchens mit einem definiertem Titer gegen ZEBOV-GP verabreicht. Eine Gruppe (n = 3) naiver Tiere wurde nach 9 Tagen und drei Tiere jeder Antiserumtransfergruppe an den Tagen 1, 3, 6 und 9 nach der Injektion mit 100 mg Ketamin/kg Körpergewicht und 0,4 mg Xylazin/kg Körpergewicht i. p. narkotisiert und durch Herzpunktion final geblutet.

#### **4.4.3 Hyperimmunisierung und Blutentnahme bei Kaninchen**

Für die Erzeugung größerer Volumina Hyperimmunserums wurden New-Zealand-White-Kaninchen dreimal im Abstand von 2 Wochen i. m. mit entweder  $1 \cdot 10^8$  PFU VSVΔG/EBOV-GP,  $5 \cdot 10^9$  PFU MVA/EBOV-GP oder 300 µg VLPs in einem 1:1-Verhältnis (v/v) mit dem Sigma-Adjuvant-System immunisiert. Zur Beobachtung der Antikörperentwicklung wurden an den Tagen 0, 14 und 28 Blutproben aus der Randohrvene entnommen. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich überwacht. Zur Gewinnung der Hyperimmunseren wurden die Tiere 35 Tage nach der ersten Immunisierung mit 50 mg Ketamin/kg Körpergewicht und 2,5 mg Xylazin/kg Körpergewicht subkutan (s. c.) narkotisiert und das größtmögliche Blutvolumen über die vordere Hohlvene (*Vena cava carnialis*) entnommen.

### **4.5 Reinigung und Modifikation von Antikörpern aus Hyperimmunseren**

#### **4.5.1 Serumgewinnung aus Vollblut**

Für die Serumgewinnung der Blutproben von Mäusen wurde das entnommene Blut in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen bei  $12.800 \cdot g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Die Blutproben von Frettchen und Kaninchen wurden mit 2-, 5- oder 9-ml-Serum-Vacutainerröhrchen entnommen und bei  $1.800 \cdot g$  für 15 Minuten zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei 4 °C für kurze Zeit aufbewahrt oder bei -20 °C eingelagert.

#### **4.5.2 Zwei-Schritt-Ammoniumsulfat-Präzipitation**

Für die Isolierung und Reinigung der IgG-Antikörper aus den Hyperimmunseren von Kaninchen wurde ein mehrstufiges Verfahren optimiert. Serumproteine mit einer geringeren Löslichkeit als IgG wurden unter Rühren durch tröpfchenweise Zugabe von 0,864 M Ammoniumsulfat bei einer Sättigung von 20 % präzipitiert und der Ansatz bei 4 °C für 6 Stunden

inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugieren bei  $3.000 \cdot g$  und  $4^\circ C$  für 20 Minuten entfernt und IgG-haltige Lösung auf eine Ammoniumsulfat-Konzentration von  $1,944 M$  eingestellt, um Proteine wie IgG zu präzipitieren, die bis zu einer Sättigung von 40 % ausfallen. Nach Inkubation bei  $4^\circ C$  für 6 Stunden wurde das ausgefallene IgG durch Zentrifugieren bei  $3.000 \cdot g$  und  $4^\circ C$  für 20 Minuten von den löslichen Proteinen getrennt und in  $0,1 M$  Tris-HCl im ursprünglichen Volumen der Serumprobe gelöst. Die optimalen Ammoniumsulfat-Sättigungen wurden im Zuge dieser Arbeit empirisch ermittelt.

#### 4.5.3 IgG-Affinitätschromatographie und Pufferaustausch

Für eine angeschlossenen IgG-Affinitätschromatographie wurde der Puffer des gelösten Präzipitats mittels Dialyse gegen TBS-Puffer (pH 7,4) ausgetauscht. Hierzu wurden Dialysekassetten mit einem Molekulargewichtsausschluss (MWCO) von 20 kDa in dem 300-fachen Puffervolumen der Probe verwendet. Die Dialyse wurde bei  $4^\circ C$  durchgeführt und der Puffer wurde nach 2,4 und 6 Stunden gewechselt, bevor der letzte Dialyseschritt über Nacht lief. Das IgG wurde unter Verwendung von Protein-A-Säulen gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit einigen Modifikationen isoliert. Kurz zusammengefasst: Das dialysierte Präzipitat (in der Regel 5 ml) wurde durch eine 1,2- und eine  $0,2\text{-}\mu m$ -Membran filtriert, mit dem doppelten Volumen Binde-/Waschpuffer gemischt und bei  $150 \cdot g$  und RT für 30 Minuten zentrifugiert, um das IgG an die nach Angaben des Herstellers aktivierte Protein-A-Säule binden zu lassen. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule geladen und ein zweites Mal zentrifugiert, bevor achtmal mit Binde-/Waschpuffer gewaschen und bei  $500 \cdot g$  für 3 Minuten zentrifugiert wurde. Das IgG konnte mittels Elutionspuffer von der Säule eluiert werden und der vorgelegte Neutralisationspuffer regulierte den pH auf ungefähr 7,5. Nach der Affinitätschromatographie war das IgG im doppelten Volumen des eingesetzten Präzipitats (also in der Regel 10 ml) gelöst. Maus-IgG wurde analog dem oben beschriebenen Protokoll mittels Protein-G-Säulen und den entsprechenden Puffern isoliert (Tabelle 22).

Für die Konzentration des gelösten IgGs auf das ursprüngliche Probenvolumen und den anschließenden Pufferaustausch wurden Vivaspin-Zentrifugensäulen mit einem MWCO von 50 kDa entsprechend den Vorgaben des Herstellers Sartorius verwendet. Das konzentrierte IgG wurde für die Immunisierung in PBS oder in  $20 mM$  Natriumacetatpuffer zur Herstellung von  $F(ab')_2$ -Fragmenten gelöst.

**Tabelle 22: Zusammensetzungen der Puffer für die IgG-Affinitätschromatographie**

Bezeichnung	Anwendung	Zusammensetzung
Binde-/Waschpuffer (pH 9)	Protein-A-Säule	1,5 M Glycin/NaOH, 3 M NaCl
Binde-/Waschpuffer (pH 7,4)	Protein-G-Säule	0,1 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl
Elutionspuffer (pH 2,5)	Protein-A/G-Säule	0,2 M Glycin/HCl
Neutralisationspuffer (pH 9)	Protein-A/G-Säule	1 M Tris/HCl, pH 9,0
TBS-Puffer	Proteinreinigung	100 ml 10x TBS (pH 7,4) in 900 ml RW

#### 4.5.4 Quantifizierung des Protein- und IgG-Gehalts

Neben der Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration von eingesetzten Seren, den Intermediaten der Antikörperreinigung und Modifikation sowie den Endprodukten unter Verwendung des detergentenkompatiblen BCA Protein Assay Kits von Pierce (siehe 4.3.1) wurde mittels ELISA-Sets von Bethyl die enthaltene Menge Kaninchen-IgGs nach Herstellerangaben in Serum und Intermediaten der Antikörperreinigung quantifiziert. Die Komponenten des Sets sind in Tabelle 23 aufgeführt. Jede Vertiefung der MaxiSorp 8-Loch-Streifen wurde mit 1 µg Beschichtungsantikörper in 100 µl Beschichtungspuffer bei RT für 1 Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer je Vertiefung wurde die Platte mit 200 µl Block-Puffer bei RT für 30 Minuten inkubiert und erneut fünffach gewaschen, bevor 100 µl der Standardreihe und der zu testenden Proben in Duplikaten überführt wurden. Für die Standardreihe von 7,8–500 ng/ml wurde das Kaninchen-Referenzserum in Probenpuffer verdünnt. Die zu testenden Proben wurden  $10^4$  bis  $10^7$  in Probenpuffer verdünnt, um zu ermitteln, welche Verdünnung in die Spanne des Standards passt. Nach Inkubation bei RT für 1 Stunde wurde die Platte fünffach gewaschen und mit 100 µl des 1:200.000 (v/v) in Probenpuffer verdünnten HRP-konjugierten Sekundärantikörpers je Vertiefung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach neuerlichem fünffachen Waschen wurde die Platte mit 100 µl der TMB-Lösung je Vertiefung gefärbt und die Farb-reaktion nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln durch Zugabe von 100 µl Stopplösung je Vertiefung beendet, bevor die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450\text{--}630$  nm gemessen wurde. Zur Quantifizierung der IgG-Konzentration wurde jede Probe in Duplikaten analysiert und vom Mittelwert der Leerwert ohne Serumzugabe subtrahiert.

**Tabelle 23: Komponenten für den ELISA zur Quantifizierung von Kaninchen-IgG**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Beschichtungsantikörper	1 mg/ml $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Fc (aus der Ziege)
Beschichtungspuffer (pH 9,6)	0,05 M Hydrogencarbonat
Blockpuffer (pH 8,0)	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA
Detektionsantikörper	1 mg/ml anti-Kaninchen-IgG-Fc, HRP-konjugierte (aus der Ziege)
Probenpuffer (pH 8,0)	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20
Referenzserum Kaninchen	6,3 mg/ml IgG
TMB-Färbelösung	Flüssigsubstrat TMB, fertige Färbelösung
Waschpuffer (pH 8,0)	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20
Stopplösung	0,18 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### 4.5.5 Enzymatische IgG-Spaltung mit Pepsin

Für die Erzeugung von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten wurde gereinigtes und in 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 4) gelöstes IgG in einem 1:40-Verhältnis (w/w) mit Pepsin (> 2.500 U/mg) gemischt und bei 37 °C für 6 Stunden inkubiert. Die optimale Inkubationszeit wurde zuvor empirisch ermittelt. Die enzymatische Spaltreaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens Tris-Base (pH 11,24) auf pH 7,4 eingestellt und damit gestoppt. Die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente (~ 88 kDa) wurden von nicht verdautem IgG (~ 150 kDa) mittels Vivaspin-Zentrifugensäulen mit einem 100 kDa MWCO getrennt. Anschließend wurden die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente durch eine Säule mit einem MWCO von 50 kDa vom Pepsin (~ 35 kDa) und den Spalt-Peptiden isoliert, auf das ursprüngliche Volumen konzentriert und in PBS gelöst.

## 4.6 Charakterisierung und Quantifizierung von Antikörpern

### 4.6.1 Quantifizierung totaler Antikörperlevel

#### Immunoperoxidase-Monolayer-Assay (IPMA)

Die Quantifizierung der totalen Antikörper gegen ein Antigen – der Gesamtantikörpertiter – wurde durch Serumtitration mit anschließender Immunfärbung auf antigenexprimierenden fixierten Zellen im 96-Loch-Format getestet. Für die Herstellung der Platten wurde die geeignete Zelllinie entweder mit einem Expressionsplasmid für das entsprechende Antigen transfiziert oder mit dem Virus infiziert, gegen welches die Antikörper getestet werden sollten.

Für die Transfektion der Influenza-Plasmide wurde ein vierfaches Volumen 18 mM PEI-Reagenz in 250  $\mu$ l DMEM<sup>-</sup> hergestellt, mit 20  $\mu$ g Plasmid-DNA in 250  $\mu$ l DMEM<sup>-</sup> gemischt und bei RT für 20 Minuten inkubiert. Der 500  $\mu$ l-Transfektionsansatz wurde zu 2x10<sup>6</sup> MDCK-Zellen 9,5 ml in DMEM<sup>+</sup> gegeben, mit 100  $\mu$ l je Vertiefung in eine 96-Loch-Platte eingesät und für 48 Stunden bei 32 °C inkubiert. Für die Infektion mit Influenzaviren wurden 80 % konfluente MDCK-Zellen in einer 96-Loch-Platte mit 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub> des Virus in DMEM<sup>+</sup> mit 0,75  $\mu$ g/ml TPCK-Trypsin infiziert und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. IPMA-Platten mit MDCK-Zellen wurden

einmal mit 1:3 (v/v) in RW verdünntem PBS gewaschen, bei RT getrocknet, für 8 Stunden bei 65 °C hitzefixiert und nach Bedarf bei -20 °C gelagert. Für die Herstellung von ZEBOV-GP-Platten wurden 80 % konfluente Vero-E6-Zellen mit 10<sup>2</sup> PFU VSVΔG/EBOV-GP in DMEM<sup>+</sup> infiziert. Nach Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 2 % PFA ersetzt. Die PFA-fixierten Platten wurden bei 4 °C gelagert.

50 µl serieller Zweifachverdünnungen der Seren in PBS wurden auf die antigenexprimierenden, fixierten Zellen gegeben und für 2 Stunden bei RT unter leichtem Wippen der Platte inkubiert. Nach einem Waschschriff für 10 Minuten mit PBS wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper gegen die Spezies des zu testenden Serums in einer Verdünnung von 1:750 in PBS zugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Ein bereits positiv getestetes Serum oder ein Primärantikörper gegen das FLAG-Epitop der Influenza-HA- und -NA-Proteine wurde in der Verdünnung 1:500 als Positivkontrolle verwendet; für die Negativkontrolle wurde eine Vertiefung allein mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 50 µl AEC-Färbelösung wie in Abschnitt 4.2.2 (Bestimmung von Virustitern der Influenzaviren) beschrieben. Für jede Probe wurden Quadruplikate angesetzt und die Endpunkt-Antikörpertiter als geometrisches Mittel des Kehrwerts der letzten positiven Serumverdünnung angegeben.

#### Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Antikörpertiter der Kaninchenseren gegen das gesamte Ebolavirus entsprechend der validierten Analyse humaner Seren wurde wie zuvor beschrieben von Dr. Verena Krähling (Philipps-Universität, Marburg) durchgeführt (AGNANDJI et al. 2016; KRÄHLING et al. 2016). Kurz zusammengefasst wurden 1:200-Verdünnungen der Hyperimmunsereen von Kaninchen sowie der gereinigten Produkte dieser auf ELISA-Platten gegeben, die mit dem inaktivierten ZEBOV-Isolat Makona 2014 beschichtet waren. Durch Zugabe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers und der TMB-Färbelösung wurde die Immunfärbung visualisiert und durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450\text{--}630$  nm quantifiziert. Die Mock-OD-Werte des Serums wurden durch Inkubation mit einem Nonsens-Antigen ermittelt. Zur Berechnung der OD-Werte wurde jede Probe in Duplikaten analysiert und vom Mittelwert die Mock-OD-Referenzwerte subtrahiert.

Für die Endpunkttitration der Antikörpertiter entsprechend der Quantifizierung mittels IPMA wurden serielle Zweifachverdünnungen der Proben auf ZEBOV-ELISA-Platten gegeben. Jede Probe wurde in Duplikaten titriert und die mittleren OD-Werte wie oben beschrieben korrigiert. Der *cut-off* des Tests wurde als OD-Mittelwert negativer Kaninchenseren plus die zehnfache Standardabweichung definiert und die Endpunkt-Antikörpertiter als Kehrwert der höchsten positiven Serumverdünnung angegeben, deren OD-Wert den *cut-off* überstieg.

#### 4.6.2 Quantifizierung funktionaler Antikörperlevel

##### Hämagglutinations-Hemm-Test (HHT)

Die Quantifizierung hämagglutinations-hemmender Antikörper gegen Influenzaviren wurde wie bereits beschrieben von der Abteilung für Virologie des Paul Ehrlich Instituts durchgeführt (CWACH et al. 2012). Kurz zusammengefasst wurden die Serumproben der Frettchen über Nacht mit dem dreifachen Volumen gelöster *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase (RDE) bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Inaktivierung bei 56 °C für 30 Minuten. Serielle Zweifachverdünnungen der Seren in PBS wurden in 96-Loch-Platten mit 4 HA-Einheiten des entsprechenden Influenzavirus in 25 µl gemischt und für 30–45 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 0,1 % (w/v) Meerschweinchen-Erythrozyten in Alsever's-Lösung und Inkubation für 1 Stunde bei RT konnten die Agglutinationsmuster abgelesen werden. Für jede Probe wurden Quadruplikate angesetzt und der HHT-Titer als geometrisches Mittel des Kehrwert der höchsten Serumverdünnung dargestellt, welche die Erythrozytenagglutination inhibiert.

##### Virus-Neutralisations-Test (VNT)

Zur Quantifizierung neutralisierender Antikörper gegen Influenzaviren wurden Frettchen-seren mit dem entsprechenden Virus gemischt und anschließend die Fähigkeit zur Infektion von Zellen überprüft. Hierzu wurden die Seren 1:10 (v/v) in RDE-Puffer verdünnt und serielle Zweifachverdünnungen in 96-Loch-Platten hergestellt. Nach Zugabe von 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub> des entsprechenden Virus in DMEM<sup>+</sup> mit 0,75 µg/ml TPCK-Trypsin zu jeder Verdünnung wurde die Platte für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10<sup>4</sup> MDCK-Zellen auf die Platte verteilt und diese bei 37 °C für 48–72 Stunden inkubiert wurden. Die Infektion der Zellen wurde mittels Sichtung eines zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) oder durch Fixieren der Platte mit anschließender IPMA-Färbung detektiert.

Neutralisierende Antikörpertiter gegen das ZEBOV-Isolat Mayinga 1976 wurden wie zuvor beschrieben von Dr. Olga Dolnik am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt (AGNANDJI et al. 2016). Kurz zusammengefasst wurden die Hyperimmunseren der Kaninchen sowie deren gereinigte Produkte bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Serielle Zweifachverdünnungen in DMEM<sup>+</sup> wurden mit 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub> des ZEBOV-Isolats Mayinga 1976 bei RT für 30 Minuten inkubiert bevor das Serum-Virus Gemisch zu 80 % konfluenten Vero-E6-Zellen im 96-Loch-Format gegeben wurde. Der CPE wurde nach 7 Tagen Inkubation bei 37 °C detektiert.

Bei jedem Test wurden eine Rücktitration des Virus sowie eine Serumkontrolle ohne Viruszugabe mitgeführt. Für jede Probe wurden Quadruplikate angesetzt und die VNT-Endpunkttiter als geometrisches Mittel des Kehrwerts der höchsten Serumverdünnung dargestellt, welche das Virus inhibiert.

### Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT)

Zur Bestimmung neutralisierender Antikörpertiter gegen ZEBOV-GP unter BSL-2-Bedingungen wurde ein PRNT unter Verwendung des VSVΔG/EBOV-GP etabliert. Hierzu wurden serielle Zweifachverdünnungen der hitzeinaktivierten Seren von Maus oder Kaninchen in 100 µl DMEM+ angefertigt, mit 10<sup>2</sup> PFU VSVΔG/EBOV-GP in 100 µl DMEM+ gemischt und bei RT für 30 Minuten inkubiert. Je 200 µl des Serum-Virus-Gemischs wurden in eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte mit 80 % konfluenten Vero-E6-Zellen gegeben und für 1 Stunde bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml einer 1,5 %-igen Avicel-Deckschicht wurden die Platten bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend die Plaques mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Bei jedem Test wurden eine Rücktitration des Virus, eine Serumkontrolle ohne Viruszugabe und eine positive Viruskontrolle mit Negativserum der gleichen Spezies mitgeführt. Jede Probe wurde in Duplikaten angesetzt und der PRNT<sub>50</sub>-Titer wurde als geometrisches Mittel des Kehrwerts der höchsten Serumverdünnung dargestellt, bei welcher die Anzahl der Plaques um 50 % relativ zur durchschnittlichen Anzahl der Plaques in der positiven Viruskontrolle reduziert wurde.

## 4.7 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Verwandtschaft repräsentativer H1N1-Influenzaisolate wurde auf Basis der HA-Nukleinsäure-Sequenz der in Tabelle 24 gelisteten Viren unter Verwendung der Software Clustal Omega analysiert und anschließend der phylogenetische Baum mit der Software FigTree erstellt.

**Tabelle 24: Viren und GenBank-Nummern der phylogenetischen Analyse der HA-Nukleinsäure-Sequenz**

Virus	GenBank-Nummer
A/California/072009	FJ969540
A/Brisbane/59/2007	CY163864
A/Solomon Island/3/2006	EU124177
A/New Calidonia/20/1999	EU103824
A/Puerto Rico/8/1934	CY009444
A/South Carolina/1/1918	AF117241
A/swine/Iowa/15/1930	EU139823

## 4.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Antikörperlevel erfolgte mit der Software GraphPad Prism 6. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; sofern das untere Ende der Standardabweichung bei einzelnen Messpunkten negative Werte angenommen hätte und damit nicht abbildbar gewesen wäre, wurden in der gesamten Grafik die Standardfehler als Fehlerbalken dargestellt. Hierzu wurden die Daten der nicht-parametrischen Titer entsprechend ihrer Skala

logarithmisch transformiert, mittels einfaktorieller ANOVA die Varianz auf Signifikanz geprüft und mit dem Tukey-Post-Hoc-Test der Vergleich zur jeweils angegebenen relevanten Kontrollgruppe durchgeführt. Die Stärke der Signifikanz ist jeweils mit dem entsprechenden  $p$ -Wert angegeben wobei  $p \leq 0,05$  signifikant,  $p \leq 0,01$  sehr signifikant,  $p \leq 0,001$  hoch signifikant bedeuten.

## 5 EIGENER BEITRAG

Diese Arbeit setzt sich aus zwei Projekten zusammen. Mein individueller Beitrag zu den jeweiligen Arbeiten ist im Folgenden dargestellt:

### a) Untersuchung der Wirkung squalenbasierender Adjuvanzien auf die Qualität und Spezifität der Antikörperantworten

Die von Dr. Ralf Wagner erhaltenen Rohdaten der funktionalen Antikörpertiter nach Immunisierung und Infektion wurden von mir ausgewertet und statistisch analysiert. Die phylogenetische Analyse der verschiedenen H1N1-Isolate basierend auf der HA-Nukleotid-Sequenz wurde von mir durchgeführt. Weiter habe ich die Rohdaten der von Dr. Edgar Holznagel erhaltenen Fieber- und Gewichtskurven ausgewertet sowie die von Kristin Pfeffermann erhaltenen Daten über die Titrations der Virusbelastung im respiratorischen Trakt nach der Infektion statistisch analysiert. Die Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft verschiedener H1-HA-Gele habe ich selbständig durchgeführt und ausgewertet. Für die Untersuchung totaler Antikörperreaktionen habe ich die Inflenzaviren A/California/07/2009 (H1N1), A/Victoria/36/2011 (H3N2) sowie das rekombinante PR8-Virus, welches die HA- und NA-Proteine des Isolates A/VietNam/1194/2004 (H5N1) exprimiert, *in vitro* kultiviert, die RNA isoliert und via reverser Transkriptions-PCR cDNA amplifiziert. Die HA-Gene der Influenza-Isolate A/chicken/Rostock/1934 (H7N7) und A/chicken/Beijing/2/1997 (H9N2) habe ich aus den Plasmiden von Dr. Ralf Wagner via PCR amplifiziert. Die ORFs der HA- und NA-Proteine von H1N1, H3N2 und H5N1 sowie diejenigen für das HA-Protein von H7N7 und H9N2 habe ich unter Anhängen eines FLAG-Epitops mit Unterstützung von Dr. Bevan Sawatsky in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und die Sequenzierung analysiert. Die anschließenden Experimente zur Ermittlung der totalen Antikörpertiter habe ich eigenständig durchgeführt, ausgewertet und statistisch analysiert. Als Erstautor der aus dem Projekt resultierenden Veröffentlichung „*Squalene-containing licensed adjuvants enhance strain-specific antibody responses against the influenza hemagglutinin and induce subtype-specific antibodies against the neuraminidase*“ habe ich die erste Fassung des Manuskriptes sowie die Abbildungen angefertigt und die Veröffentlichung gemeinsam mit Prof. Dr. Veronika von Messling und Dr. Ralf Wagner finalisiert.

### b) Entwicklung einer Immunisierungsstrategie für die schnelle Generierung therapeutischer Antisera unter niedrigen Biocontainment-Bedingungen

Im zweiten Teil dieser Arbeit war ich für die Konzeption aller Experimente verantwortlich. Ich habe mit den von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Stephan Becker erhaltenen Plasmiden die ZEBOV-VLPs produziert. Dies umfasste Transfektion, Ernte, Reinigung und Konzentration sowie die Charakterisierung. Eine Kinetik zur Analyse der optimalen

Transfektions- und Kultivierungsbedingungen habe ich gemeinsam mit Lea Constanze Belzig durchgeführt. Die *In-vivo*-Studie zur Effektivität der VLPs in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien in Mäusen habe eigenständig geplant. Bei der Durchführung unterstützte mich Lisa Walz. Das ebenfalls von Prof. Dr. Stephan Becker zur Verfügung gestellte Virus VSVΔG/EBOV-GP habe ich in unserem Labor kultiviert. Die MVA-Varianten wurden uns von unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Gerd Sutter und Dr. Asisa Volz zur Verfügung gestellt. Die *In-vivo*-Studien zum Vergleich der Antigenexpressions-Systeme in Mäusen und Kaninchen habe ich eigenverantwortlich geplant. Bei der Durchführung der Mausstudien hatte ich Unterstützung von Lisa Walz und Yvonne Krebs, bei den Kaninchenstudien haben mich Prof. Dr. Veronika von Messling, Dr. Roland Plesker und Lea Constanze Belzig unterstützt. Die Optimierung des Reinigungsverfahrens für die Antiseren habe ich eigenständig entwickelt, durchgeführt und analysiert, ebenso wie die anschließende Studie zur Stabilität der gereinigten IgG- und F(ab')<sub>2</sub>-Preparation *in vivo*. Alle Analysen der Maus- und Kaninchenserum wurden von mir geplant. Die Analysen totaler und funktionaler Antikörpertiter unter BLS-2-Bedingungen habe ich außerdem eigenständig durchgeführt. Die Analyse der Seren im BSL-4 Labor (ELISA und VNT) wurde von unseren Kooperationspartnern in Marburg, namentlich Dr. Verena Krähling und Dr. Olga Dolnik, durchgeführt. Alle Antikörperdaten wurden von mir ausgewertet und statistisch analysiert.

Als Erstautor der Veröffentlichung „*Generation of therapeutic antisera for acute viral infections*“ wurden die erste Fassung des Manuskripts sowie alle Abbildungen von mir angefertigt. Gemeinsam mit Prof. Dr. Veronika von Messling und den Koautoren befinden wir uns im Prozess der Finalisierung.

## 6 ERGEBNISSE

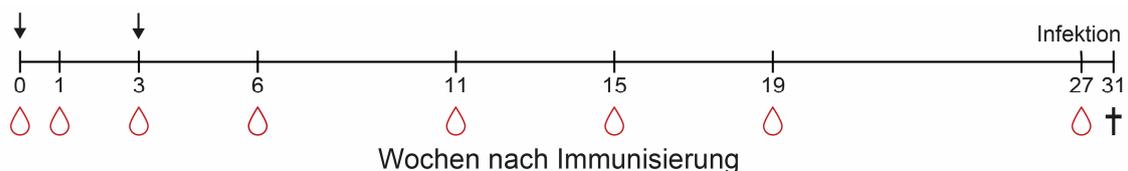
### 6.1 Untersuchung der Wirkung squalenbasierender Adjuvanzien auf die Qualität und Spezifität der Antikörperantworten

Pandemische Influenzaausbrüche stellen eine besondere Herausforderung dar. Auf der einen Seite besteht die Notwendigkeit einer raschen Bereitstellung zahlreicher Impfdosen, zugleich steht aber nur eine begrenzte Produktionskapazität für das Antigen eines pandemischen Influenzaimpfstoffes zur Verfügung. Zur Lösung dieses Problems wurde 2009 der Antigengehalt im Pandemieimpfstoff reduziert und zur Kompensation squalenbasierte Adjuvanzien zugesetzt. Der Einsatz solcher Adjuvanzien ist ein integraler Bestandteil der Strategie zum Einsparen von Antigen bei der Produktion von Influenza Pandemie-Impfstoffen (HESSEL 2009).

In diesem Projekt sollte die Wirkung der 2009 verwendeten, auf Squalen basierenden Adjuvanzien MF59 und AS03 auf die Amplitude und Spezifität der Antikörperreaktion gegen nah verwandte und gegen phylogenetisch weiter entfernte Influenzastämme untersucht und mit dem Schutz im Falle einer Infektion korreliert werden. Hierzu wurden Frettchen mit einer niedrigen Dosierung von 2 µg HA-Antigen des monovalenten Impfstoffes A/H1N1pdm09 in Kombination mit folgenden Adjuvanzien intramuskulär immunisiert:

- a) MF59, bestehend aus Squalen, Polysorbat 80 und Sorbitantrioleat (O'HAGAN et al. 2013),
- b) AS03, bestehend aus Squalen, Polysorbat 80 und Vitamin E (GARÇON et al. 2012),
- c) Diluvac Forte, einem für Veterinärimpfstoffe zugelassenen Adjuvans, bestehend aus Vitamin E (MARTELLI et al. 2011) oder mit
- d) PBS, als Kontrolle ohne Wirkverstärker.

3 Wochen nach der ersten Immunisierung erhielten die Frettchen eine Folgeimmunisierung mit der gleichen Impfstoff-Adjuvans-Kombination. Die Infektion mit dem homologen pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 erfolgte weitere 6 Monate später (Abbildung 12). Zur Verfolgung der Antikörperreaktionen wurde den Tieren regelmäßig Blut abgenommen und 4 Tage nach der Infektion die Viruslast der verschiedenen Gewebe des Respirationstrakts bestimmt.



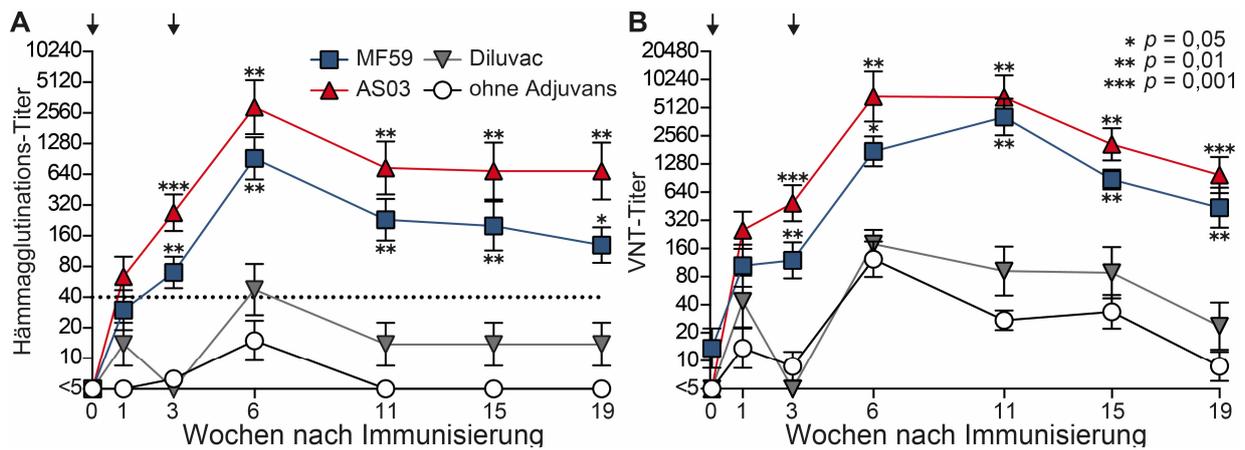
**Abbildung 12: Studienaufbau.** Schematische Darstellung des Studienverlaufs. Frettchen wurden im Abstand von 3 Wochen i. m. mit 2 µg des monovalenten Pandemieimpfstoffes H1N1pdm09 in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien immunisiert. Die Zeitpunkte der Immunisierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. 6 Monate nach der Folgeimmunisierung wurden die Tiere mit dem pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 infiziert. Die Krankheitsparameter wurden verfolgt und 4 Tage nach der Infektion die Viruslast der verschiedenen Gewebe des Respirationstrakts bestimmt. Die Zeitpunkte der Blutentnahme sind abgebildet.

### 6.1.1 Funktionale Antikörperantworten gegen das pandemische Isolat A/Hamburg/05/2009 (H1N1)

Der primäre auf Antikörpern basierende Schutz vor einer Influenzainfektion korreliert mit der Fähigkeit jener Antikörper, das für die Rezeptorbindung und das Eindringen in die Wirtszelle verantwortliche HA-Protein zu blockieren. Aufgrund der Eigenschaft des HA-Proteins, Erythrozyten zu binden, können HA-spezifische Antikörperlevel mit dem Hämagglutinationshemmtest (HHT) quantifiziert werden, wobei ein Antikörpertiter  $\text{HHT} \geq 40$  mit einer schützenden Immunität beim Menschen gleichgesetzt wird (JONG et al. 2003; COUDEVILLE et al. 2010). Eine universellere Methode zur Quantifizierung der Schutzwirkung ist der Virusneutralisationstest (VNT), bei welchem das Niveau aller Antikörper bestimmt wird, die die Fähigkeit zur Inhibition einer Infektion besitzen (TRUELOVE et al. 2016).

Bereits innerhalb einer Woche nach der ersten Immunisierung erreichten die durch die MF59- oder AS03-haltigen Influenzaimpfstoffe induzierten Antikörpertiter den als protektiv geltenden HHT-Schwellenwert von 40 (Abbildung 13 A). Zum Zeitpunkt der zweiten Immunisierung hatten sich die HHT-Titer beider Gruppen verdoppelt und lagen damit signifikant über dem Niveau, welches durch Immunisierung mit der Diluvac-Forte- oder PBS-Kombination induziert wurde. Drei Wochen nach der Folgeimmunisierung erreichten alle Gruppen ihre maximalen HHT-Titer, wobei die HHT-Werte der MF59- und AS03-Gruppen auf mehr als das Zehnfache angestiegen waren. Die Diluvac-Forte-Gruppe erreichte nur zu diesem Zeitpunkt den HHT-Schwellenwert von 40, während bei der Gruppe ohne Adjuvans selbst der maximale Titer unterhalb des Schwellenwerts blieb. In der Folgezeit stabilisierten sich die Antikörpertiter aller Gruppen für die nächsten drei Monate bei etwa 50% des Höchstwertes.

Auch die VNT-Titer der beiden mit den squalenbasierten Adjuvanzen immunisierten Gruppen führten bereits nach der ersten Immunisierung zu einem schnellen Anstieg der neutralisierenden Antikörpertiter (Abbildung 13 B). Zum Zeitpunkt der zweiten Immunisierung waren die VNT-Spiegel der Diluvac-Forte- und der PBS-Gruppe wieder bis auf das untere Detektionslimit gesunken. Die zweite Immunisierung war für diese beiden Gruppen notwendig, um einen weiterhin messbaren VNT-Titer zu induzieren. Fast alle Gruppen erreichten ihr maximales VNT-Level analog zum HHT drei Wochen nach der Folgeimmunisierung. Die einzige Ausnahme bildete die MF59-Gruppe, welche in der elften Woche ihren maximalen Titer erreichte. Die VNT-Titer sanken in der Folgezeit allmählich, wobei die durch squalenhaltige Adjuvanzen induzierten Titer kontinuierlich signifikant höhere Werte aufwiesen.



**Abbildung 13: Kinetik funktionaler Antikörperantworten nach Immunisierung mit dem pandemischen H1N1pdm09-Impfstoff in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien.** (A und B) Frettchen wurden zwei Mal im Abstand von 3 Wochen i. m. mit 2 µg des monovalenten Pandemieimpfstoffs H1N1pdm09 in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien immunisiert. Die Kinetik funktionaler Antikörper wurde mittels HHT (A) und VNT (B) gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Die gepunktete Linie in (A) zeigt den mit Immunschutz assoziierten HHT-Titer  $\geq 40$ . Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (n = 4) und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der jeweils verwendeten Testmethode. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zur Gruppe „ohne Adjuvans“ ermittelt und wird durch \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001 angezeigt.

Zusammenfassend hat die Kombination einer niedrigen Dosierung des monovalenten Impfstoffes A/H1N1pdm09 mit den squalenbasierenden Adjuvanzien die funktionalen Antikörpertiter gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 10- bis 100-fach erhöht, während das allein auf Vitamin E basierende Adjuvans Diluvac Forte maximal zu einer Verdopplung der Titer führte (Abbildung 13 A und B). Weiter zeigte sich, dass diese Adjuvanzien nicht nur die Amplitude der Antikörperreaktion erhöhten, sondern zugleich die Induktionszeit herabsetzten.

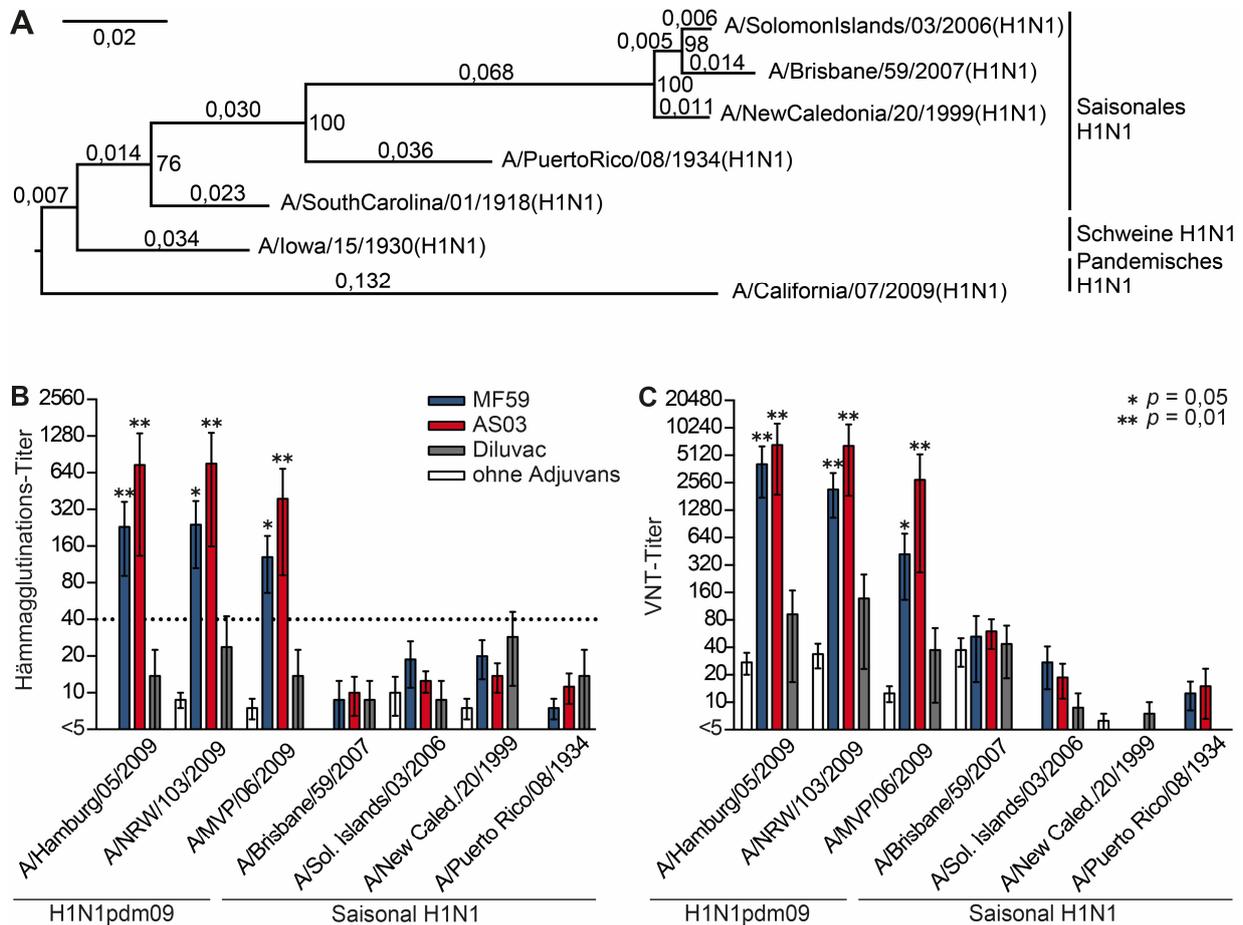
### 6.1.2 Funktionale Antikörperantworten gegen phylogenetisch nah verwandte pandemische und gegen ältere saisonale H1N1-Influenzaisolate

Auf Ebene der HA-Proteine zeigt das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 die größte phylogenetische Verwandtschaft zum klassischen H1N1-Schweinevirus (GARTEN et al. 2009). Erst danach folgen die humanen H1N1-Isolate aus dem frühen 20. Jahrhundert und am weitesten entfernt sind die jüngeren saisonalen Isolate, welche vor 2009 in der humanen Population zirkulierten (Abbildung 14 A).

Im nächsten Schritt untersuchten wir daher, ob die durch squalenhaltige Adjuvanzien induzierte Erhöhung der funktionalen Antikörperantwort spezifisch gegen das homologe Virus-Isolat gerichtet ist oder ob vielmehr eine breitere, auch gegen verwandte Virusisolate wirksame Immunantwort induziert wurde. Hierzu wurden die HHT- und VNT-Titer der Frettchen-Seren drei Monate nach der zweiten Immunisierung (Woche 19) gegen eine Reihe eng verwandter pandemischer, sowie weiter entfernt verwandter saisonaler humaner H1N1-Isolate ermittelt.

Die HHT wie auch die neutralisierenden Antikörpertiter gegen eng verwandte pandemische H1N1-Isolate aus 2009 waren innerhalb jeder Adjuvans-Impfstoff-Kombination vergleichbar,

aber auf unterschiedlichem Niveau. Die auf Squalen basierenden Adjuvanzen MF59 und AS03 induzierten durchweg signifikant höhere funktionale Titer (Abbildung 14 B und C). Keines der Adjuvanzen führte jedoch zu einer funktionalen Reaktivität gegen eines der älteren humanen H1N1-Isolate.

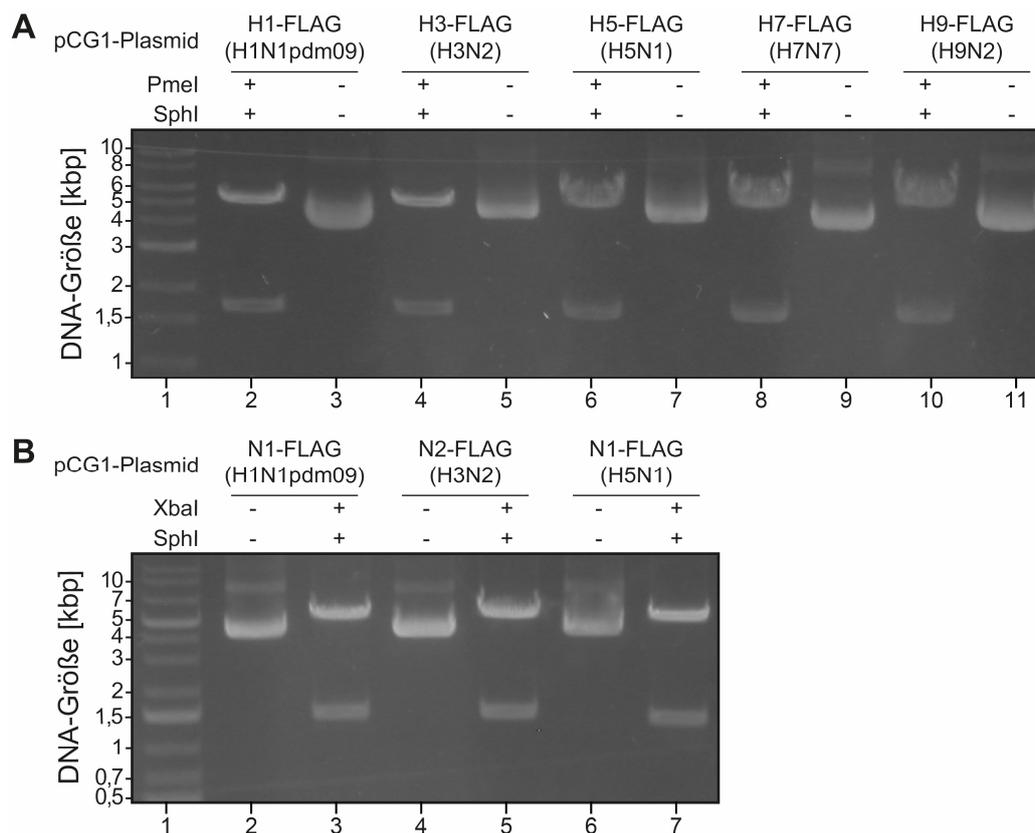


**Abbildung 14: Funktionale Antikörperantworten gegen unterschiedliche H1N1-Influenzaviren.** (A) Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener H1- HA-Gene. Für die Nukleinsäuresequenz der HA-Gene ausgewählter H1N1-Stämme wurde mit Clustal Omega in Seaview unter Verwendung des *Neighbor-Joining*-Algorithmus und mit 100 *Resamplings* nach dem Bootstrap-Verfahren eine zweigabelige Verwandtschaftsbeziehung berechnet. Die Sequenzen wurden entsprechend ihrer Nukleotidunterschiede im Abstand zueinander ausgerichtet. Die Beschriftungen der Knoten geben den Prozentsatz der Bootstrap-Replikate und die Beschriftung der Zweige den Wert der Verzweigungslänge an. HHT-Titer (B) und VNT-Titer (C) der Frettchen elf Wochen nach Immunisierung wurden gegen verschiedene Isolate der Influenzapandemie 2009 sowie ältere saisonale H1N1-Varianten getestet und als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Die gepunktete Linie in (A) zeigt den mit Immunschutz assoziierten HHT-Titer  $\geq 40$ . Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe ( $n = 4$ ) und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der jeweils verwendeten Testmethode. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zur Gruppe „ohne Adjuvans“ ermittelt und wird durch \* $p < 0,05$ ; und \*\* $p < 0,01$  angezeigt.

### 6.1.3 Klonierung von Plasmiden für die rekombinante Expression verschiedener HA- und NA-Proteine

Um die spezifischen Antikörper gegen ein HA- oder NA-Protein analysieren zu können, sollten diese rekombinant durch Transfektion von Zellen exprimiert werden. Hierzu wurden die entsprechenden HA- und NA-Gene entweder durch reverse Transkriptions-PCR aus viraler RNA

oder mittels PCR aus einem anderen Plasmid amplifiziert, mit einem FLAG-Epitop gekoppelt und in das eukaryotische Expressionsplasmid pCG-IRESzeomut (pCG1) kloniert. Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten, die Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmentgrößen mit den durch *In-silico*-Restriktionsverdau ermittelten Eigenschaften abgeglichen (Abbildung 15). Zur Sicherstellung der korrekten Nukleinsäuresequenz wurden alle Plasmide sequenziert.

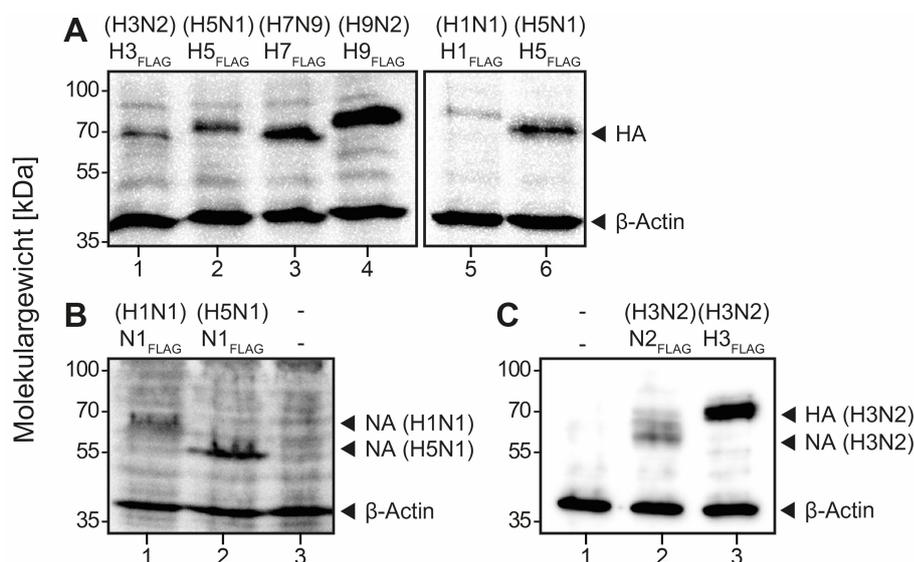


**Abbildung 15: Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente der HA- und NA-Plasmide.** (A und B) Die Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen in zwei DNA-Fragmente gespalten. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Enzym-Zugabe. 5 µl der Ansätze wurden mit 1 µl DNA-Ladepuffer gemischt, die DNA-Fragmente in einem Agarosegel (1 %) für 20 Minuten bei 100 V aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. (A) Die HA-Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen PmeI und SphI gespalten. Spalte 1: DNA-Größenmarker. Spalte 2: Restriktionsansatz pCG1-H1-FLAG (H1N1) mit Enzymen, Spalte 3: ohne Enzymzugabe. Spalte 4: Restriktionsansatz pCG1-H3-FLAG (H3N2) mit Enzymen, Spalte 5: ohne Enzymzugabe. Spalte 6: Restriktionsansatz pCG1-H5-FLAG (H5N1) mit Enzymen, Spalte 7: ohne Enzymzugabe. Spalte 8: Restriktionsansatz pCG1-H7-FLAG (H7N7) mit Enzymen, Spalte 9: ohne Enzymzugabe. Spalte 10: Restriktionsansatz pCG1-H9-FLAG (H9N2) mit Enzymen, Spalte 11: ohne Enzymzugabe. (B) Die NA-Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und SphI gespalten. Spalte 1: DNA-Größenmarker. Spalte 2: Restriktionsansatz pCG1-N1-FLAG (H1N1) mit Enzymen, Spalte 3: ohne Enzymzugabe. Spalte 4: Restriktionsansatz pCG1-N2-FLAG (H3N2) mit Enzymen, Spalte 5: ohne Enzymzugabe. Spalte 6: Restriktionsansatz pCG1-N1-FLAG (H5N1) mit Enzymen, Spalte 7: ohne Enzymzugabe.

Die Proteinexpression der HA- und NA-Proteine wurde mittels Immunfärbung transfizierter und fixierter Zellen (IPMA) bestätigt und die Proteingrößen durch Western-Blot-Analyse überprüft. Hierzu wurden MDCK-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Bei dem Typ-I-Transmembranprotein HA wurde das FLAG-Epitop C-terminal und beim Typ-II-Transmembranprotein NA N-terminal angehängt, so dass es in beiden Fällen intrazellulär

vorlag. Die Hitze-fixierung der transfizierten Zellen für die IMPA-Analyse führte zu einer Permeabilisierung der Zellmembran. Dadurch wurde eine Detektion des intrazellulären FLAG-Epitops ermöglicht. Das FLAG-Epitop wurde mit einem spezifischen Antikörper und – wenn vorhanden – die HA- und NA-Proteine selbst außerdem durch polyklonales Serum gegen das entsprechende Virus visualisiert.

Um das gesamte HA-Protein mittels spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Epitop in einer Western-Blot-Analyse visualisieren zu können (Abbildung 16), wurde auf die Zugabe von TPCK-Trypsin während der Transfektion und damit auf die proteolytische Spaltung des HA-Vorgängerproteins HA<sub>0</sub> in seine beiden Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> verzichtet (KLENK et al. 1975). Nach der proteolytischen Spaltung und Reduktion der Disulfidbrücken im Rahmen der verwendeten SDS-PAGE wäre anhand des C-terminalen FLAG-Epitops lediglich die HA<sub>2</sub>- und nicht mehr die HA<sub>1</sub>-Untereinheit visualisierbar.



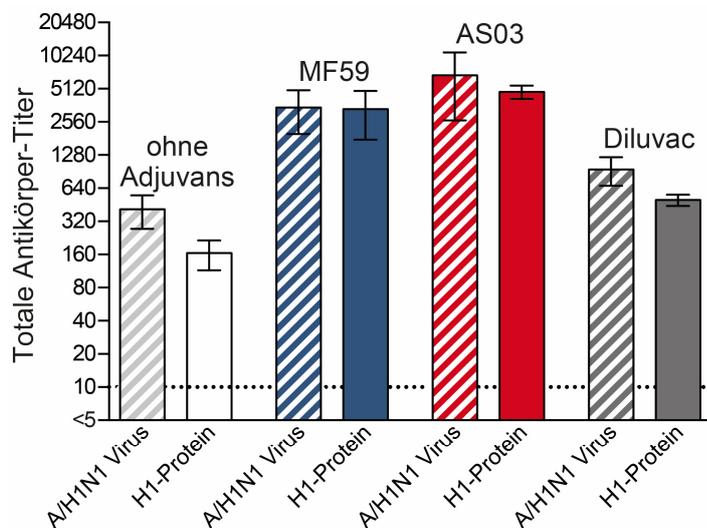
**Abbildung 16: Western-Blot-Analyse der in MDCK-Zellen exprimierten HA<sub>FLAG</sub>- oder NA<sub>FLAG</sub>-Proteine.** MDCK-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene HA- oder NA-Proteine transfiziert, ohne Zugabe von TPCK-Trypsin 2 Tage bei 32 °C inkubiert und die Zell-Lysate geerntet. 10 µg des Zell-Lysats wurden mittels SDS-PAGE (10 %) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend durch den Transfer auf eine PVDF-Membran mit angeschlossener Detektion des FLAG-Epitops der jeweiligen HA- und NA-Proteine visualisiert. (A) Spalte 1: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H3(H3N2)-FLAG; Spalte 2: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H5(H5N1)-FLAG; Spalte 3: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H7(H7N9)-FLAG; Spalte 4: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H9(H9N2)-FLAG; Spalte 5: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H1(H1N1)-FLAG; Spalte 6: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H5(H5N1)-FLAG. (B) Spalte 1: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-N1(H1N1)-FLAG; Spalte 2: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-N1(H5N1)-FLAG und Spalte 3: 10 µg Zell-Lysat nicht transfizierter Zellen. (C) Spalte 1: 10 µg Zell-Lysat nicht transfizierter Zellen, Spalte 2: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H3(H3N2)-FLAG und Spalte 3: 10 µg Zell-Lysat nach Transfektion mit pCG1-H3(H3N2)-FLAG.

Die Banden der HA-Vorläuferproteine (HA<sub>0</sub>) sind bei einem Molekulargewicht von ~ 70–85 kDa (LAZAROWITZ et al. 1973) und die Banden der NA-Proteine bei ~ 55–60 kDa (SHTYRYA et al. 2009) zu erwarten, wobei für das FLAG-Epitop ~ 1 kDa hinzukommt. Neben der subtypenspezifischen Unterschiede trägt insbesondere die Anzahl der N-Glykosylierungen zu den unter-

schiedlichen Molekulargewichten innerhalb der HA-Proteine (BUTT et al. 2010; KANAGARAJAN et al. 2012; TATE et al. 2014) und NA-Proteine (MAURER-STROH et al. 2009; CHEN et al. 2012a; HUANG et al. 2017) bei.

#### 6.1.4 Vergleich der totalen Antikörperantwort gegen das gesamte Virus und gegen das rekombinant exprimierte HA-Protein

Für den Vergleich der totalen Antikörper wurden die Seren gegen zwei Arten MDCK-Zellen getestet: Zellen, die mit dem pandemischen H1N1-Influenzavirus A/California/07/2009 infiziert wurden, wodurch sie alle Gene des Virus exprimieren, und solche, die alleine das entsprechende HA-Protein rekombinant exprimieren. Verglichen mit den funktionalen Antikörperantworten (Abbildung 14) waren die totalen Antikörpertiter für alle Gruppen mehr als zehnfach höher (Abbildung 17). Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigte Diluvac Forte vierfach höhere Titer, während die beiden squalenbasierten Adjuvanzien MF59 und AS03 mehr als fünfzehnfach höhere Antikörperlevel aufwiesen als der nicht adjuvantierte Impfstoff. Dies unterstreicht die bereits beschriebene Wirkung squalenhaltiger Adjuvanzien auf die Immunantwort gegen das homologe Antigen (Abbildung 17).

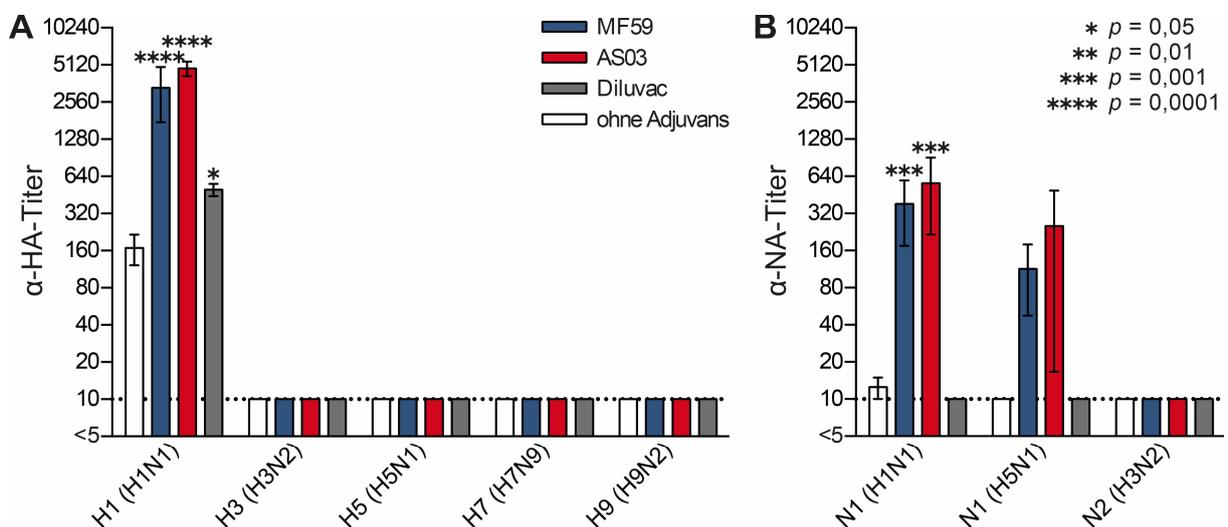


**Abbildung 17: Antikörperantworten gegen das Virus und das korrespondierende HA-Antigen im Vergleich.** Totale Antikörpertiter der Frettchenseren vier Tage nach der intranasalen Infektion mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 wurden mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (MF59: n = 3; übrige: n = 4) und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit der verwendeten Testmethode.

Alle Gruppen zeigten vergleichbare Antikörpertiter gegen die infizierten Zellen und gegen diejenigen Zellen, welche alleine das H1-Protein rekombinant exprimierten. Die Tiere wurden mit einem inaktivierten Influenzaimpfstoff immunisiert, der auf das HA-Protein standardisiert ist und außerdem eine nicht quantifizierte Menge des NA-Proteins enthält (SOEMA et al. 2015). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein großer Anteil der induzierten Antikörper gegen das HA-Protein gerichtet ist. Die Frage nach Antikörpern gegen das NA-Protein wird im folgenden Abschnitt untersucht.

### 6.1.5 Untersuchung kreuzreaktiver Antikörperantworten

Im nächsten Schritt wurden die totalen Antikörperantworten gegenüber dem homologen NA-Protein sowie die Kreuzreaktivität gegen heterologe HA- und NA-Proteine untersucht. Die HA-Proteine können basierend auf einer phylogenetischen Sequenzanalyse in zwei Gruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2) eingeteilt werden (RUSSELL et al. 2008), welche sich durch eine konservierte Sequenz in der Stammregion des HA-Proteins über die Influenzasubtypen hinweg auszeichnen (NABEL & FAUCI 2010), die als Epitope potentieller kreuzreaktiver Antikörper diskutiert werden (EKIERT et al. 2009; CORTI et al. 2010). Die Antikörperlevel wurden mittels MDCK-Zellen untersucht, welche unterschiedliche rekombinante HA-Proteine der Gruppe 1 (H1, H5 und H9) oder der Gruppe 2 (H3 und H7) (NABEL & FAUCI 2010) beziehungsweise das homologe NA-Protein oder NA-Proteine anderer Influenzasubtypen exprimieren. Während die squalenbasierten Adjuvanzien mehr als 15-fach höhere Antikörpertiter gegen das homologe H1-Protein induzierten als der nicht adjuvantierte Impfstoff (Abbildung 17 und Abbildung 18 A), zeigte keine Gruppe eine Reaktivität gegen das HA-Protein anderer Subtypen. Einzig die beiden mit squalenbasierten Adjuvanzien immunisierten Gruppen zeigten eine subtypenspezifische Antikörperantwort gegen das N1-Protein des homologen H1N1-Virus wie auch gegen das N1-Protein von A/VietNam/1203/2004 (H5N1), nicht aber gegen das NA-Protein anderer Subtypen (Abbildung 18 B).



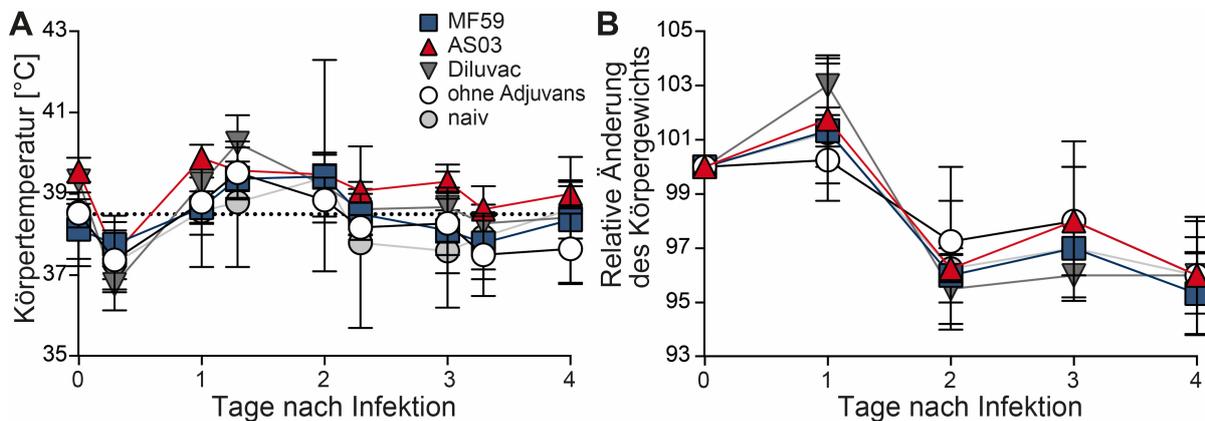
**Abbildung 18: Antikörpertiter gegen HA- und NA-Proteine unterschiedlicher Influenzaviren.** (A und B) Totale Antikörperantworten in Frettchenseren elf Wochen nach Immunisierung wurden gegen eine Auswahl rekombinanter HA- (A) und NA-Proteine (B) mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (n = 4) und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit der jeweils verwendeten Testmethode. Die statistische Signifikanz wurde jeweils im Vergleich zur Gruppe „ohne Adjuvans“ ermittelt und wird durch \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001 angezeigt.

Diese Experimente zeigen, dass squalenhaltige Adjuvanzien zu einem Anstieg der totalen und der funktionalen Antikörpertiter führen und darüber hinaus das Potential einer Induktion subtypen-spezifischer Antikörper gegen das stärker konservierte Oberflächenantigen NA tragen.

### 6.1.6 Krankheitsverlauf nach Infektion

Im nächsten Schritt sollte die Wirksamkeit der erzielten Antikörperlevel auf den Krankheitsverlauf ermittelt werden. Hierzu wurden die geimpften Frettchen wie auch eine Gruppe naiver Tiere sechs Monate nach der letzten Immunisierung mit dem pandemischen H1N1-Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 infiziert.

Unabhängig von der verwendeten Impfstoff-Adjuvans-Kombination war zwischen den immunisierten und den naiven Tieren kein unterschiedlicher Krankheitsverlauf – bezogen auf Fieberkurven und Gewichtverläufe – festzustellen (Abbildung 19 A und B).



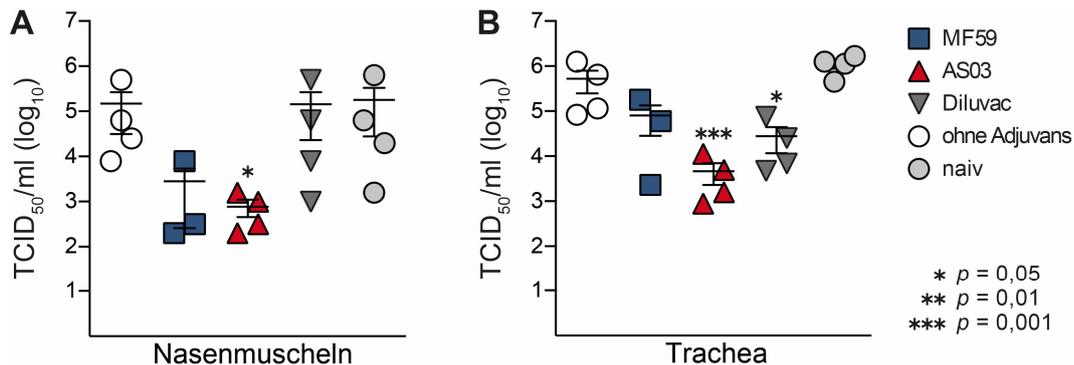
**Abbildung 19: Krankheitsverlauf immunisierter und naiver Frettchen nach einer Infektion mit dem pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009.** (A und B) Immunisierte und naive Frettchen wurden intranasal mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 infiziert. Zwei Mal täglich wurde die Körpertemperatur (A) der Tiere gemessen sowie das Gewicht anhand der relativen Änderung (B) überwacht. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (MF59: n = 3; übrige: n = 4) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die gepunktete Linie in (A) zeigt die normale Körpertemperatur gesunder Frettchen von 38,5 °C.

Einen Tag nach der Infektion zeigten alle Tiere eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur, die innerhalb eines weiteren Tages wieder zurückging. Mit dem Temperaturanstieg ging ein Gewichtsverlust von rund 4 % bei allen Tieren einher. Eines der Tiere aus der MF59-Gruppe verstarb aus Gründen, die nicht mit dem Experiment in Zusammenhang gebracht werden konnten.

### 6.1.7 Immunschutz nach Infektion

4 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast im oberen und unteren Respirationstrakt quantifiziert. Bei keinem der Tiere konnte hierbei das Virus aus dem Lungengewebe isoliert werden. Ein anderes Bild zeigte sich bei den Proben der oberen Atemwege, repräsentiert durch Nasenmuscheln und Luftröhre. In den mit squalenhaltigen Adjuvanzien immunisierten Gruppen

wurde eine 10- bis 100-fach geringere Viruslast als in naiven Tieren gemessen, wobei die Differenz bei der AS03-Gruppe statistisch signifikant war (Abbildung 20 A und B). Die Immunantwort der mit dem Vitamin-E-Adjuvans Diluvac Forte geimpften Gruppe hatte ebenfalls eine virusreduzierende Wirkung, welche in der Luftröhre signifikant wurde (Abbildung 20 B). Im Gegensatz hierzu konnte nach Immunisierung mit dem nicht adjuvantierten Impfstoff kein positiver Effekt auf die Virusbelastung des oberen Respirationstrakts festgestellt werden (Abbildung 20 A und B).



**Abbildung 20: Viruslast der oberen Atemwege immunisierter und naiver Frettchen 4 Tage nach einer Infektion mit dem pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009.** (A und B) Die Viruslast der Frettchen wurde 4 Tage nach der intranasalen Infektion mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009 in Nasenmuscheln (A) und Trachea (B) quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Bezogen auf die Wirkung squalenbasierter Adjuvanzen erlaubt die Studie die Schlussfolgerung, dass diese signifikant stärkere totale und funktionale stammsspezifische Antikörper-titer gegen das homologe HA-Protein sowie subtypenspezifische totale Antikörper gegen das NA-Protein induzieren und diese Antikörperantworten zu einer besseren Kontrolle der Virusreplikation in den oberen Atemwegen führen.

## 6.2 Entwicklung therapeutischer Antiseren gegen akute virale Infektionen

Gegen neue oder mit einer veränderten Antigenität wieder auftretende Pathogene besteht kein Immunschutz in der Bevölkerung. Influenza hat hierbei eine Sonderstellung, da im Falle einer Pandemie durch die routinemäßige, saisonale Impfstoffneuformulierung auf eine adaptierbare Produktionspipeline sowie gut etablierte Routineverfahren zur Zulassung zurückgegriffen werden kann. In den meisten Fällen können die Entwicklungszeiten für Impfstoffe oder antivirale Medikamente jedoch nicht Schritt halten mit dem Verlauf eines Ausbruchs neuartiger Virusinfektionen wie beispielsweise bei dem mit dem Schwere Akuten Respiratorischen Syndrom assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) (JIANG et al. 2005), dem Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) (MODJARRAD 2016) oder dem Zikavirus (MARQUES & BURKE 2018). Daher besteht ein dringendes Interesse an Behandlungsmöglichkeiten mit breiter antiviraler Aktivität sowie an robusten Entwicklungsstrategien für schnell verfügbare Notfalltherapien.

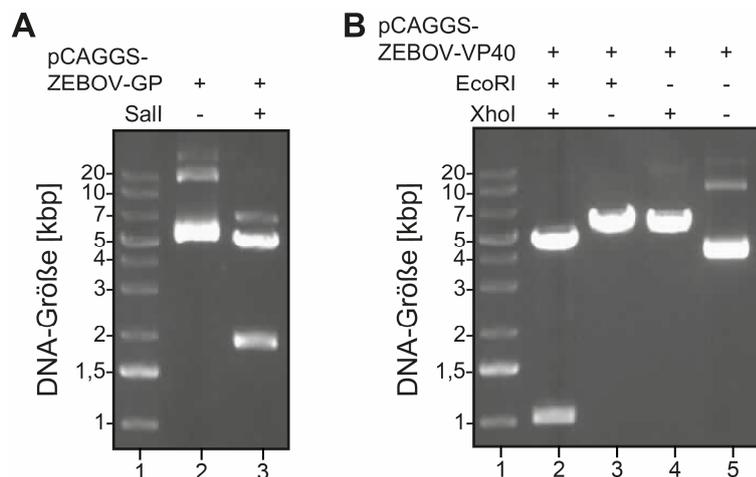
Die letzte Ebolavirus-Epidemie in Westafrika hat verdeutlicht, wie unvorbereitet die Menschheit sogar durch Ausbrüche bekannter Erreger getroffen werden kann. Da keine zugelassenen Impfstoffe oder Therapien zur Verfügung standen, waren Patientenisolation und Kontaktverfolgung die wichtigsten Maßnahmen, um den Ausbruch zu kontrollieren (WHO 2014). Gleichzeitig hat dieser Ausbruch das therapeutische Potenzial antikörperbasierter Therapien aufgezeigt und – mehr noch – das Interesse an diesem Behandlungsansatz erneut geweckt. Die passive Immuntherapie mit humanen Seren rekonvaleszenter Patienten wurde schon seit 1995 im Kampf gegen das Ebolavirus eingesetzt – jedoch mit unterschiedlichem Erfolg (MUPAPA et al. 1999; JÄHRLING et al. 2007; GRIENSVEN et al. 2016). Die Interpretation der Behandlungsdaten ist schwierig, da Antikörpertiter und neutralisierende Aktivität der eingesetzten Seren aufgrund fehlender diagnostischer Infrastruktur und bedingt durch den Zeitdruck nicht konsequent bestimmt wurden. Studien zur passiven Immuntherapie infizierter, nicht-humaner Primaten mit gereinigtem, hochtitrigem IgG gaben aber einen Hinweis darauf, dass die Level funktionaler Antikörper der entscheidende Faktor sein könnten (DYE et al. 2012). Weiter deutet der erfolgreiche Einsatz des monoklonalen Antikörper-Cocktails ZMapp darauf hin, dass es von Vorteil ist, mehrere Epitope des Antigens gleichzeitig anzugreifen (DAVIDSON et al. 2015). Ebendiesen Vorteil machen sich polyklonale Antiseren zu Nutzen; allerdings stehen gerade in frühen Stadien von Ausbrüchen nur selten Seren rekonvaleszenter Patienten zur Verfügung. Antiseren tierischen Ursprungs könnten hingegen in relativ kurzer Zeit produziert werden.

In diesem Teil der Arbeit sollen daher verschiedene Ansätze zur Produktion von Antiseren tierischen Ursprungs als schnell verfügbare Notfalltherapie gegen akute virale Infektionen ver-

glichen werden. Mit dem Ebolavirus als Modell-Erreger beinhaltet die Arbeit sowohl den Vergleich unterschiedlicher Immunisierungsstrategien als auch die Optimierung des nachfolgenden Reinigungsprozesses der Antikörperpräparate.

### 6.2.1 Produktion von ZEBOV-VLPs

Häufig ist die Arbeit mit unbekanntem Erregern, die Ausbrüche in der Population verursachen, Einrichtungen mit biologischen Sicherheitslaboren vorbehalten. Das schränkt die Skalierbarkeit der Antigenproduktion ein und erschwert die Immunisierung der Spendertiere für die Serumproduktion. Vor diesem Hintergrund wurde gezielt die Effektivität verschiedener Antigenexpressionsvektoren verglichen, die unter niedrigen biologischen Sicherheitsstandards verwendet werden können. VLPs sind eine effektive Vektorplattform, um Antigene in ihrer nativen Konformation zu präsentieren, und hierbei einfach zu handhaben, da sie kein genetisches Material enthalten und damit nicht replikationsfähig sind (NOAD & ROY 2003; WAHL-JENSEN et al. 2005). Für die Herstellung von ZEBOV-VLPs wurden uns Expressionsplasmide für das Glykoprotein ZEBOV-GP (pCAGGS-ZEBOV-GP) sowie das Matrixprotein ZEBOV-VP40 (pCAGGS-ZEBOV-VP40) von Prof. Stephan Becker zur Verfügung gestellt. Im ersten Schritt wurden die Plasmide zur Vermehrung re-transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und zur Kontrolle mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmentgrößen mit den durch *In-silico*-Restriktionsverdau ermittelten abgeglichen (Abbildung 21 A und B).

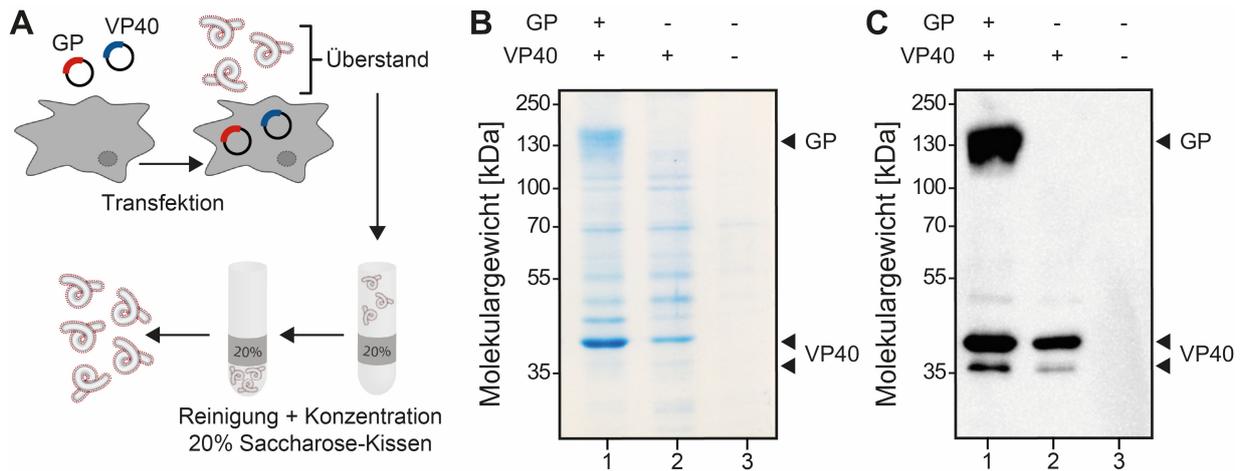


**Abbildung 21: Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente der ZEBOV-GP- und ZEBOV-VP40-Plasmide.** (A und B) Die Plasmide wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Enzymen. 5 µl beider Ansätze wurden mit 1 µl DNA-Ladepuffer gemischt, die DNA-Fragmente in einem Agarosegel (1 %) für 20 Minuten bei 100 V aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. (A) Spalte 1: DNA-Größenmarker, Spalte 2: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-GP mit dem Enzym Sall, Spalte 3: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-GP ohne Enzymzugabe. (B) Spalte 1: DNA-Größenmarker, Spalte 2: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-VP40 mit den Enzymen EcoRI und XhoI, Spalte 3: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-VP40 mit dem Enzym EcoRI, Spalte 4: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-VP40 mit dem Enzym XhoI, Spalte 5: Restriktionsansatz pCAGGS-ZEBOV-VP40 ohne Enzymzugabe.

Im nächsten Schritt wurde die Produktion der ZEBOV-VLPs in Zellkultur betrachtet. Hierzu wurden humane HEK-293-Zellen mit Plasmiden ko-transfiziert, die für das Matrixprotein (VP40) sowie die membrangebundene Form des Glykoproteins in voller Länge (GP) des ZEBOV-Stammes Mayinga 1976 kodieren (WAHL-JENSEN et al. 2005). Die VLP-haltigen Überstände der Zellkultur wurden anschließend über 4 Tage bei 32 °C oder 37 °C inkubiert. Von den 32 °C-Ansätzen wurden alle 24 und 48 Stunden, von den 37 °C-Ansätzen alle 12, 24 und 48 Stunden die VLP-haltigen Überstände durch frisches Medium ersetzt und die geernteten Überstände anschließend durch Ultrazentrifugation gereinigt sowie konzentriert.

Zunächst wurde die totale Proteinkonzentration der Proben bestimmt, wobei alle bei 32 °C exprimierten VLP-Proben eine Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml nicht überschritten. Ebenso erreichte keine der im 12-Stunden-Intervall entnommenen Proben eine messbare Proteinkonzentration. Anders sah es bei den übrigen auf 37 °C inkubierten VLP-Proben aus: Bei einer Ernte nach 24 Stunden wurde eine totale Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml und nach einer weiteren Ernte 24 Stunden später erneut von 0,47 mg/ml erreicht. Wurden die Überstände im Intervall von 48 Stunden geerntet, so zeigte die erste VLP-Probe einen Proteingehalt von 0,2 mg/ml und die zweite Ernte erreichte eine Konzentration von rund 0,9 mg/ml.

Aufgrund der ermittelten Proteinkonzentrationen wurde eine Inkubationstemperatur von 32 °C nicht weiter verfolgt. Basierend auf diesem Experiment wurden die Zellen für alle weiteren Experimente bei 37 °C inkubiert, das Medium am Tag nach der Transfektion gewechselt und weitere 48 Stunden später die VLPs geerntet (Abbildung 22 A). Die Reinheit der VLP-Proben wurde in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen überprüft. Die Hauptbanden befinden sich bei etwa 40 kDa, kurz unterhalb von 70 kDa – ungefähr im Bereich von BSA mit einer erwarteten Größe von ~ 66 kDa – sowie in einigen Proben bei 130 kDa (Abbildung 22 B). Die Western-Blot-Analyse identifizierte die beiden zwischen 35 und 55 kDa wandernden Banden als zwei Isoformen von VP40, welche aufgrund eines zweiten Startcodons strangaufwärts exprimiert werden (JASENOSKY et al. 2001) und die bei 130 kDa laufende Bande als GP1, das große Spaltfragment von GP (WAHL-JENSEN et al. 2005; ALEKSANDROWICZ et al. 2011) (Abbildung 22 C).

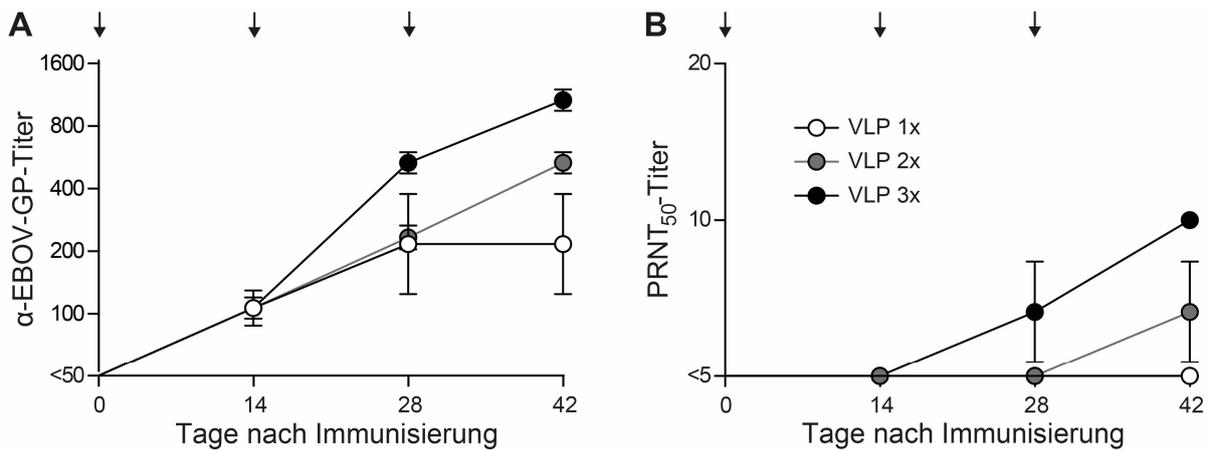


**Abbildung 22: Herstellung von ZEBOV-VLPs.** (A) Schematische Darstellung der VLP-Produktion. Nach der Transfektion humaner HEK-293-Zellen mit den Plasmiden, welche für das ZEBOV Matrixprotein VP40 und das Antigen GP kodieren, wird der VLP-haltige Überstand mittels Ultra-zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen gereinigt und konzentriert. Die Analyse der VLP-Präparate erfolgt durch Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE (10 %) unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Färbung mit Coomassie (B) oder durch den Transfer auf eine PVDF-Membran mit angeschlossener Detektion der Proteine durch polyklonales Ziegenserum gegen ZEBOV. Spalte 1: 10 µg Probe nach Transfektion mit ZEBOV VP40 und GP; Spalte 2: 10 µg Probe nach Transfektion mit ZEBOV VP40 und Spalte 3: 10 µl Negativkontrolle (Überstand nicht transfizierter Zellen).

## 6.2.2 Einfluss des Immunisierungs-Designs auf VLP-induzierte Antikörpertiter

Um den Einfluss wiederholter Immunisierungen auf die Antikörperlevel und -qualität zu ermitteln, wurden BALB/c-Mäuse i. m. mit 10 µg VLP immunisiert. Weitere Tiere wurden nach 2, respektive nach 2 und 4 Wochen erneut immunisiert. 2 Wochen nach jeder Immunisierung wurden die Antikörpertiter gegen das ZEBOV-GP untersucht.

Nach einmaliger Immunisierung stieg der Antikörpertiter bis zur vierten Woche an und stagnierte anschließend (Abbildung 23 A). Eine zweite und dritte Immunisierung führte zu einer Verdopplung respektive zu einem fünffach höheren Antikörperlevel gegen das ZEBOV-GP. Eine neutralisierende Aktivität konnte erstmals vier Wochen nach der zweiten Immunisierung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass zur Induktion einer neutralisierenden Antikörperantwort eine wiederholte Immunisierung notwendig ist (Abbildung 23 B).



**Abbildung 23: Antikörperantworten gegen ZEBOV-GP sowie neutralisierender Titer nach ein, zwei oder drei Immunisierungen mit ZEBOV-VLPs in Mäusen.** (A und B) Mäuse wurden i. m. mit 10 µg VLPs immunisiert (VLP 1x). Eine Gruppe erhielt zusätzlich eine zweite Dosis (VLP 2x), eine andere Gruppe eine zweite und dritte Dosis (VLP 3x) im Abstand von jeweils 2 Wochen. Die Zeitpunkte der Immunisierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Kinetik der Antikörperentwicklung gegen ZEBOV-GP wurde mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter (A) und die neutralisierenden Antikörper gegen VSVΔG/EBOV-GP (B) als 50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert des Serums quantifiziert. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (n = 3) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der verwendeten Testmethode.

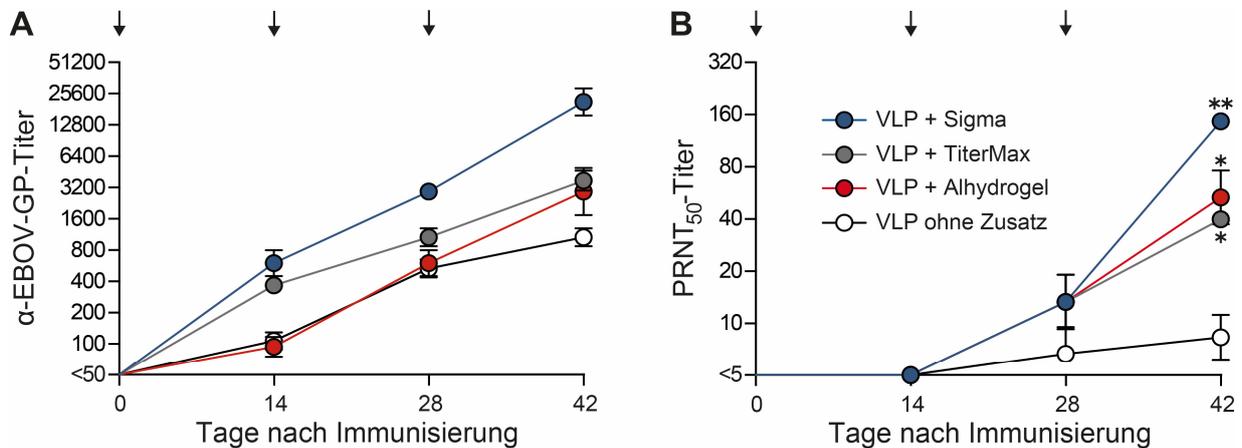
Zusammenfassend hat sich die dreimalige Immunisierung im Abstand von je 2 Wochen als bestes Immunisierungsprotokoll erwiesen.

### 6.2.3 Wirkung von Adjuvantien auf die Entwicklung antigenspezifischer und neutralisierender Antikörper

Im folgenden Schritt sollte geprüft werden ob die Immunogenität – und damit das Potential zur Induktion hoher neutralisierender Antikörpertiter – der nicht replikationsfähigen VLPs durch Kombination mit Adjuvantien gesteigert werden kann. Basierend auf den Resultaten des ersten Abschnitts dieser Arbeit wurde mit dem Sigma-Adjuvans-System (Sigma-Adjuvans) ein squalenhaltiges Wasser-in-Öl-Adjuvans gewählt. Als Alternative zum hochgradig toxischen Freund-Adjuvans wurde die Öl-in-Wasser-Emulsion TiterMax Gold (TiterMax) gewählt, sowie 2%iges Alhydrogel als Äquivalent zu Aluminiumhydroxid – einem der ältesten zugelassenen Adjuvantien in humanen Impfstoffen. BALB/c-Mäuse wurden i. m. mit 10 µg VLP alleine oder in Kombination mit einem der Adjuvantien dreimal im Abstand von 2 Wochen immunisiert und die Antikörpertiter im Serum jeweils 2 Wochen nach jeder Immunisierung ermittelt.

Alle Gruppen zeigten zwei Wochen nach der initialen Immunisierung die ersten Antikörper gegen das ZEBOV-GP, wobei die Titer in der Sigma- und TiterMax-Gruppe etwa zehnfach höher waren als nach der Immunisierung mit VLPs alleine (Abbildung 24 A). Mit wiederholten Immunisierungen nahmen die Antikörpertiter aller Gruppen zu, wobei die Gruppe der VLPs ohne Zusatz von Adjuvantien letztlich mit den Alhydrogel- und TiterMax-Gruppen vergleichbare Titer erreichte. Einzig in der Sigma-Gruppe waren die Antikörpertiter in den finalen Seren etwa zehnfach höher. Die ersten neutralisierenden Antikörper konnten nach der zweiten

Immunisierung detektiert werden (Abbildung 24 B). Die finalen Seren aller VLP-Adjuvans-Kombinationen zeigten signifikant gesteigerte neutralisierende Antikörperlevel gegenüber einer Immunisierung mit VLPs alleine, wobei das auf Squalen basierende Sigma-Adjuvans einen 20-fach höheren Titer erreichte.



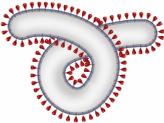
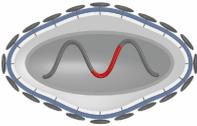
**Abbildung 24: Antikörperantworten nach VLP-Immunisierung in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen.** (A und B) Mäuse wurden drei Mal im Abstand von 2 Wochen i. m. mit 10  $\mu$ g VLPs alleine oder in Kombination mit entweder dem Sigma-Adjuvans-System, TiterMax Gold oder Alhydrogel immunisiert. Die Zeitpunkte der Immunisierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Kinetik der Antikörperentwicklung gegen ZEBOV-GP wurde mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter (A) und die neutralisierenden Antikörper gegen VSV $\Delta$ G/EBOV-GP (B) als 50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert des Serums quantifiziert. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe (n = 3) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der verwendeten Testmethode. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zur Gruppe „VLP ohne Zusatz“ ermittelt und wird durch \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01 angezeigt.

Zusammenfassend konnte die Beobachtung aus der ersten Studie bestätigt werden, wonach squalenhaltige Adjuvanzen sowohl totale wie auch funktionale Antikörpertiter signifikant erhöhen können. Die Induktion einer robusten, neutralisierenden Antikörperantwort durch wiederholte Immunisierungen mit nicht-replikationsfähigen VLPs ist demnach möglich.

#### 6.2.4 Vergleich verschiedener Antigenexpressionssysteme

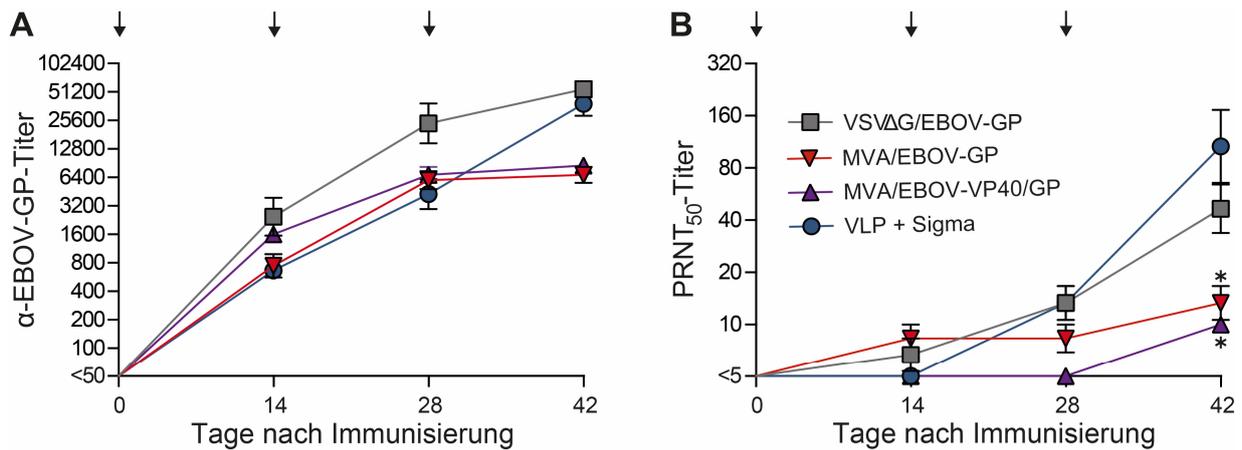
Als nächstes wurde die Bedeutung der *De-novo*-Antigensynthese für die Induktion hoher funktionaler Antikörpertiter untersucht. Als Referenz dienten die durch VLP-Adjuvans-Kombination induzierten Titer. Hierzu wurden zwei weitere rekombinante virale Vektoren zur Immunisierung herangezogen: Einerseits wurde das MVA verwendet, welches humane Zellen zwar einmalig infiziert, aber in diesen keine neuen infektiösen Partikel bildet. Das Einfügen einer Expressions-Kassette für entweder das ZEBOV-GP alleine oder in Kombination mit dem VP40 führt zur einmaligen *De-novo*-Synthese (noch nicht publiziert). Andererseits wurde das replikationskompetente VSV verwendet, bei dem auf genomischer Ebene das homologe VSV-Glykoprotein gegen das Glykoprotein von ZEBOV ausgetauscht wurde. Dadurch tragen die Partikel das ZEBOV-GP auf der Oberfläche und das Protein wird außerdem *de novo* in infizierten

Zellen exprimiert (GEISBERT et al. 2008) (Abbildung 25). Für den Vergleich der Antikörperantworten wurden Mäuse dreimal in zwei-wöchentlichen Intervallen immunisiert.

		
<b>virus-like particles</b>	<b>MVA/EBOV-GP</b>	<b>VSVΔG/EBOV-GP</b>
nicht replikationsfähig	nicht replikationsfähig in humanen Zellen	replikationsfähig
kein gentechnisch veränderter Organismus	<i>De-novo</i> -Antigenexpression	<i>De-novo</i> -Antigenexpression
native virale Struktur		Antigen wird auf der Oberfläche präsentiert

**Abbildung 25: Eigenschaften der verwendeten Expressionssysteme für das ZEBOV-GP im Überblick.** Schematische Darstellung des auf viralen Proteinen basierenden VLP sowie der beiden viralen Vektoren MVA/EBOV-GP und VSVΔG/EBOV-GP mit ihren jeweiligen Eigenschaften.

Alle Gruppen zeigten nach der ersten Immunisierung einen raschen Anstieg der Antikörper gegen das ZEBOV-GP (Abbildung 26 A). Nach der zweiten und dritten Immunisierung stiegen die Antikörpertiter der VLP-Adjuvans-Kombination und des VSVΔG/EBOV-GP weiter bis zu einem vergleichbaren Level an, während die Titer der beiden MVA-Varianten nach der dritten Immunisierung auf einem konstanten, niedrigeren Niveau stagnierten. Eine neutralisierende Aktivität wurde in der MVA/EBOV-GP-Gruppe nach der ersten und in der MVA/EBOV-VP40/GP nach der zweiten Immunisierung gemessen. Diese steigerte sich im weiteren Verlauf des Experimentes geringfügig bis zu einem PRNT<sub>50</sub>-Titer von 10 (Abbildung 26 B). VSVΔG/EBOV-GP induzierte ebenfalls bereits nach einmaliger Immunisierung neutralisierende Antikörper, welche bis zu einem PRNT<sub>50</sub>-Titer von 40 im finalen Serum anstiegen. Im Gegensatz hierzu waren die ersten neutralisierenden Antikörper für die VLP-Adjuvans-Kombination erstmalig nach der zweiten Immunisierung quantifizierbar, erreichten aber im finalen Serum mit rund 100 den höchsten PRNT<sub>50</sub>-Titer. Dies weist darauf hin, dass eine *De-novo*-Expression des Antigens für die Induktion hoher funktionaler Antikörper nicht essenziell ist.



**Abbildung 26: Vergleich der Antikörperantworten gegen ZEBOV-GP sowie neutralisierender Titer nach Immunisierung mit unterschiedlichen Antigen-Expressionssystemen in Mäusen.** (A und B) Mäuse wurden drei Mal im Abstand von 2 Wochen i. m. mit entweder  $2 \cdot 10^5$  PFU VSVΔG/EBOV-GP,  $1,5 \cdot 10^8$  PFU MVA/EBOV-VP40/GP oder MVA/EBOV-GP, oder aber mit  $10 \mu\text{g}$  VLP-Adjuvans-Kombination immunisiert. Die Zeitpunkte der Immunisierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Kinetik der Antikörperentwicklung gegen ZEBOV-GP wurde mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter (A) und die neutralisierenden Antikörper gegen VSVΔG/EBOV-GP (B) als 50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert des Serums quantifiziert. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert der Gruppe ( $n = 3$ ) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der verwendeten Testmethode. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zur VLP-Adjuvans-Kombination „VLP + Sigma“ ermittelt und wird durch \*  $p < 0,05$  angezeigt.

### 6.2.5 Skalierung der Antiserenproduktion in Kaninchen und Test der *In-vitro*-Effektivität gegen das ZEBOV

Das Immunisierungsprotokoll wurde in Kaninchen wiederholt, um ein größeres Volumen des Antiserums für die Optimierung des Reinigungsprozesses zu erzeugen. Gleichzeitig sollte auf diese Weise ein Hinweis auf die Skalierbarkeit der Antiseren-Produktion gewonnen werden. Jeweils zwei Tiere wurden mit den viralen Vektoren MVA/EBOV-GP oder VSVΔG/EBOV-GP oder aber der VLP-Adjuvans-Kombination drei Mal im Abstand von je 2 Wochen immunisiert, bevor 1 Woche nach der dritten Immunisierung das finale Serum genommen wurde. Ein mit VSVΔG/EBOV-GP immunisiertes Kaninchen verstarb aus Gründen, die nicht mit dem Experiment zusammenhingen. Um die Titer in einen klinisch relevanten Kontext setzen zu können, wurden Antikörpertiter der finalen Seren auch gegen das Wild-Typ ZEBOV quantifiziert. Der Gesamtiter gegen ZEBOV gerichteter Antikörper wurde in einem EBOV-ELISA untersucht, der während des westafrikanischen Ausbruchs 2014 zur Bestimmung der Antikörperlevel verwendet wurde (KRÄHLING et al. 2016). Die In-Vitro-Effektivität der Seren zur Neutralisierung des Wildtypvirus wurde im VNT mit dem ZEBOV-Stamm Mayinga 1976 quantifiziert. Dieser Stamm wurde auch in der klinischen Studie zur Beurteilung der Antikörperantworten von Impfungen eingesetzt, die mit VSVΔG/EBOV-GP immunisiert wurden (AGNANDJI et al. 2016).

Das Gesamtbild der Antikörperentwicklung war mit den zuvor in Mäusen beschriebenen Verläufen vergleichbar und zeigte geringfügig höhere Titer bei den finalen Kaninchenseren (Tabelle 25 und Tabelle 26, untere Reihe). Die OD-Werte der Kaninchenseren im etablierten EBOV-ELISA reichten von 3,5 bis zum oberen Detektionslimit von 4 (Daten nicht gezeigt) und

waren mit hochtitrigen Seren von Rekonvaleszenten vergleichbar, nachdem diese vollständig virusfrei waren (KRÄHLING et al. 2016). Weiter zeigte eine Endpunkttitration der Kaninchenseren vergleichbare Antikörpertiter gegen das gesamte ZEBOV und gegen ZEBOV-GP exprimierende Zellen (Tabelle 25). Die im VNT gegen ZEBOV Mayinga 1976 gemessenen neutralisierenden Titer der Kaninchenseren waren mehr als 20-fach höher als die durchschnittlichen Titer mit VSVΔG/EBOV-GP geimpfter Patienten (AGNANDJI et al. 2016) (Tabelle 26). Um die Korrelation zwischen den Surrogat-Tests und den offiziellen diagnostischen Tests zu validieren, wären umfassende Untersuchungen notwendig. Dennoch kann festgehalten werden, dass die hier beobachtete Vergleichbarkeit ein Indiz dafür ist, dass die Surrogat-Tests für erste Analysen geeignet sind.

**Tabelle 25: Antikörperantworten von Kaninchenseren gegen ZEBOV oder ZEBOV-GP exprimierende Zellen, induziert durch unterschiedliche Antigen-Expressionssysteme.**

	VSVΔG/EBOV-GP (n = 1)	MVA/EBOV-GP (n = 2)	300 µg VLPs Adjuvans (n = 2)
α-EBOV Endpunkt-Titer [Log <sub>2</sub> ] (ELISA)	16	14	15
α-EBOV-GP Endpunkt-Titer [Log <sub>2</sub> ] (IPMA)	16	15	16

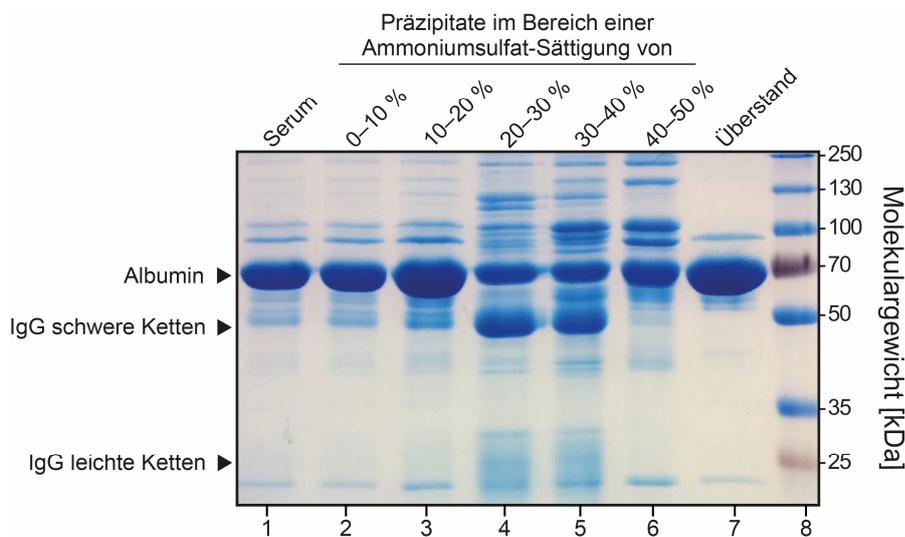
**Tabelle 26: Antikörperantworten von Kaninchenseren gegen das ZEBOV oder VSVΔG/EBOV-GP, induziert durch unterschiedliche Antigen-Expressionssysteme.**

	VSVΔG/EBOV-GP (n = 1)	MVA/EBOV-GP (n = 2)	300 µg VLPs Adjuvans (n = 2)
α-EBOV Endpunkt-Titer [Log <sub>2</sub> ] (VNT)	10	7	10
α-VSVΔG/EBOV-GP Titer [Log <sub>2</sub> ] (PRNT <sub>50</sub> )	8	5	8

### 6.2.6 Optimierung der Antikörper-Reinigung und Bestimmung der Rückgewinnungsrate neutralisierender Antikörper

Die Gabe von xenogenem Serum oder dessen Bestandteilen kann akute Nebenwirkungen wie den anaphylaktischen Schock oder verzögert auftretende Folgen wie die Serumkrankheit mit sich bringen. Der Grund hierfür kann entweder die Reaktion des Immunsystems mit den xenogenen Serumproteinen oder die Komplementaktivierung durch den Fc-Anteil der IgG-Proteine sein (SILVA et al. 2016). Um das Risiko solcher unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren, sollte ein Reinigungsverfahren für die IgG-Antikörper oder – nach deren Modifizierung – für die resultierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente entwickelt werden. Im ersten Schritt wurde daher die Reduktion des Anteils ungewollter Serumproteine durch eine Salzfällung der IgG-Antikörper unter Verwendung von Ammoniumsulfat durchgeführt. Für das

Präzipitationsverfahren wurde Kaninchenserum mit 0,432 M Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 10 % angereichert und anschließend die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugieren isoliert. Schrittweise wurde so die Sättigung des Überstandes durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf 0,864 M (20 %), 1,296 M (30 %), 1,728 M (40 %) und 2,16 M (50 %) erhöht und wie beschrieben die ausgefallenen Proteine nach jedem Präzipitationsverfahren isoliert. Für die Bestimmung der Sättigung, bei der die IgG-Antikörper ausfallen, wurden die Proteinkonzentration des Serums, der Präzipitate und des Überstandes mittels BCA-Kit bestimmt, bevor 10 µg Protein jeder Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht wurden (Abbildung 27).

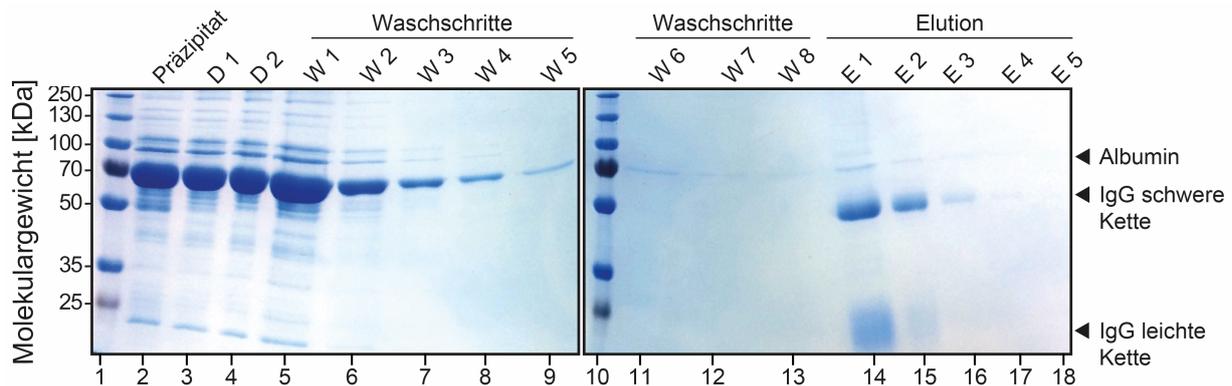


**Abbildung 27: Analyse der schrittweisen Ammoniumsulfat-Präzipitation von Serumproteinen.** 10 µg Protein des Ausgangsserums, der Präzipitatintermediate bei unterschiedlichen Ammoniumsulfat-Sättigungen sowie des Überstandes nach dem letzten Präzipitationsschritt wurden mittels SDS-PAGE (10 %) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spalte 1: initiales Serum, Spalte 2: Präzipitat bei 0-10 % Sättigung, Spalte 3: Präzipitat bei 10-20 % Sättigung, Spalte 4: Präzipitat bei 20-30 % Sättigung, Spalte 5: Präzipitat bei 30-40 % Sättigung, Spalte 6: Präzipitat bei 40-50 % Sättigung, Spalte 7: Überstand bei 50 % Sättigung, Spalte 8: Molekulargewichtsreferenz [kDa].

Durch die Verwendung eines reduzierenden Protein-Ladepuffers wurden die Disulfidbrücken des IgG gespalten, wodurch der Antikörper in seine beiden leichten Ketten mit je ~ 25 kDa und seine beiden schweren Ketten mit je ~ 50 kDa zerlegt wurde. Die Proteinbanden mit den entsprechenden Molekulargewichten der leichten und schweren Ketten waren in den Fraktionen mit einer Ammoniumsulfat-Sättigung von 20-30 % und 20-30 % zu detektieren. Für künftige Fällungen wurde eine zweistufige Präzipitation durchgeführt: Zuerst wurden leicht lösliche Proteine, die bis zu einer Sättigung von 20 % ausfallen, durch Zugabe von 0,864 M Ammoniumsulfat präzipitiert und isoliert, bevor in einem zweiten Schritt durch die Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration auf 1,728 M das IgG bei einer Sättigung von 40 % aus dem Überstand präzipitiert wurde.

Als weitere Methode zur Reduktion des Anteils ungewollter Serumproteine wurde eine Affinitätsreinigung mittels Protein-A herangezogen, an welches der Fc-Teil des Kaninchen-IgGs

bindet. Die Verwendung filtrierten Serums führte zu einem Verstopfen der Protein-A-Säule. Daher wurde die zweistufige Ammoniumsulfat-Präzipitation der IgG-Affinitätsreinigung vorgeschaltet. Hierzu wurden die präzipitierten Proteine gegen TBS-Puffer dialysiert. Im Zuge des Optimierungsprozesses wurden Proben von allen Intermediaten genommen und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Eine solche Analyse ist beispielhaft in Abbildung 28 gezeigt. Die Proteinkonzentrationen der Intermediate lagen teilweise unter dem Messlimit, daher wurden 10 µl jeder Probe geladen.

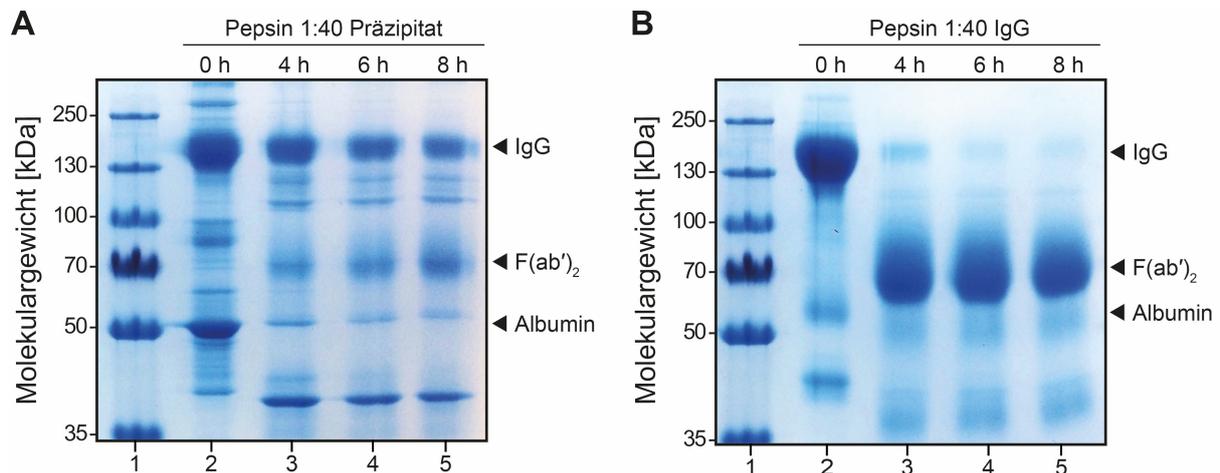


**Abbildung 28: Analyse der Intermediate einer IgG-Affinitätschromatographie.** 10 µl jeder Probe wurden mittels SDS-PAGE (10 %) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spalte 1: Molekulargewichtsreferenz [kDa], Spalte 2: dialysiertes Präzipitat (20–40 % Ammoniumsulfat-Sättigung) 1:2 (v/v) in Bindepuffer verdünnt, Spalte 3: Durchfluss nach erstmaligem Laden der Probe, Spalte 4: Durchfluss nach Laden des ersten Durchflusses, Spalten 5–9: Durchfluss nach Waschschr. 1–5, Spalte 10: Molekulargewichtsreferenz [kDa], Spalten 11–13: Durchfluss nach Waschschr. 6–8, Spalten 14–18: Durchfluss nach Elution 1–5.

Es erwies sich als vorteilhaft, das Präzipitat im doppelten Volumen Bindepuffer zu verdünnen, um die IgG-Konzentration der Probe auf die maximale Kapazität der Säule von 20 mg einzustellen. Die Auswertung der elektrophoretisch aufgetrennten Proben verschiedener Optimierungsvorgänge zeigte, dass acht Waschschr. notwendig waren, um den Albumin-Anteil in den IgG-Fractionen zu minimieren. Außerdem konnte IgG nach dem ersten und dem zweiten Elutionsvorgang nachgewiesen werden. Durch Molekulargewichtsausschluss-Säulen (MWCÖ-Säulen) konnten die beiden IgG-Fractionen vereint und auf das ursprüngliche Volumen der Probe konzentriert werden. Eine Quantifizierung der Antikörpertiter gegen das ZEBOV-GP der einzelnen Proben mittels IPMA zeigte, dass es vorteilhaft war, den Durchfluss erneut auf die Säule zu geben, nachdem die Probe zum ersten Mal durch die Säule zentrifugiert wurde (Abbildung 28, Spalte 3). So konnte die IgG-Ausbeute nach Affinitätsreinigung in Form des Anteils in der Säule gebundenen IgGs erhöht werden.

Die Immunogenität von Antisera tierischen Ursprungs kann außerdem durch die Abspaltung des konservierten Fc-Teil des IgG-Antikörpers verringert werden (COCHRANE & KOFFLER 1973). Durch proteolytische Spaltung mittels Pepsin kann die antigen-bindende Domäne in Form des F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes vom Fc-Teil abgespalten, isoliert und gereinigt werden

(NELSON 2010). Pepsin, ein proteolytisches Enzym des Magens mit einem Molekulargewicht von  $\sim 35$  kDa, verdaut Proteine, indem es innere Peptidbindungen auf beiden Seiten aromatischer Säurereste hydrolysiert. Es hat seine höchste Aktivität in einem pH-Bereich von 1,5–3, bei einem pH  $> 6$  wird das Enzym irreversibel inaktiviert. Das  $F(ab')_2$ -Fragment des IgG-Antikörpers bleibt bei einer proteolytischen Spaltung mit Pepsin intakt (KILLION & HOLTGREWE 1983; NELSON 2010). Hierzu wurde im nächsten Schritt die proteolytische Spaltung im kleinen Maßstab untersucht. Hierzu wurden die gleiche Proteinkonzentrationen von Präzipitat und affinitätsgereinigtem IgG mittels MWCO-Säulen in 20 M Acetatpuffer aufgenommen, in einem 1:40-Verhältnis (w/w) von Pepsin zu Protein gemischt, in 500- $\mu$ l-Ansätze auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt und inkubiert. Vor Beginn der Inkubation sowie nach 4, 6 und 8 Stunden wurde jeweils ein Ansatz durch Zugabe von Tris-Base auf einen pH von 7,4 eingestellt, um das Pepsin zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben mittels nicht reduzierender SDS-PAGE untersucht (Abbildung 29 A und B).

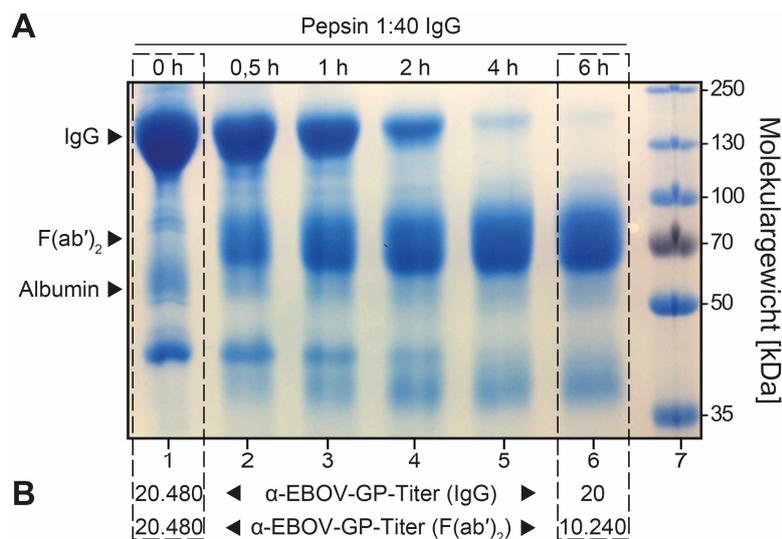


**Abbildung 29: Analyse der proteolytischen Spaltung von Präzipitat und IgG durch Pepsin.** (A und B) Molekulargewichtsreferenz [kDa] (Spalte 1) sowie inaktivierte Proben zu Beginn der Inkubationszeit (Spalte 2) und nach vier (Spalte 3), sechs (Spalte 4) beziehungsweise acht (Spalte 5) Stunden. 10  $\mu$ g jeder Probe wurden mittels SDS-PAGE (8 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. (A) Proben der proteolytischen Spaltung des Präzipitats nach zweistufiger Ammoniumsulfat-Fällung. (B) Proben der proteolytischen Spaltung des mittels Protein-A-Säule affinitätsgereinigten IgGs nach zweistufiger Ammoniumsulfat-Fällung.

In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE-Analyse werden die Disulfidbrücken des IgG-Antikörpers nicht aufgebrochen, sodass Kaninchen-IgG bei  $\sim 150$  kDa zu detektieren ist. Die elektrophoretische Auftrennung des Präzipitat-Pepsin-Ansatzes (Abbildung 29 A) zeigt zu allen Zeitpunkten eine deutliche Bande, die mit dem Molekulargewicht von IgG korrespondiert und im Laufe der Zeit leicht an Intensität verliert. Dies lässt auf einen Abbau des Proteins schließen. Gleichzeitig ist nach 4 Stunden Inkubation erstmalig eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von  $\sim 70$  kDa zu sehen, deren Intensität mit steigender Inkubationszeit zunimmt. Dieser Zusammenhang lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um das entstehende  $F(ab')_2$ -Fragment handelt. Eine Bande, die etwas unterhalb des Molekulargewichts von Albumin ( $\sim 60$  kDa) zu

sehen ist, wird im Verlauf der Inkubation zunehmend schwächer, was ebenfalls auf einen Abbau des Proteins hindeutet. Nach 4,6 und 8 Stunden Inkubation sind außerdem feine Banden unterschiedlicher Größe zu detektieren, die vor Beginn der Inkubation nicht zu sehen sind. Dies könnten Abbauprodukte der proteolytischen Spaltung sein.

In dem insgesamt weniger verschiedene Proteine enthaltenden Ansatz von gereinigtem IgG und Pepsin war ein deutlicher Rückgang der Intensität der bei ~ 150 kDa detektierbaren Bande zu sehen (Abbildung 29 B). Gleichzeitig entsteht mit der Inkubation eine Bande bei ~ 70 kDa, die in vergleichbarem Maße an Intensität zunimmt. Das deutet darauf hin, dass es sich hierbei um das Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment handeln könnte, welches in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE bei ~ 88 kDa laufen sollte. Im nächsten Schritt wurde die proteolytische Spaltung gereinigter IgG-Antikörper in einem größeren Volumen von 5 ml wiederholt, die Proteine mittels nicht reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 30 A) und die Antikörpertiter der initialen Probe ermittelt, wie auch der Fraktion, in welcher das IgG vollständig zum F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente verdaut wurde (Abbildung 30 B).

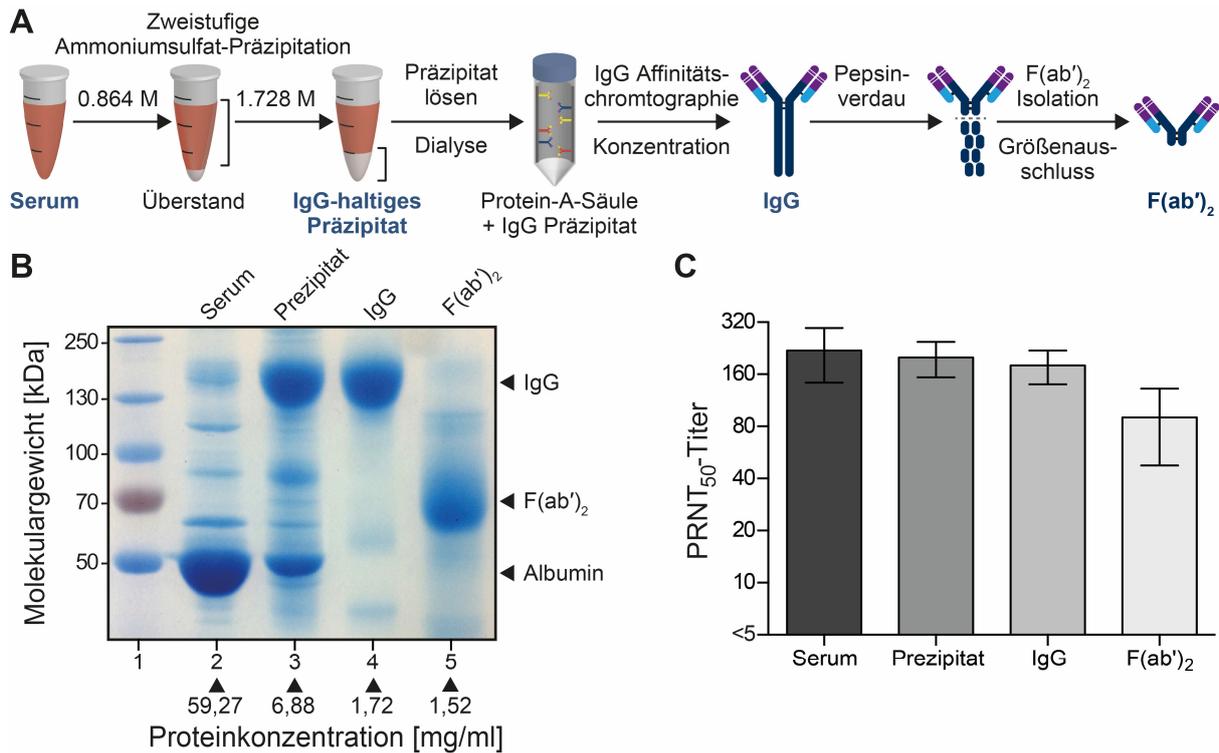


**Abbildung 30: Analyse der Produkte einer proteolytischen Spaltung von IgG durch Pepsin.** (A und B) Die proteolytische Spaltung wurde zu unterschiedlichen Zeiten inaktiviert und 10 µg jeder Probe mittels SDS-PAGE (8 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die Antikörpertiter ausgewählter Proben quantifiziert. (A) Spalte 1: Inaktivierung zu Beginn der Inkubationszeit, Spalten 2–6: Inaktivierung nach 30 Minuten, 1, 2, 4 und 6 Stunden Inkubation, Spalte 7: Molekulargewichtsreferenz [kDa]. (B) Die totalen Antikörper gegen ZEBOV-GP wurden mittels IMPA unter Verwendung von Antikörpern gegen das IgG oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von Kaninchen ermittelt und als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Die neutralisierenden Antikörper gegen VSVΔG/EBOV-GP wurden als 50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert der Probe quantifiziert.

Die Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der proteolytischen Spaltung im größeren Maßstab (Abbildung 30) entsprach der Beobachtung aus Abbildung 29 B. Die Quantifizierung der totalen Antikörpertiter am Anfang und 6 Stunden nach der Ko-Inkubation von IgG und Pepsin zeigte eine tausendfache Reduktion des Titters, wenn ein Antikörper gegen IgG zur Immunfärbung verwendet wurde. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment konnte hingegen die Hälfte des Ausgangstiters nachgewiesen werden.

Letztlich resultierte aus diesem Optimierungsprozess ein Mehrstufenprotokoll, beginnend mit einem zweistufigen Präzipitationsverfahren auf Basis von 0,864 M und 1,728 M Ammoniumsulfat zur Reduktion des Anteils ungewollter Serumproteine vor der Isolation der IgG-Antikörper durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein A. Abschließend wurde das IgG durch einen enzymatischen Verdau mit Pepsin modifiziert, um den Fc-Teil zu entfernen und das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zu gewinnen (Abbildung 31 A).

Die Reduktion des Anteils ungewollter Serumproteine und der damit erzielte Reinheitsgrad wird anhand eines Coomassie-gefärbten Gels veranschaulicht, in welchem gleiche Proteinkonzentrationen des ursprünglichen Serums, des Intermediats nach der Fällung und der finalen IgG- und F(ab')<sub>2</sub>-Produkte aufgetrennt wurden (Abbildung 31 B). Um die Entwicklung der Antikörperlevel während des Reinigungsverfahrens vergleichen zu können, wurden die neutralisierenden Titer aller Proben relativ zum Volumen angegeben. Die Rückgewinnungsrate der Neutralisationsaktivität betrug nach der Ammoniumsulfat-Fällung mehr als 90 % und nach anschließender IgG-Affinitätsreinigung immer noch mehr als 80 % (Abbildung 31 C). Der enzymatische Verdau des IgG führte zu einer Halbierung der neutralisierenden Aktivität in der F(ab')<sub>2</sub>-Fraktion.



**Abbildung 31: Reinigung und Analyse von IgG- und F(ab')<sub>2</sub>-Produkten.** Kaninchen wurden drei Mal im Abstand von 2 Wochen mit 300 µg VLPs in Kombination mit dem Sigma-Adjuvans immunisiert. Das Hyperimmunserum wurde eine Woche nach der letzten Immunisierung entnommen. (A) Schematische Darstellung des mehrstufigen Reinigungsprozesses. Nach einer Zwei-Schritt-Präzipitation mit 20 % und 40 % Ammoniumsulfat-Sättigung und anschließender Dialyse zum Austausch des Puffers wurden die IgG-Antikörper mittels Protein-A-Affinitätschromatographie isoliert und durch enzymatischen Verdau mit Pepsin das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment generiert, welches letztlich durch Größenausschluss-Filtration isoliert und konzentriert wurde. Die Zwischen- und Endprodukte wurden im initialen Volumen der Serumprobe gelöst respektive auf dieses Volumen konzentriert. (B) Proteinanalyse des Ausgangsserums, der Zwischen- und der Endprodukte. 10 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE (8 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spalte 1: Molekulargewichtsreferenz [kDa]; Spalte 2: initiales Serum; Spalte 3: gelöste Proteine nach 20–40 % Ammoniumsulfat-Präzipitation; Spalte 4: Eluat nach Protein-A-Affinitätschromatographie; Spalte 5: IgG nach enzymatischem Pepsin-Verdau. Unterhalb sind die entsprechenden Proteinkonzentrationen angegeben, welche mit der BCA-Methode ermittelt wurden. (C) Neutralisierende Antiköpertiter gegen VSVΔG/EBOV-GP des eingesetzten Serums (n = 4), des Präzipitats (n = 4) sowie der affinitäts-gereinigten IgG-Fraktion (n = 4) und des daraus resultierenden F(ab')<sub>2</sub> Produkts (n = 2) wurden als 50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert des quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Gruppe und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit des verwendeten Neutralisationstests.

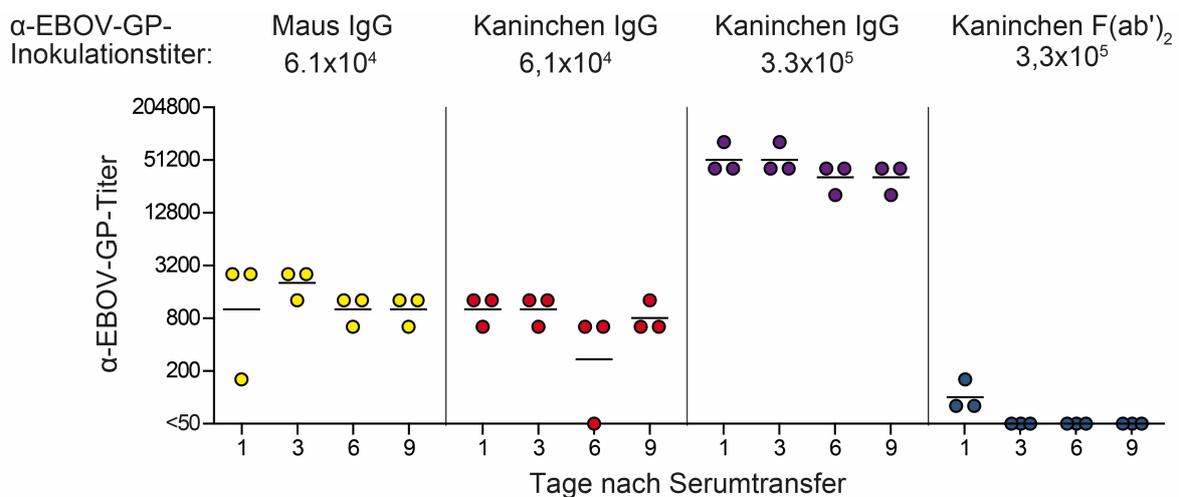
Zusammenfassend ermöglichen diese Experimente die Aussage, dass das verwendete mehrstufige Reinigungsverfahren zu einer Ausbeute hoch gereinigter IgG-Antikörper mit einem nur geringen Verlust der Neutralisationsaktivität führt. Das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment kann mit einer Rückgewinnungsrate von mindestens 50 % hergestellt werden.

### 6.2.7 Untersuchung der Stabilität gereinigter IgG- und F(ab')<sub>2</sub>-Produkte im xenogenen *In-vivo*-Modell

Die Antikörper-Halbwertszeit ist eine wichtige Wirksamkeitsdeterminante der passiven Antikörpertherapie (BAZIN-REDUREAU et al. 1997). So sollte vorab in einem Experiment die Stabilität der generierten Antikörperprodukte in einer anderen Spezies untersucht werden. Für den Vergleich zwischen homologen und xenogenen Antikörpern wurde Mäusen gereinigtes

homologes Maus-IgG oder heterologes Kaninchen-IgG oder -F(ab')<sub>2</sub>-Fragment i. p. appliziert und die Stabilität über 9 Tage verfolgt. Die Dosis wurde basierend auf dem Antikörpertiter gegen das ZEBOV-GP kalkuliert.

Unabhängig vom Ursprung konnten in den Empfängermäusen über 9 Tage konstante IgG-Level nachgewiesen werden, wobei die Behandlung mit einer höheren Dosis IgG auch zu höheren Titern führte (Abbildung 32). Hingegen waren selbst nach Gabe einer hohen Dosis heterologer Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente nur einen Tag nach dem Serumtransfer überhaupt Titer gegen das EBOV-GP oberhalb des Detektionslimits quantifizierbar.



**Abbildung 32: In-vivo-Stabilität von IgG und F(ab')<sub>2</sub> in einem xenogenen Tiermodell.** Mäusen wurde eine Einzeldosis homologer Maus-IgG-Antikörper oder heterologer aus dem Kaninchen stammender IgG- oder F(ab')<sub>2</sub>-Präparate i. p. injiziert. Die Antikörperlevel gegen ZEBOV-GP wurden mittels IMPA als reziproke Serum-Endpunkttiter quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier und die korrespondierende Linie den Mittelwert der Gruppe (n = 3). Die Y-Achse beginnt am Detektionslimit der verwendeten Testmethode.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kombination aus höherer Stabilität von IgG und potentiell höheren Risiken eine situationsbedingte Abwägung gegen das weniger immunogene F(ab')<sub>2</sub>-Fragment mit niedrigerer Stabilität erfordert.

## 7 DISKUSSION

Die Zunahme des globalen Reiseverkehrs und Handels bei gleichzeitig begrenzter Verfügbarkeit von Therapien ermöglicht eine rasche Ausbreitung neu auftretender Infektionen (STÄRK & MORGAN 2015). Die Entwicklung eines Impfstoffes ist langfristig der effektivste Ansatz, um einerseits prophylaktisch vor einer Viruserkrankung zu schützen und andererseits Ausbrüche einzugrenzen oder den Erreger sogar auszurotten, wie es beispielsweise um 1980 bereits mit den Pocken gelang (WHO 1980; FENNER et al. 1988). Um den Verlauf einer Pandemie mittels Impfung beeinflussen zu können, ist die Produktion einer großen Anzahl Impfdosen innerhalb kurzer Zeit notwendig. Die H1N1-Influenzapandemie 2009 zeigte die hiermit einhergehende Herausforderung deutlich auf (HESSEL 2009; LÖWER 2010). Obwohl eine gut etablierte und anpassbare Pipeline zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen vorhanden war und die Möglichkeit einer schnellen Zulassung (PFLEIDERER 2010) bestand, konnten aufgrund der Kombination aus schwacher Immunogenität des inaktivierten Antigens und dem um zwei Drittel niedrigeren Antigenertrag des pandemischen H1N1-Isolats nur 28 % der im WHO-Aktionsplan zur globalen Versorgung mit Influenzaimpfstoffen geforderten pandemischen Impfstoffdosen produziert werden (LAMBERT & FAUCI 2010; PARTRIDGE & KIENY 2010). Die Kombination aus mäßiger Immunogenität eines Antigens und geringer Antigenausbeute führte dazu, dass einigen Pandemieimpfstoffen squalenhaltige Adjuvanzien als Wirkverstärker zugesetzt wurden, um den erforderlichen Antigengehalt zu verringern und so die Zahl der Dosen zu erhöhen (JOHANSEN et al. 2009; SKOWRONSKI et al. 2011). Retrospektiv bietet der pandemische H1N1-Influenzaimpfstoff dadurch einen Einblick in den Beitrag von Adjuvanzien zur Qualität und Quantität von Antikörperantworten.

In den meisten Fällen sind die Entwicklungszeiten für Impfstoffe zu lang, um Ausbrüche neuartiger Virusinfektionen eindämmen zu können, geschweige denn ist – wie im Falle von Influenza – eine adaptierbare Produktionspipeline für Impfstoffe etabliert. Das beispiellose Ausmaß der Ebola-Epidemie 2014 in Westafrika führte zum Einsatz experimenteller Therapien, die bisher nicht für den klinischen Einsatz beim Menschen zugelassen waren (WONG & KOBINGER 2015). Aber für viele neuartige Viren ist die Entwicklung von Therapieansätzen noch nicht so weit fortgeschritten. Daher werden Notfalltherapien benötigt, die schnell in klinisch relevanter Qualität und Quantität produziert werden können.

Unter den experimentellen Ebola-Therapien befanden sich auch antikörperbasierte Therapien, welche das Potential der passiven Vermittlung von temporärem Immunschutz naiver Personen verdeutlichten (MENDOZA et al. 2017). Wie im Falle von Pandemieimpfstoffen haben sich die funktionalen Antikörperlevel auch bei der passiven Immunisierung als ausschlaggebend erwiesen (DYE et al. 2012).

Unter besonderer Berücksichtigung der Erkenntnisse rund um die erfolgreiche Induktion funktionaler Antikörper durch den adjuvantierten pandemischen Influenzaimpfstoff sollte eine Immunisierungsstrategie zur Produktion effektiver Notfallseren entwickelt werden, die Unwägbarkeiten wie beispielsweise eine geringe Immunogenität oder schwierige Verfügbarkeit des Antigens berücksichtigt. Die Forschung an einer Vielzahl neuartiger infektiöser Erreger unterliegt hohen biologischen Sicherheitsanforderungen, die eine Therapieentwicklung zusätzlich erschweren. Auf diesen Faktor wurde beim experimentellen Design der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk gelegt. Das Ziel dieser Studie war daher die Entwicklung von Immunisierungsstrategien zur Induktion hoher funktionaler Antikörperantworten in Tieren unter niedrigen biologischen Sicherheitsanforderungen als Basis zur Entwicklung schnell verfügbarer Notfalltherapien in Ausbruchsszenarien. Im Folgenden werden die zentralen Erkenntnisse der Arbeit unter Rückbezug auf die eingangs formulierte Hypothese diskutiert.

## **7.1 Immunisierung mit squalenhaltigen Adjuvantien erhöht signifikant die Antikörperantwort und reduziert die virale Replikation nach Infektion**

Die Induktion schützender Antikörperantworten hängt maßgeblich von der Immunogenität des Antigens ab (LEROUX-ROELS et al. 2011). Die inaktivierten Split- oder Subunit-Influenzaimpfstoffe induzieren nur moderate Antikörperantworten, die bereits einige Monate nach Impfung wieder abnehmen (SONG et al. 2010; CASTILLA et al. 2013). Die Zugabe von Adjuvantien kann Immunantworten verstärken und hat sich in Kombination mit gereinigten oder inaktivierten Antigenen als besonders erfolgreich erwiesen (GARÇON et al. 2011). Im Impfstoff gegen das A/H5N1-Virus wurden Adjuvantien bereits erfolgreich zur Steigerung der Immunogenität eingesetzt (LEROUX-ROELS et al. 2007). Wenn wie im Falle des pandemischen Influenzaimpfstoffs 2009 zudem nur wenig Antigen zur Verfügung steht, erscheint die Zugabe von Adjuvantien als vielversprechender Ansatz, um Antigen zu sparen und dadurch mehr Impfdosen generieren zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit von 2 µg anstelle der üblichen 15 µg des monovalenten H1N1pdm09-Influenzaimpfstoffs in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien im Frettchen untersucht. Diese Studie hat gezeigt, dass zwei Immunisierungen mit den squalenhaltigen Adjuvantien MF59 oder AS03 im Abstand von 3 Wochen bis zu 100-fach höhere funktionale Antikörpertiter gegen verschiedene H1N1pdm09-Isolate induzieren als der nicht adjuvantierte Impfstoff (Abbildung 13 und Abbildung 14). Zudem blieben die Antikörpertiter der MF59- und AS03-Gruppe im Gegensatz zum nicht adjuvantierten Impfstoff über die nächsten sechs Monate auf einem Niveau stabil, welches mit Infektionsschutz assoziiert wird (JONG et al. 2003;

COUDEVILLE et al. 2010). Die Zugabe von squalenhaltigen Adjuvanzien scheint also auch zu einer verlängerten Persistenz der Antikörperantwort zu führen.

Obwohl der größte Anteil der induzierten Antikörper gegen das HA-Protein gerichtet war (Abbildung 17), konnten in den mit MF59 und AS03 immunisierten Tieren auch subtypenspezifische Antikörper gegen das N1-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 18). Da das NA-Protein für das Ablösen neu gebildeter Viren von der Wirtszelle notwendig ist, werden NA-spezifische Antikörper mit einem weniger schweren Verlauf der Infektion sowie der verringerten Ausscheidung des Virus assoziiert (WOHLBOLD et al. 2015). Außerdem ist das NA-Protein das konservierte der beiden Antigene des Influenzavirus; Antikörper gegen NA werden mit einer Kreuzreaktivität gegen heterologe Influenzastämme mit dem gleichen NA-Subtyp in Verbindung gebracht (KREIJTZ et al. 2011). Insbesondere im Falle der *De-novo*-Expression des NA-Proteins von H1N1 durch einen Lebendimpfstoff wurde eine Kreuzreaktivität mit H5N1 festgestellt (CHEN et al. 2012b; JANG et al. 2012). In dieser Studie wurde eine Induktion solcher kreuzreaktiver Antikörper gegen das NA-Protein des H5N1-Virus durch eine Immunisierung mit inaktiviertem Antigen in Kombination mit MF59 oder AS04 gezeigt. Dies kann ein erster Hinweis sein, dass die Zugabe von squalenhaltigen Adjuvanzien den immunsystem-stimulierenden Effekt einer *De-novo*-Expression zumindest teilweise reproduzieren könnte.

Die H1N1-Komponente der saisonalen Influenzaimpfstoffe der südlichen und nördlichen Hemisphäre wurde von 2009 bis 2017 nicht verändert, während in gleicher Zeit die H3N2-Komponente viermal sowie das Influenza-B-Isolat fünfmal angepasst wurden (WHO 2010–2017). Diese relative genetische Stabilität des H1N1-Virus seit der Pandemie könnte auf die starke Immunität zurückzuführen sein, welche durch den adjuvantierten Pandemieimpfstoff 2009 induziert wurde (GILCA et al. 2011), wird doch angenommen, dass eine suboptimale Immunantwort das Entstehen von Driftvarianten fördert (GUARNACCIA et al. 2013).

Es ist bekannt, dass inaktivierte Influenzaimpfstoffe zwar die virale Replikation in der Lunge reduzieren, jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Replikation im oberen respiratorischen Trakt haben (KOBINGER et al. 2010). Folglich können gerade in diesem Bereich Antikörper mit einer niedrigen Avidität zur Entstehung von Escape-Mutanten beitragen, die dann leicht übertragen werden können. Die signifikant bessere Kontrolle der Virusreplikation in den oberen Atemwegen nach der Immunisierung mit dem adjuvantierten Impfstoff (Abbildung 20) könnte dazu führen, dass weniger *Drift*-Varianten des Virus entstehen und diese außerdem seltener übertragen werden können.

Diese Arbeit hat ergeben, dass eine Immunisierung mit niedrigen Dosen des inaktivierten Antigens in Kombination mit squalenhaltigen Adjuvanzien bereits nach der ersten Immunisierung schützende Antikörpertiter und auf Dauer signifikant höhere totale und funktionale Antikörperantworten induziert als eine Immunisierung ohne Adjuvans. Die Induktion kreuzreaktiver, subtypenspezifischer NA-Antikörper durch squalenhaltige Adjuvanzien deutet

außerdem auf ein Epitopen-Spektrum hin, welches vergleichbar breit ist wie bei der *De-novo*-Expression der HA- und NA-Glykoproteine. Zudem scheint die bessere Kontrolle der Virusreplikation in den oberen Atemwegen durch die Zugabe squalenhaltiger Adjuvanzien das Risiko der Entstehung von *Drift*-Varianten zu reduzieren, wodurch die Komponente des saisonalen Impfstoffs weniger häufig angepasst werden muss.

## **7.2 Die Kombination von squalenhaltigen Adjuvanzien mit VLPs ermöglicht eine effektive Produktion neutralisierender Antiseren gegen hochpathogene Erreger unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen**

Ausbrüche unbekannter Viren, gegen die noch kein Therapieansatz zur Verfügung steht, sind meist unvereinbar mit den Entwicklungs- und Zulassungszeiten von Impfstoffen und neuen antiviralen Medikamenten. In diesem Fall können sofort verfügbare Notfalltherapien den Verlauf des Ausbruchs maßgeblich beeinflussen und bestenfalls sogar zu seiner Kontrolle beitragen. Hierfür werden Behandlungsoptionen benötigt, die schnell in klinisch relevanter Quantität und Qualität hergestellt werden können. Polyklonale antikörperbasierte Ansätze können eine solche sofort wirksame Notfalloption darstellen. Die Entwicklungsdauer effektiver monoklonaler Antikörpertherapien bis hin zur Zulassung und Produktion in klinisch relevantem Umfang kann zwar – wie im Falle der Impfstoffentwicklung – im Angesicht eines Ausbruchs zu lang sein. Aus der bisherigen Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen ZEBOV lassen sich allerdings Lehren ziehen: So zeigte beispielsweise der neutralisierende humane Antikörper KZ52 im Kleintiermodell einen Schutz (PARREN et al. 2002), konnte jedoch im relevanteren Tiermodell des nicht-humanen Primaten nicht vor einer Infektion schützen (OSWALD et al. 2007). Dahingegen lässt der Erfolg des monoklonalen Antikörper-Cocktails ZMapp den Schluss zu, dass das parallele Angreifen mehrerer, auch nicht neutralisierender Epitope vorteilhaft sein kann (DAVIDSON et al. 2015). Eine bekannte Einschränkung von Therapien mit monoklonalen Antikörpern ist das Risiko des Entstehens von *Escape*-Mutanten (QIU & KOBINGER 2014; KUGELMAN et al. 2015). Polyklonale Antiseren haben im Gegensatz hierzu den Vorteil, dass sie inhärent auf mehrere neutralisierende und nicht-neutralisierende Epitope eines Antigens abzielen, wodurch auch das Risiko des Entstehens von *Escape*-Mutanten deutlich verringert wird. Während das Plasma rekonvaleszenter Patienten gerade zu Beginn von Ausbrüchen meist nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht, können polyklonale Antiseren tierischen Ursprungs in skalierbarer Menge produziert werden. Die Herausforderung der passiven Immuntherapie mit Serum tierischen Ursprungs liegt in der Induktion hoher Level therapeutisch wirksamer Antikörper sowie der Reinigung dieser, um das Risikos ungewollter Nebenwirkungen zu minimieren (GRAHAM & AMBROSINO 2015).

In dieser Arbeit wurde als Alternative zu einer Immunisierung mit hoch pathogenen Wildtypviren – deren Verwendung mit hohen Sicherheitsanforderungen verbunden ist – untersucht, ob Expressionssysteme für die Präsentation des Antigens genutzt werden können und in der Lage sind, innerhalb eines Zeitraums von zwei Monaten therapeutisches Serum zu generieren. Um das Potential verschiedener Immunisierungsplattformen bezüglich dieser Aspekte zu untersuchen, wurde ZEBOV-GP als Modellantigen gewählt. Für ZEBOV-GP standen experimentelle Expressionssysteme zur Verfügung, welche unterschiedliche Präsentationsstrategien des Antigens abdecken und sich zugleich in der Klassifizierung nach biologischen Sicherheitsstufen unterscheiden. Während die Produktion von VLPs das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen in Form transfizierter Zellen erfordert, sind die gereinigten VLPs selbst keine genetisch veränderten Organismen, da sie nicht replikationsfähig sind. Dies vereinfacht die Handhabung entscheidend. Im Gegensatz hierzu fallen die beiden verwendeten viralen Vektoren unter die Kategorie genetisch veränderter Organismen. Sie führen zu einer *De-novo*-Synthese des Antigens, deren Bedeutung für die Induktion einer starken Immunantwort es im Zuge der Untersuchung zu ermittelten galt. Hierbei unterliegt das in humanen Zellen nicht replikationsfähige MVA in Deutschland einer niedrigeren biologischen Sicherheitsstufe (Stufe 1) als das replikationskompetente VSV (Stufe 2). Das MVA ist ein auf Hühnerembryofibroblasten passagiertes und dadurch attenuiertes Virus, welches humane Zellen einmalig infizieren, aber keine neuen infektiösen Partikel bilden kann. Durch das Einfügen einer Antigen-Expressionskassette führt die Infektion zu einer einmaligen *De-novo*-Synthese des Antigens (SUTTER & MOSS 1992; VOLZ & SUTTER 2017). Das rekombinante VSVΔG/EBOV-GP hingegen kodiert im viralen Genom anstelle des eigenen Glykoproteins für das ZEBOV-GP. Dies führt einerseits zur Inkorporation des Antigens in den Viruspartikel – wodurch ein replikationsfähiges Virus entsteht – und darüber hinaus zu einer Infektion weiterer Zellen, die ihrerseits wiederum das ZEBOV-GP *de-novo* synthetisieren (GEISBERT et al. 2008; GEISBERT & FELDMANN 2011; GEISBERT 2017).

Frühe Studien zur Entwicklung passiver Immuntherapien gegen ZEBOV mittels Immunisierung von Pferden mit inaktiviertem Virus waren nicht erfolgreich (JÄHRLING et al. 1996). Dies ließ den Schluss zu, dass die Immunogenität des inaktivierten Virus nicht ausreichend war und eine *De-novo*-Synthese für die Produktion schützender Antikörper essenziell sein könnte. Dem entgegen stehen neuere Erkenntnisse, nach denen die Immunisierung von Schafen mit einer rekombinanten ZEBOV-GP-Ektodomäne zusammen mit Adjuvantien zur Produktion therapeutisch wirksamer Antisera führte (DOWALL et al. 2016b; DOWALL et al. 2016a). Dies war ein Indiz dafür, dass auch eine Immunisierung mit nicht replikationsfähigem Antigen zur Induktion von wirksamem therapeutischem Serum führen kann.

In einer ersten Studie zur Immunisierung mit nicht replikationsfähigen VLPs zeigten drei aufeinander folgende Injektionen im Abstand von 2 Wochen die höchsten Antikörpertiter gegen

das EBOV-GP (Abbildung 23 A). Für die Induktion neutralisierender Antikörpertiter war eine zweite Immunisierung zwingend notwendig und eine dritte Immunisierung konnte die neutralisierende Aktivität weiter verstärken (Abbildung 23 B). Basierend auf der Erkenntnis des ersten Teils dieser Arbeit wurde die Wirkung einer Zugabe verschiedener Adjuvanzien auf die VLP-basierte Antikörperantwort untersucht. Wie beim H1N1pdm09-Impfstoff führte auch hier die Kombination eines proteinbasierenden Antigens mit einer squalenhaltigen Öl-in-Wasser-Emulsion zu den höchsten Titern gegen ZEBOV-GP sowie der stärksten neutralisierenden Aktivität (Abbildung 24). Die Zugabe squalenbasierter Adjuvanzien erscheint nach unserer Impfstoffstudie mit inaktiviertem Antigen in Frettchen sowie der Verwendung in zugelassenen Impfstoffen für Menschen (GARÇON et al. 2012; O'HAGAN et al. 2013; APOSTÓLICO et al. 2016) und der Anwendung in Kombination mit den proteinbasierten VLPs in Mäusen und Kaninchen als ein speziesübergreifender, wirkungsvoller Ansatz zur Steigerung funktionaler Antikörper.

Diese vielversprechende Antigen-Adjuvans-Kombination wurde für weitere Experimente in verschiedenen Tierspezies beibehalten. Beim Vergleich der drei unterschiedlichen Expressionsplattformen führte eine *De-novo*-Antigenexpression zwar zu einer früheren Entwicklung von Antikörpern gegen EBOV-GP, bei den neutralisierenden Antikörpertitern erreichten die adjuvanzierten VLPs jedoch nach drei Immunisierungen vergleichbare Endtiter in beiden Tierspezies. Dies zeigt, dass nicht die *De-novo*-Antigenexpression, sondern vielmehr die wiederholte Präsentation des Antigens in seiner nativen Konformation für die Induktion hoher funktionaler Antikörperlevel erforderlich ist. Die Kombination aus VLPs mit squalenbasiertem Öl-in-Wasser-Adjuvans war nach wiederholten Immunisierungen am besten geeignet, Antikörper gegen ZEBOV-GP zu induzieren, die noch dazu in einem vergleichbaren Bereich lagen wie die von Rekonvaleszenten (Kapitel 6.2.5) (KRÄHLING et al. 2016). Darüber hinaus lagen die funktionalen Antikörpertiter der Antiseren mehr als 20-fach höher als der Durchschnitt in VSVΔG/EBOV-GP-Impflingen (Kapitel 6.2.5) (AGNANDJI et al. 2016). Die hohen Antikörpertiter in zwei unterschiedlichen Tierspezies weisen auf das große Potential von VLPs als Antigen-Expressionsplattform für die Produktion therapeutischen Antiserums hin.

Hinzu kommt, dass VLPs schon seit langem als Hepatitis-B-Impfstoff zugelassen sind und zu den Kandidatenimpfstoffen gehören gegen neu auftretende Infektionen wie Influenza, Zika, Dengue oder MERS-CoV (LIU et al. 2014; PILLET et al. 2016; BOIGARD et al. 2017; WANG et al. 2017). Dies unterstreicht ihre hohe Flexibilität und Anpassbarkeit. VLPs für die Herstellung therapeutischer Antiseren zu nutzen, bietet gleich mehrere Vorteile: VLPs sind nicht infektiös, was eine Handhabung ohne besondere Sicherheitsanforderungen ermöglicht; sie können mit Adjuvanzien kombiniert werden, wodurch die Induktion totaler und funktionaler Antikörpertiter signifikant steigt; wiederholte Immunisierungen mit VLPs steigern die Produktion funktionaler Antikörperlevel und VLPs können in einer Vielzahl von Zelllinien produziert werden (KUSHNIR et al. 2012; ZELTINS 2013). Vor allem der letzte Punkt kann bei der Produktion

von Antiseren gegen Glykoproteine ausschlaggebend sein. Bezogen auf ZEBOV-GP macht die Kombination eines nicht neutralisierenden Antikörpers, der an die Glykane des Proteins bindet, mit neutralisierenden Antikörpern den monoklonalen Antikörpercocktail ZMapp wirksamer (DAVIDSON et al. 2015). Dies deutet darauf hin, dass das native Glykosylierungsprofil ein entscheidender Faktor bei der Induktion wirksamer polyklonaler Antikörper sein könnte. Säugetierexpressionssysteme sind generell in der Lage, posttranslationale Modifikationen (PTM) zu erzeugen, aber nur menschliche Zelllinien können komplexe Proteine mit vollständig humanen PTM produzieren (DUMONT et al. 2016). 2017 wurde zwar die Wirksamkeit von Hyperimmunserum gezeigt, welches durch die Immunisierung von Pferden mit VLPs aus einem Insektenzell-Expressionssystem erzeugt wurde (ZHENG et al. 2016), jedoch sind Unterschiede im *N*- und *O*-Glykosylierungsprofil zwischen von Menschen und Insektenzellen abgeleiteten Filovirus-Glykoproteinen bekannt (CLARKE et al. 2017), welche die Qualität und damit Wirksamkeit des Antiserums beeinflussen können, was für eine VLP-Produktion in humanen Zelllinien spricht.

### **7.3 Vergleichbare Stabilität von homologen und xenogenen IgG-Präparaten *in vivo***

Die Produktion von humanen polyklonalen Antikörpern in transchromosomalen Rindern durch die Immunisierung mit ZEBOV-GP-Nanopartikeln unterstreicht die Renaissance der passiven Immunisierung im Kampf gegen aufflammende virale Infektionen und nimmt sich gleichzeitig der Frage zur Reduktion von Nebenwirkungen an, die mit xenogenen Serumtherapien verknüpft wird (DYE et al. 2016). Zwar sind Nanopartikel ähnlich wie VLPs einfach in der Handhabung, jedoch schließt die begrenzte Verfügbarkeit der transgenen Tiere eine schnell implementierbare Notfallstrategie für Ausbruchsszenarien aus.

Nebenwirkungen wie die meist mild verlaufende Serumkrankheit (DIXON et al. 1961; LEÓN et al. 2013) oder die akut auftretende, lebensbedrohliche Typ-I-Überempfindlichkeit, die zu einem anaphylaktischen Schock führen kann (SILVA et al. 2016), waren ein Grund dafür, dass die Serumtherapie nur noch selten eingesetzt wird, obwohl ihr Potential gegen neu auftretende Infektionen – nicht nur gegen Ebola – immer wieder diskutiert wurde (CASADEVALL & SCHARFF 1995; CASADEVALL 1996; KELLER & STIEHM 2000; CASADEVALL et al. 2004; WANG et al. 2013).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein mehrstufiger Reinigungsprozess etabliert und nach erfolgter Optimierung nahezu reine IgG-Produkte und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente lieferte (Abbildung 31). Im ersten Schritt wurde die Menge ungewollter Serumproteine durch eine zweistufige Ammoniumsulfat-Präzipitation deutlich reduziert (Abbildung 27). Die Fällung mit Ammoniumsulfat ist eine etablierte und schonende Methode zur zügigen Ausfällung von Proteinen (WINGFIELD 2001). Die Rückgewinnung der vollständigen neutralisierenden Antikörpertiter nach der Ammoniumsulfat-

Präzipitation in dieser Studie bestätigt dies. Durch kleinere Optimierungen bei der anschließenden IgG-Affinitätsreinigung mittels Protein-A-Säulen, wie die angepasste Verdünnung der präzipitierten Serumproteine in Puffer, ein erneutes Laden des ersten Durchflusses sowie die Addition von zusätzlichen Waschschritten (Abbildung 28), führte zu einer nahezu reinen IgG-Fraktion mit einer Rückgewinnung von mehr als 80 % der neutralisierenden Aktivität.

Für die proteolytische Spaltung mittels Pepsin zur Produktion von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten wurde ein 1:40-Verhältnis von Pepsin zu Protein gewählt, um das Risiko einer möglichen Schädigung der Antikörperaktivität zu minimieren (CRIVIANU-GAITA et al. 2015). Während die proteolytische Spaltung der Gesamtproteine aus unbehandeltem Serum nach 8 Stunden nicht erfolgreich war (Abbildung 29), führte die enzymatische Spaltung des IgG nach 6 Stunden zu einem nahezu vollständigen Verdau und die quantitative Analyse ergab eine Halbierung der neutralisierenden Aktivität dieser F(ab')<sub>2</sub>-Fraktion (Abbildung 30).

Um erste Einblicke in die Stabilität der produzierten Hyperimmun-Präparate zu erhalten, wurde abschließend die Stabilität des IgG sowie des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments *in vivo* untersucht. Das xenoge Kaninchen-IgG und das homologe Maus-IgG persistierten in vergleichbarem Maße über neun Tage in den Empfängermäusen, während das Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment nur einen Tag nach dem Transfer nachweisbar war (Abbildung 32). Die kurze Halbwertszeit des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments wurde auch in Studien beschrieben, in denen für einen besseren Schutz eine wiederholte Behandlung mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten notwendig war (ZHENG et al. 2016). Das Fehlen schnell anwendbarer, einfacher Verfahren zur Stabilisierung von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten spricht zusammen mit dem 50-prozentigen Verlust der Neutralisierungsaktivität während der Produktion dafür, dass gereinigtes IgG – mit seinen bekannten und heutzutage kontrollierbaren Nebenwirkungen – eine wünschenswerte Ergänzung der Notfalltherapien gegen neu auftretende virale Erkrankungen darstellt.

Mit diesem Projekt wurde das Potenzial der schnellen Erzeugung von Hyperimmunseren tierischen Ursprungs unter Verwendung des ZEBOV-GP als Modellantigen in verschiedenen Immunisierungsplattformen untersucht. Eine Kombination aus VLPs mit einem squalenbasierten Adjuvans war am besten geeignet, um unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen nach wiederholten Immunisierungen hohe Titer totaler und funktionaler Antikörper zu induzieren. Ein optimiertes Reinigungsprotokoll lieferte polyklonales IgG mit funktionellen Titern im gleichen Bereich wie Rekonvaleszentenseren. Grundsätzlich ist der Ansatz einer VLP-basierten Immunisierung auch auf andere Pathogene anwendbar. Eine Beurteilung der Verträglichkeit sowie der Wirksamkeit der hier beschriebenen Hyperimmunseren *in vivo* wäre durch einen wiederholten Transfer der xenogenen Hyperimmunprodukte sowie eine *Challenge*-Studie in einem Tiermodell für die Ebola-Infektion möglich.

## 7.4 Aussagekraft der Ergebnisse von Surrogat-Analyseverfahren

Serologische Surrogattests für eine Wirksamkeitsanalyse von antiviralen Therapien sowie deren klinische Bewertung unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen sind essenziell, um eine Infrastruktur zur schnellen Herstellung antiviraler Therapieansätze bereitzuhalten (GRAHAM & SULLIVAN 2018). Der jüngste Ebola-Ausbruch in Westafrika führte aufgrund der Schwierigkeiten beim Umgang mit dem lebenden ZEBOV zu einer Reihe verschiedener Plattformtechnologien für die Untersuchung von Antikörpern. So wurden unterschiedliche ELISA zur Quantifizierung der Antikörper gegen das ZEBOV-GP verwendet und die neutralisierenden Antikörper mittels rekombinanter oder pseudotypisierter Reporterviren bestimmt (WILKINSON et al. 2017). In einer vergleichenden Gegenüberstellung der verschiedenen Surrogat-Analyseverfahren ermittelte die WHO eine hohe Variabilität der quantitativen Ergebnisse innerhalb mancher Testverfahren, zwischen den verschiedenen Plattformtechnologien sowie gegenüber der Verwendung des Wildtyperregers (WILKINSON et al. 2017). Das Ergebnis dieser Studie war, dass viele der Surrogattests nicht geeignet sind, um Antikörpertiter zuverlässig zu quantifizieren. Nur die auf VSV basierenden Plattformtechnologien zeigten in dieser Studie eine gute Korrelation mit dem Neutralisationstest unter Verwendung von ZEBOV (WILKINSON et al. 2017). Dies verdeutlicht erneut die Wichtigkeit einer sorgfältigen Auswahl geeigneter Plattformtechnologien.

In dieser Arbeit wurden die Surrogat-Analyseverfahren IPMA oder PRNT unter Verwendung des Reportervirus VSVΔG/EBOV-GP zur Antikörperquantifizierung der Tierseren verwendet. Zusätzlich wurden diese Seren in den etablierten Tests zur Quantifizierung der totalen (KRÄHLING et al. 2016) und neutralisierenden Antikörper (AGNANDJI et al. 2016) gegen ZEBOV analysiert. Diese beiden Testmethoden sind zwar lediglich für die Analyse humaner Seren validiert, die quantifizierten Antikörpertiter der Tierseren auf einem vergleichbaren Niveau können jedoch als Indikator für die Eignung der verwendeten Surrogat-Analyseverfahren betrachtet werden.

Während die mittels IPMA quantifizierten Antikörpertiter für die korrespondierenden Kaninchenserren im Vollvirus-ELISA vergleichbare Endpunktiter zeigten (Tabelle 25), ergab die Bestimmung der neutralisierenden Antikörperantworten unter Verwendung des VSVΔG/EBOV-GP im PRNT<sub>50</sub> interessanterweise über alle Seren hinweg zwei Log<sub>2</sub>-Größenordnungen niedrigere Titer als im VNT gegen das Wildtyp-ZEBOV (Tabelle 26). Dies deutet darauf hin, dass unsere Surrogat-Verfahren, die unter niedrigen biologischen Sicherheitsstandard verwendet werden können, bereits Annahmen zur Wirksamkeit der Seren *in-vitro* gegen das Wildtyp-ZEBOV zulassen könnten. Für eine Validierung dieser Beobachtung wären jedoch vergleichende Analysen der Surrogat-Verfahren mit den etablierten Tests unter Verwendung identischer

Referenzproben notwendig. Durch wiederholte unabhängige Durchführungen der gleichen Tests müssten ausreichend Daten für eine aussagekräftige Analyse generiert werden.

## 7.5 Fazit

Diese Studie beschreibt die Entwicklung einer potentiellen Pipeline für eine schnelle Produktion und Reinigung von Notfall-Antisera im Falle neuartiger viraler Ausbrüche. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf der Verwendung von adaptierbaren Immunisierungsplattformen, die eine Produktion unter niedrigen biologischen Sicherheitsmaßnahmen ermöglichen.

Das besondere Potential von VLPs als Immunisierungsplattform ergibt sich hierbei aus der Präsentation des Antigens in seiner nativen Konformation in Verbindung mit der grundsätzlichen Anpassbarkeit an verschiedene Viren und der Handhabung ohne besondere Sicherheitsanforderungen. Hinzu kommt die Möglichkeit einer Kombination mit Adjuvantien, wobei insbesondere die Verwendung squalenhaltiger Adjuvantien nicht nur das Antikörperrepertoire nach der Impfung verstärkt und erweitert, sondern auch die Entwicklung von Hyperimmunsere mit hohen Titern funktionaler Antikörper für die passive Immuntherapie beschleunigt. Die Kombination von Ebola-VLPs mit squalenhaltigem Adjuvans ermöglichte die Produktion von hochtitrigen Sere tierischen Ursprungs in sieben Wochen. Ein optimiertes Protokoll für die Reinigung dieser Hyperimmunsere lieferte polyklonales IgG mit totalen Antikörpertitern vergleichbar mit denen von Rekonvaleszentensere und einer 20-fach höheren Neutralisierungsaktivität, als Impflinge sie gegen das Wildtypvirus *in vitro* zeigen.

Mit dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Titererhöhung und der Erweiterung des Antikörperspektrums hergestellt werden. Insbesondere squalenbasierte Adjuvantien erwiesen sich als förderlich für die Erhöhung funktionaler Antikörperlevel und machen dadurch die Nutzung weniger immunogener Antigenexpressionsplattformen wie VLPs für die schnelle Herstellung von therapeutischen Antisera unter niedrigen Sicherheitsbedingungen attraktiv.

# I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur eines Influenza-A-Virus.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Antigen-Drift und Antigen-Shift bei Influenzaviren.....	6
Abbildung 3: Reassortment am Beispiel des pandemischen Influenzavirus A(H1N1)pdm09.....	7
Abbildung 4: Globale Verbreitung des pandemischen Influenzavirus A(H1N1)pdm09.....	8
Abbildung 5: Struktur eines Ebolavirus.....	9
Abbildung 6: Verbreitung der Ebola-Epidemie 2014 in Westafrika.....	9
Abbildung 7: Übersicht antiviraler Strategien.....	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Epitopenerkennung durch mono- und polyklonale Antikörper..	12
Abbildung 9: Zeitverlauf der saisonalen Influenza-Impfstoffentwicklung.....	15
Abbildung 10: Schematische Darstellung von in der Bevölkerung zirkulierenden Influenza-A-Viren.....	16
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers u. der Antikörperfragmente Fab u. F(ab) <sub>2</sub> ..	19
Abbildung 12: Studienaufbau.....	61
Abbildung 13: Kinetik funktionaler Antikörperantworten nach Immunisierung mit dem pandemischen H1N1pdm09-Impfstoff in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien.....	63
Abbildung 14: Funktionale Antikörperantworten gegen unterschiedliche H1N1-Influenzaviren.....	64
Abbildung 15: Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente der HA- und NA-Plasmide.....	65
Abbildung 16: Western-Blot-Analyse der in MDCK-Zellen exprimierten HA <sub>FLAG</sub> - oder NA <sub>FLAG</sub> -Proteine.....	66
Abbildung 17: Antikörperantworten gegen das Virus und das korrespondierende HA-Antigen im Vergleich..	67
Abbildung 18: Antikörpertiter gegen HA- und NA-Proteine unterschiedlicher Influenzaviren.....	68
Abbildung 19: Krankheitsverlauf immunisierter und naiver Frettchen nach einer Infektion mit dem pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009.....	69
Abbildung 20: Viruslast der oberen Atemwege immunisierter und naiver Frettchen 4 Tage nach einer Infektion mit dem pandemischen Influenzavirus A/Hamburg/05/2009.....	70
Abbildung 21: Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente der ZEBOV-GP- und ZEBOV-VP40-Plasmide	72
Abbildung 22: Herstellung von ZEBOV-VLPs.....	74
Abbildung 23: Antikörperantworten gegen ZEBOV-GP sowie neutralisierender Titer nach ein, zwei oder drei Immunisierungen mit ZEBOV-VLPs in Mäusen.....	75
Abbildung 24: Antikörperantworten nach VLP-Immunisierung in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzien.....	76
Abbildung 25: Eigenschaften der verwendeten Expressionssysteme für das ZEBOV-GP im Überblick.....	77
Abbildung 26: Vergleich der Antikörperantworten gegen ZEBOV-GP sowie neutralisierender Titer nach Immunisierung mit unterschiedlichen Antigen-Expressionssystemen in Mäusen.....	78
Abbildung 27: Analyse der schrittweisen Ammoniumsulfat-Präzipitation von Serumproteinen.....	80
Abbildung 28: Analyse der Intermediate einer IgG-Affinitätschromatographie.....	81
Abbildung 29: Analyse der proteolytischen Spaltung von Präzipitat und IgG durch Pepsin.....	82
Abbildung 30: Analyse der Produkte einer proteolytischen Spaltung von IgG durch Pepsin.....	83
Abbildung 31: Reinigung und Analyse von IgG- und F(ab') <sub>2</sub> -Produkten.....	85
Abbildung 32: In-vivo-Stabilität von IgG und F(ab') <sub>2</sub> in einem xenogenen Tiermodell.....	86

## II TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Standard-Ansatz einer reversen Transkription .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 2: Standard-Programm einer reversen Transkription.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 3: Komponenten einer DNA-Gelelektrophorese und deren Zusammensetzungen.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 5: Standard-PCR-Programm.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 6: Zusammensetzungen der Puffer zur Reinigung des PCR-Produkts.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 7: DNA-Fragmente mit den Enzym für ihre monovalenten Spaltstellen.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 8: Restriktionsansatz für Insert- und Vektor-DNA der HA- und NA-Plasmide .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 9: Zusammensetzungen der Puffer zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 10: Ansatz für die Dephosphorylierung der Vektor-DNA.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 11: Ansätze für Plasmid-Ligation und Re-Ligations-Kontrolle des Vektors.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 12: Pufferzusammensetzung für die Isolation von Plasmid-DAN im kleinen Maßstab.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 13: Pufferzusammensetzung für die Isolation von Plasmid-DAN im mittleren und großen Maßstab ..</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 14: Ansatz Kontrollspaltung von Plasmid-DNA .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 15: Plasmide, Enzyme und Puffer sowie durch In-silico-Spaltung erwartete Fragmentgrößen.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 16: Komponenten für Transfektion und Lyse von Zellen zur Proteingewinnung.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 17: Zusammensetzungen der Komponenten für die AEC-Färbung .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 18: Komponenten der SDS-PAGE und ihre Zusammensetzungen .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 19: Zusammensetzung unterschiedlicher Gele für die SDS-PAGE .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 20: Zusammensetzung der Protein-Färbelösung.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer für den Western-Blot.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 22: Zusammensetzungen der Puffer für die IgG-Affinitätschromatographie.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 23: Komponenten für den ELISA zur Quantifizierung von Kaninchen-IgG.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 24: Viren und GenBank-Nummern der phylogenetischen Analyse der HA-Nukleinsäure-Sequenz.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 25: Antikörperantworten von Kaninchenserem gegen ZEBOV oder ZEBOV-GP exprimierende Zellen, induziert durch unterschiedliche Antigen-Expressionssysteme .....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 26: Antikörperantworten von Kaninchenserem gegen das ZEBOV oder VSVΔG/EBOV-GP, induziert durch unterschiedliche Antigen-Expressionssysteme. ....</i>	<i>79</i>

### III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	anti
λ	Einheit für Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
A	Adenin
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	<i>Anti sense, Gegensinn (hier: entgegen der kodierenden Richtung)</i>
ATP	Adenintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin</i>
C	Cytosin
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary DNA, komplementäre DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE	<i>Cytopathic effect, zytopathischer Effekt</i>
D	Asparaginsäure
DE	Deutschland
dNTP	Desoxyribonukleotid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, Zellkulturmedium</i>
DMEM <sup>-</sup>	DMEM ohne Zusätze
DMEM <sup>+</sup>	DMEM mit 5 % (v/v) FKS, 200 mM L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
EBOV	Ebolavirus
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren</i>
EtOH	Ethanol
F(ab') <sub>2</sub>	Verbundene antigenbindende, variable Domänen des IgG-Antikörpers
Fc	Stammregion des IgG-Antikörpers, konstante Domäne
FKS	Fötales Kälberserum
FLAG	Epitop zur Proteinmarkierung
(FR)	Frankreich
g (· g)	Ein Vielfaches der g-Kraft, relative Zentrifugalbeschleunigung (RCF)
G	Guanin
GISRS	<i>Global Influenza Surveillance and Response System, globales Influenza-Überwachungs- und Reaktionssystem</i>
GP	Glykoprotein
Gu-HCl	Guanidinhydrochlorid
GuSCN	Guanidiniumthiocyanat
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEK293	Embryonale Nierenzellen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase</i>
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ionen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL	Israel
IgG	Immunglobulin G
i. m.	Intramuskulär

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

i. n.	Intranasal
i. p.	Intraperitoneal
IPMA	<i>Immunoperoxidase-Monolayer-Assay</i> , ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	<i>Luria-Botani broth</i> , Medium für Bakterien
Log	Logarithmus
M	Mol
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> ; Epithel-Zelllinie aus der Hundeniere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MtOH	Methanol
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
MWCO	<i>Molecular weight cutt off</i> , Molekulargewichtsausschluss
n	Anzahl
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OH <sup>-</sup>	Hydronium-Ionen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin-Reagenz
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming units</i> , Plaque-formende Einheiten
pH	negativer dekadischer Log der Konzentration von H <sub>2</sub> -Ionen beziehungsweise OH <sup>-</sup> -Ionen; Maß dafür, wie sauer beziehungsweise basisch eine Lösung ist
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test
PRNT50	50-prozentiger Plaque-Reduktions-Wert
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RDE	<i>Receptor destroying enzyme</i> , Rezeptor-zerstörendes Enzym
RNA	<i>Rribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase A	Enzym, dass einzelsträngige RNA spaletet
RT	Raumtemperatur
RW	Reinstwasser
S	<i>Sense, Sinn (hier: in kodierende Richtung)</i>
s. c.	<i>Subcutaneous</i> , subkutan
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SOC	<i>Super optimal broth</i> , Medium für Bakterien
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TCID <sub>50</sub>	<i>Tissue culture infectious dose 50 %</i> , 50 %-iger Gewebekultur-Infektions-Wert
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Flüssigsubstrat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheiten
UK	<i>United Kindom</i> , Vereinigtes Königreich
US	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
Vero E6	Epithel-Zelllinie aus der grünen Meerkatze
VLP	<i>Virus like particle</i> , virusähnlicher Partikel
VNT	Virusneutralisations-Test
VP40	Matrixprotein des Ebolavirus
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewicht pro Volumen
Y	Tyrosin
ZEBOV	Zaire Ebolavirus

## IV LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, G. P., & L. M. WEINER (2005): Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 23: 1147–1157.
- ADKINS, J. N., S. M. VARNUM, K. J. AUBERRY, R. J. MOORE, N. H. ANGELL, R. D. SMITH, D. L. SPRINGER & J. G. POUNDS (2002): Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 1: 947–955.
- AGNANDJI, S. T., A. HUTTNER, M. E. ZINSER, P. NJUGUNA, C. DAHLKE, J. F. FERNANDES, S. YERLY, J.-A. DAYER, V. KRAEHLING, R. KASONTA, A. A. ADEGNIKA, M. ALTFELD, F. AUDERSET, E. B. BACHE, N. BIEDENKOPF, S. BORREGAARD, J. S. BROSNAN, R. BURROW, C. COMBESCURE, J. DESMEULES, M. EICKMANN, S. K. FEHLING, A. FINCKH, A. R. GONCALVES, M. P. GROBUSCH, J. HOOPER, A. JAMBRECINA, A. L. KABWENDE, G. KAYA, D. KIMANI, B. LELL, B. LEMAÎTRE, A. W. LOHSE, M. MASSINGA-LOEMBE, A. MATTHEY, B. MORDMÜLLER, A. NOLTING, C. OGWANG, M. RAMHARTER, J. SCHMIDT-CHANASIT, S. SCHMIEDEL, P. SILVERA, F. R. STAHL, H. M. STAINES, T. STRECKER, H. C. STUBBE, B. TSOFA, S. ZAKI, P. FAST, V. MOORTHY, L. KAISER, S. KRISHNA, S. BECKER, M.-P. KIENY, P. BEJON, P. G. KREMSNER, M. M. ADDO & C.-A. SIEGRIST (2016): Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe. *N. Engl. J. Med.* 374: 1647–1660.
- AGUA-AGUM, J., B. ALLEGIANZI, A. ARIYARAJAH, R. B. AYLWARD, I. M. BLAKE, P. BARBOZA, D. BAUSCH, R. J. BRENNAN, P. CLEMENT, P. COFFEY, A. CORI, C. A. DONNELLY, I. DORIGATTI, P. DRURY, K. DURSCHI, C. DYE, T. ECKMANN, N. M. FERGUSON, C. FRASER, E. GARCIA, T. GARSKE, A. GASASIRA, C. GURRY, E. HAMBLION, W. HINSLEY, R. HOLDEN, D. HOLMES, S. HUGONNET, G. JARAMILLO GUTIERREZ, T. JOMBART, E. KELLEY, R. SANTHANA, N. MAHMOUD, H. L. MILLS, Y. MOHAMED, E. MUSA, D. NAIDOO, G. NEDJATI-GILANI, E. NEWTON, I. NORTON, P. NOUVELLET, D. PERKINS, M. PERKINS, S. RILEY, D. SCHUMACHER, A. SHAH, M. TANG, O. VARSANEUX & M. D. VAN KERKHOVE (2016): After Ebola in West Africa. Unpredictable risks, preventable epidemics. *N. Engl. J. Med.* 375: 587–596.
- AHMED, R., & R. S. AKONDY (2011): Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 89: 340–345.
- AHMED, R., & D. GRAY (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272: 54–60.
- AIR, G. M. (2012): Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* 6: 245–256.
- ALEKSANDROWICZ, P., A. MARZI, N. BIEDENKOPF, N. BEIMFORDE, S. BECKER, T. HOENEN, H. FELDMANN & H.-J. SCHNITTLER (2011): Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J. Infect. Dis.* 204 Suppl 3: 967.
- ALVAREZ-PEREA, A., L. K. TANNO & M. L. BAEZA (2017): How to manage anaphylaxis in primary care. *Clin Transl Allergy* 7: 45.
- ANDREI, G. (2006): Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development. *Antiviral Res.* 71: 96–107.
- APOSTÓLICO, J. D. S., V. A. S. LUNARDELLI, F. C. COIRADA, S. B. BOSCARDIN & D. S. ROSA (2016): Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J Immunol Res* 2016: 1459394.
- ARVAS, A. (2014): Vaccination in patients with immunosuppression. *Turk Pediatri Ars* 49: 181–185.
- BAERT, F. J., G. R. D'HAENS, M. PEETERS, M. I. HIELE, T. F. SCHAIBLE, D. SHEALY, K. GEBOES & P. J. RUTGEERTS (1999): Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 116: 22–28.
- BANZHOF, A., M. PELLEGRINI, G. DEL GIUDICE, E. FRAGAPANE, N. GROTH & A. PODDA (2008): MF59-adjuvanted vaccines for seasonal and pandemic influenza prophylaxis. *Influenza Other Respir Viruses* 2: 243–249.
- BAROUCH, D. H. (2008): Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455: 613–619.

- BARRA, N. G., A. GILLGRASS & A. A. ASHKAR (2010): Effective control of viral infections by the adaptive immune system requires assistance from innate immunity. *Expert Rev Vaccines* 9: 1143–1147.
- BAXBY, D. (1999): Edward Jenner's inquiry after 200 years. *BMJ* 318: 390.
- BAZIN-REDUREAU, M. I., C. B. RENARD & J. M. SCHERRMANN (1997): Pharmacokinetics of heterologous and homologous immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub> and Fab after intravenous administration in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 277–281.
- BEHRING, E., & S. KITASATO (1890): Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsch. med. Wochenschr.* 16: 1113–1114.
- BIHARI, I., G. PÁNCZÉL, J. KOVACS, J. BEYGO & E. FRAGAPANE (2012): Assessment of antigen-specific and cross-reactive antibody responses to an MF59-adjuvanted A/H5N1 prepandemic influenza vaccine in adult and elderly subjects. *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 1943–1948.
- BOIGARD, H., A. ALIMOVA, G. R. MARTIN, A. KATZ, P. GOTTLIEB & J. M. GALARZA (2017): Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005608.
- BOYER, L., J. DEGAN, A.-M. RUHA, J. MALLIE, E. MANGIN & A. ALAGÓN (2013): Safety of intravenous equine F(ab')<sub>2</sub>: insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. *Toxicon* 76: 386–393.
- BRADFUTE, S. B., & S. BAVARI (2011): Correlates of immunity to filovirus infection. *Viruses* 3: 982–1000.
- BROCHIER, B., J. BLANCOU, I. THOMAS, B. LANGUET, M. ARTOIS, M. P. KIENY, J. P. LECOCQ, F. COSTY, P. DESMETTRE & G. CHAPPUIS (1989): Use of recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies: innocuity to several non-target bait consuming species. *J. Wildl. Dis.* 25: 540–547.
- BROWNING, C. H. (1955): Emil Behring and Paul Ehrlich. Their contributions to science. *Nature* 175: 570–575.
- BRYAN-MARRUGO, O. L., J. RAMOS-JIMÉNEZ, H. BARRERA-SALDAÑA, A. ROJAS-MARTÍNEZ, R. VIDALTAMAYO & A. M. RIVAS-ESTILLA (2015): History and progress of antiviral drugs. From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina Universitaria* 17: 165–174.
- BURTON, D. R. (2002): Antibodies, viruses and vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 706–713.
- BUTT, A. M., S. SIDDIQUE, M. IDREES & Y. TONG (2010): Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virology* 403: 319.
- CAO-LORMEAU, V.-M., & D. MUSSO (2014): Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet* 384: 1571–1572.
- CASADEVALL, A. (1996): Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. *Emerging Infect. Dis.* 2: 200–208.
- CASADEVALL, A., E. DADACHOVA & L.-A. PIROFSKI (2004): Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 695–703.
- CASADEVALL, A., & M. D. SCHARFF (1995): Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 21: 150–161.
- CASTILLA, J., I. MARTÍNEZ-BAZ, V. MARTÍNEZ-ARTOLA, G. REINA, F. POZO, M. G. CENOZ, M. GUEVARA, J. MORAN, F. IRISARRI, M. ARRIAZU, E. ALBÉNIZ, C. EZPELETA, A. BARRICARTE, NETWORK, COLLECTIVE PRIMARY HEALTH CARE SENTINEL & NAVARRE, COLLECTIVE NETWORK FOR INFLUENZA SURVEILLANCE IN HOSPITALS OF (2013): Decline in influenza vaccine effectiveness with time after vaccination, Navarre, Spain, season 2011/12. *Eurosurveillance* 18: 20388.
- CDC (2008): Human rabies prevention. Recommendations of the advisory committee on immunization practices. Recommendations and reports. <https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5703.pdf>. (Download am 18.03.18).

- CDC (2010): Use of a reduced (4-Dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies. Recommendations of the advisory committee on immunization practices. Recommendations and reports. <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5902.pdf>. (Download am 18.03.18).
- CHAN, A. C., & P. J. CARTER (2010): Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 301–316.
- CHEN, W., Y. ZHONG, Y. QIN, S. SUN & Z. LI (2012a): The evolutionary pattern of glycosylation sites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase. *PloS one* 7: e49224.
- CHEN, Z., L. KIM, K. SUBBARAO & H. JIN (2012b): The 2009 pandemic H1N1 virus induces anti-neuraminidase (NA) antibodies that cross-react with the NA of H5N1 viruses in ferrets. *Vaccine* 30: 2516–2522.
- CHEN, Z., W. WANG, H. ZHOU, A. L. SUGUITAN, C. SHAMBAUGH, L. KIM, J. ZHAO, G. KEMBLE & H. JIN (2010): Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J Virol* 84: 44–51.
- CLARK, R., & T. KUPPER (2005): Old meets new. The interaction between innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* 125: 629–637.
- CLARKE, E. C., A. L. COLLAR, C. YE, Y. CAÌ, E. ANAYA, D. RINALDI, B. MARTINEZ, S. YARBOROUGH, C. MERLE, M. THEISEN, J. WADA, J. H. KUHN & S. B. BRADFUTE (2017): Production and purification of Filovirus glycoproteins in insect and mammalian cell lines. *Sci Rep* 7: 15091.
- CLEM, A. S. (2011): Fundamentals of vaccine immunology. *J Global Infect Dis* 3: 73.
- COCHRANE, C. G., & D. KOFFLER (1973): Immune complex disease in experimental animals and man. *Advances in Immunology* 16: 185–264.
- COLLIN, N., & X. DE RADIGUÈS (2009): Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* 27: 5184–5186.
- CORTI, D., A. L. SUGUITAN, D. PINNA, C. SILACCI, B. M. FERNANDEZ-RODRIGUEZ, F. VANZETTA, C. SANTOS, C. J. LUKE, F. J. TORRES-VELEZ, N. J. TEMPERTON, R. A. WEISS, F. SALLUSTO, K. SUBBARAO & A. LANZAVECCHIA (2010): Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J. Clin. Invest.* 120: 1663–1673.
- COUCH, R. B. (2003): An overview of serum antibody responses to influenza virus antigens. *Dev Biol (Basel)* 115: 25–30.
- COUDEVILLE, L., F. BAILLEUX, B. RICHE, F. MEGAS, P. ANDRE & R. ECOCHARD (2010): Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med Res Methodol* 10: 18.
- CRISCI, E., T. MUSSÁ, L. FRAILE & M. MONTOYA (2013): Review: Influenza virus in pigs. *Mol. Immunol.* 55: 200–211.
- CRIVIANU-GAITA, V., A. ROMASCHIN & M. THOMPSON (2015): High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochem Biophys Rep* 2: 23–28.
- CWACH, K. T., H. R. SANDBULTE, J. M. KLONOSKI & V. C. HUBER (2012): Contribution of murine innate serum inhibitors toward interference within influenza virus immune assays. *Influenza Other Respir Viruses* 6: 127–135.
- DANIEL, M., V. DANIELOVÁ, A. FIALOVÁ, M. MALÝ, B. KRÍŽ & P. A. NUTTALL (2018): Increased relative risk of tick-borne encephalitis in warmer weather. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 20299.
- DAVIDSON, E., C. BRYAN, R. H. FONG, T. BARNES, J. M. PFAFF, M. MABILA, J. B. RUCKER & B. J. DORANZ (2015): Mechanism of binding to Ebola virus glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 cocktail antibodies. *J Virol* 89: 10982–10992.

- DAWOOD, F. S., S. JAIN, L. FINELLI, M. W. SHAW, S. LINDSTROM, R. J. GARTEN, L. V. GUBAREVA, X. XU, C. B. BRIDGES & T. M. UYEKI (2009): Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360: 2605–2615.
- DIXON, F. J., J. D. FELDMAN & J. J. VAZQUEZ (1961): Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113: 899–920.
- DORMITZER, P. R., T. F. TSAI & G. DEL GIUDICE (2012): New technologies for influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 8: 45–58.
- DÖRNEMANN, J., C. BURZIO, A. RONSSE, A. SPRECHER, H. DE CLERCK, M. VAN HERP, M.-C. KOLIÉ, V. YOSIFIVA, S. CALUWAERTS, A. K. MCELROY & A. ANTIERENS (2017): First newborn baby to receive experimental therapies survives Ebola virus disease. *J Infect Dis* 215: 171–174.
- DÖRNER, T., & A. RADBRUCH (2007): Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 27: 384–392.
- DOWALL, S. D., A. BOSWORTH, E. RAYNER, I. TAYLOR, J. LANDON, I. CAMERON, R. COXON, I. AL ABDULLA, V. A. GRAHAM, G. HALL, G. KOBINGER, R. HEWSON & M. W. CARROLL (2016a): Post-exposure treatment of Ebola virus disease in guinea pigs using EBOTAb, an ovine antibody-based therapeutic. *Sci Rep* 6: 30497.
- DOWALL, S. D., J. CALLAN, A. ZELTINA, I. AL-ABDULLA, T. STRECKER, S. K. FEHLING, V. KRÄHLING, A. BOSWORTH, E. RAYNER, I. TAYLOR, S. CHARLTON, J. LANDON, I. CAMERON, R. HEWSON, A. NASIDI, T. A. BOWDEN & M. W. CARROLL (2016b): Development of a cost-effective ovine polyclonal antibody-based product, EBOTAb, to treat Ebola virus infection. *J Infect Dis* 213: 1124–1133.
- DOYLE, T. M., A. M. HASHEM, C. LI, G. VAN DOMSELAAR, L. LAROCQUE, J. WANG, D. SMITH, T. CYR, A. FARNSWORTH, R. HE, A. C. HURT, E. G. BROWN & X. LI (2013): Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. *Antiviral Res.* 100: 567–574.
- DUMONT, J., D. EUWART, B. MEI, S. ESTES & R. KSHIRSAGAR (2016): Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 1110–1122.
- DYE, J. M., A. S. HERBERT, A. I. KUEHNE, J. F. BARTH, M. A. MUHAMMAD, S. E. ZAK, R. A. ORTIZ, L. I. PRUGAR & W. D. PRATT (2012): Postexposure antibody prophylaxis protects nonhuman primates from filovirus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 5034–5039.
- DYE, J. M., H. WU, J. W. HOOPER, S. KHURANA, A. I. KUEHNE, E. M. COYLE, R. A. ORTIZ, S. FUENTES, A. S. HERBERT, H. GOLDING, R. A. BAKKEN, J. M. BRANNAN, S. A. KWILAS, E. J. SULLIVAN, T. C. LUKE, G. SMITH, G. GLENN, W. LI, L. YE, C. YANG, R. W. COMPANS, R. A. TRIPP & J.-A. JIAO (2016): Production of potent fully human polyclonal antibodies against Ebola Zaire virus in transchromosomal cattle. *Sci Rep* 6: 24897.
- EICHELBERGER, M. C., & H. WAN (2015): Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 386: 275–299.
- EKIERT, D. C., G. BHABHA, M.-A. ELSLIGER, R. H. E. FRIESEN, M. JONGENELEN, M. THROSBY, J. GOUDSMIT & I. A. WILSON (2009): Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324: 246–251.
- EMANUEL, J., A. MARZI & H. FELDMANN (2018): Filoviruses: ecology, molecular biology, and evolution. *Adv. Virus Res.* 100: 189–221.
- FAN, E. X. (2003): SARS: Economic impacts and implications. Bd. 15 ERD Policy Brief, Economics and Reseach Department. Manila.
- FARNSWORTH, A., T. D. CYR, C. LI, J. WANG & X. LI (2011): Antigenic stability of H1N1 pandemic vaccines correlates with vaccine strain. *Vaccine* 29: 1529–1533.
- FELDMANN, H., & T. W. GEISBERT (2011): Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* 377: 849–862.

- FENNER, F., D. A. HENDERSON, I. ARITA, Z. JEZEK & I. D. LADNYI (1988): Smallpox and its eradication. Bd. 6 History of international public health. Geneva.
- FERGUSON, M., G. RISI, M. DAVIS, E. SHELDON, M. BARON, P. LI, M. MADARIAGA, L. FRIES, O. GODEAUX & D. VAUGHN (2012): Safety and long-term humoral immune response in adults after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza vaccine with or without AS03 adjuvant. *J Infect Dis* 205: 733–744.
- FIERS, W., M. de FILETTE, K. EL BAKKOURI, B. SCHEPENS, K. ROOSE, M. SCHOTSAERT, A. BIRKETT & X. SAELENS (2009): M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 27: 6280–6283.
- FILETTE, M. de, W. FIERS, W. MARTENS, A. BIRKETT, A. RAMNE, B. LÖWENADLER, N. LYCKE, W. M. JOU & X. SAELENS (2006): Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* 24: 6597–6601.
- FINEBERG, H. V. (2014): Pandemic preparedness and response: lessons from the H1N1 influenza of 2009. *N. Engl. J. Med.* 370: 1335–1342.
- FRASER, C., C. A. DONNELLY, S. CAUCHEMEZ, W. P. HANAGE, M. D. VAN KERKHOVE, T. D. HOLLINGSWORTH, J. GRIFFIN, R. F. BAGGALEY, H. E. JENKINS, E. J. LYONS, T. JOMBART, W. R. HINSLEY, N. C. GRASSLY, F. BALLOUX, A. C. GHANI, N. M. FERGUSON, A. RAMBAUT, O. G. PYBUS, H. LOPEZ-GATELL, C. M. ALPUCHE-ARANDA, I. B. CHAPELA, E. P. ZAVALA, D. M. E. GUEVARA, F. CHECCHI, E. GARCIA, S. HUGONNET & C. ROTH (2009): Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324: 1557–1561.
- FREY, S., T. VESIKARI, A. SZYMCZAKIEWICZ-MULTANOWSKA, M. LATTANZI, A. IZU, N. GROTH & S. HOLMES (2010): Clinical efficacy of cell culture-derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. *Clin. Infect. Dis.* 51: 997–1004.
- GAGNON, P. (2012): Technology trends in antibody purification. *J Chromatogr A* 1221: 57–70.
- GAMBARYAN, A. S., J. S. ROBERTSON & M. N. MATROSOVICH (1999): Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* 258: 232–239.
- GARÇON, N., G. LEROUX-ROELS & W.-F. CHENG (2011): Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology* 1: 89–113.
- GARÇON, N., D. W. VAUGHN & A. M. DIDIERLAURENT (2012): Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing  $\alpha$ -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev Vaccines* 11: 349–366.
- GARTEN, R. J., C. T. DAVIS, C. A. RUSSELL, B. SHU, S. LINDSTROM, A. BALISH, W. M. SESSIONS, X. XU, E. SKEPNER, V. DEYDE, M. OKOMO-ADHIAMBO, L. GUBAREVA, J. BARNES, C. B. SMITH, S. L. EMERY, M. J. HILLMAN, P. RIVAILLER, J. SMAGALA, M. de GRAAF, D. F. BURKE, R. A. M. FOUCHIER, C. PAPPAS, C. M. ALPUCHE-ARANDA, H. LOPEZ-GATELL, H. OLIVERA, I. LOPEZ, C. A. MYERS, D. FAIX, P. J. BLAIR, C. YU, K. M. KEENE, P. D. DOTSON, JR, D. BOXRUD, A. R. SAMBOL, S. H. ABID, K. ST GEORGE, T. BANNERMAN, A. L. MOORE, D. J. STRINGER, P. BLEVINS, G. J. DEMMLER-HARRISON, M. GINSBERG, P. KRINER, S. WATERMAN, S. SMOLE, H. F. GUEVARA, E. A. BELONGIA, P. A. CLARK, S. T. BEATRICE, R. DONIS, J. KATZ, L. FINELLI, C. B. BRIDGES, M. SHAW, D. B. JERNIGAN, T. M. UYEKI, D. J. SMITH, A. I. KLIMOV & N. J. COX (2009): Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325: 197–201.
- GEISBERT, T. W. (2017): First Ebola virus vaccine to protect human beings? *Lancet* 389: 479–480.
- GEISBERT, T. W., K. M. DADDARIO-DICAPRIO, M. G. LEWIS, J. B. GEISBERT, A. GROLLA, A. LEUNG, J. PARAGAS, L. MATTHIAS, M. A. SMITH, S. M. JONES, L. E. HENSLEY, H. FELDMANN & P. B. JAHRLING (2008): Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog.* 4: e1000225.
- GEISBERT, T. W., & H. FELDMANN (2011): Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis* 204 Suppl 3: 81.

- GERMUTH, F. G. (1953a): A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J. Exp. Med.* 97: 257–282.
- GERMUTH, F. G. (1953b): The mechanism of action of cortisone in experimental hypersensitivity. II. Hypersensitivity of the serum sickness type. *J. Exp. Med.* 98: 1–12.
- GHOSH, R. (2002): Protein separation using membrane chromatography. Opportunities and challenges. *J Chromatogr A* 952: 13–27.
- GILCA, V., G. de SERRES, M.-E. HAMELIN, G. BOIVIN, M. OUAKKI, N. BOULIANNE, C. SAUVAGEAU, M. DIONNE, R. GILCA & D. SKOWRONSKI (2011): Antibody persistence and response to 2010–2011 trivalent influenza vaccine one year after a single dose of 2009 AS03-adjuvanted pandemic H1N1 vaccine in children. *Vaccine* 30: 35–41.
- GIRARD, M. P., J. S. TAM, O. M. ASSOSSOU & M. P. KIENY (2010): The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28: 4895–4902.
- GRAHAM, B. S., & D. M. AMBROSINO (2015): History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. *Curr Opin HIV AIDS* 10: 129–134.
- GRAHAM, B. S., & N. J. SULLIVAN (2018): Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic. *Nat. Immunol.* 19: 20–28.
- GREENSPAN, N. S. (2017): Celebrating more than a century of research on antibodies: affirmation through negation via complex formation. *Pathog Immun* 2: 60–65.
- GREGORIO, E. de, E. CAPRONI & J. B. ULMER (2013): Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol* 4: 214.
- GRIENSVEN, J. van, T. EDWARDS, X. de LAMBALLERIE, M. G. SEMPLE, P. GALLIAN, S. BAIZE, P. W. HORBY, H. RAOUL, N. F. MAGASSOUBA, A. ANTIERENS, C. LOMAS, O. FAYE, A. A. SALL, K. FRANSEN, J. BUYZE, R. RAVINETTO, P. TIBERGHEN, Y. CLAEYS, M. de CROP, L. LYNEN, E. I. BAH, P. G. SMITH, A. DELAMOU, A. de WEGGHELEIRE & N. HABA (2016): Evaluation of convalescent Plasma for Ebola virus disease in guinea. *N. Engl. J. Med.* 374: 33–42.
- GROBUSCH, M. P., & A. GOORHUIS (2017): Safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus vector-based Ebola vaccine. *Lancet* 389: 578–580.
- GUARNACCIA, T., L. A. CAROLAN, S. MAURER-STROH, R. T. C. LEE, E. JOB, P. C. READING, S. PETRIE, J. M. MCCAW, J. MCVERNON, A. C. HURT, A. KELSO, J. MOSSE, I. G. BARR, K. L. LAURIE & K. SUBBARAO (2013): Antigenic drift of the pandemic 2009 A(H1N1) Influenza virus in a ferret model. *PLoS Pathog.* 9: e1003354.
- GUPTA, P.S., S. GOYAL, R. KAPOOR, V.K. BATRA & B.K. JAIN (1980): Intrathecal human tetanus immunoglobulin in early tetanus. *Lancet* 316: 439–440.
- HAKIM, H., K. J. ALLISON, L.-A. VAN DE VELDE, L. TANG, Y. SUN, P. M. FLYNN & J. A. MCCULLERS (2016): Immunogenicity and safety of high-dose trivalent inactivated influenza vaccine compared to standard-dose vaccine in children and young adults with cancer or HIV infection. *Vaccine* 34: 3141–3148.
- HAMMARLUND, E., M. W. LEWIS, S. G. HANSEN, L. I. STRELOW, J. A. NELSON, G. J. SEXTON, J. M. HANIFIN & M. K. SLIFKA (2003): Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* 9: 1131–1137.
- HAQ, Z., M. MALIK & W. KHAN (2016): The H1N1 influenza pandemic of 2009 in the Eastern Mediterranean Region: lessons learnt and future strategy. *Eastern Mediterranean Health Journal* 7: 548–525.
- HARDING, A. T., B. E. HEATON, R. E. DUMM & N. S. HEATON (2017): Rationally designed Influenza virus vaccines that are antigenically stable during growth in eggs. *mBio* 8.
- HARDING, F. A., M. M. STICKLER, J. RAZO & R. B. DUBRIDGE (2010): The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs* 2: 256–265.

- HASSON, S. S. A. A., J. K. Z. AL-BUSAIDI & T. A. SALLAM (2015): The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pac J Trop Biomed* 5: 344–353.
- HAYDEN, F. G., & A. J. HAY (1992): Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 119–130.
- HENDERSON, D. A., J. J. WITTE, L. MORRIS & A. D. LANGMUIR (1964): Paralytic disease associated with oral polio vaccines. *JAMA* 190.
- HESSEL, L. (2009): Pandemic influenza vaccines. Meeting the supply, distribution and deployment challenges. *Influenza Other Respir Viruses* 3: 165–170.
- HILLEMANN, M. R., E. B. BUYNACK, R. E. WEIBEL & J. STOKES (1968): Live, attenuated mumps-virus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 278: 227–232.
- HOENEN, T., V. VOLCHKOV, L. KOLESNIKOVA, E. MITTLER, J. TIMMINS, M. OTTMANN, O. REYNARD, S. BECKER & W. WEISSENHORN (2005): VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *J Virol* 79: 1898–1905.
- HUANG, Z.-Z., L. YU, P. HUANG, L.-J. LIANG & Q. GUO (2017): Charged amino acid variability related to N-glyco -sylation and epitopes in A/H3N2 influenza: hemagglutinin and neuraminidase. *PloS one* 12: e0178231.
- HUSE, K., H.-J. BÖHME & G. H. SCHOLZ (2002): Purification of antibodies by affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51: 217–231.
- HUTTNER, A., J.-A. DAYER, S. YERLY, C. COMBESCURE, F. AUDERSET, J. DESMEULES, M. EICKMANN, A. FINCKH, A. R. GONCALVES, J. W. HOOPER, G. KAYA, V. KRÄHLING, S. KWILAS, B. LEMAÎTRE, A. MATTHEY, P. SILVERA, S. BECKER, P. E. FAST, V. MOORTHY, M. P. KIENY, L. KAISER & C.-A. SIEGRIST (2015): The effect of dose on the safety and immunogenicity of the VSV Ebola candidate vaccine. A randomised double-blind, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 15: 1156–1166.
- INMAN, R. D., J. C. DAVIS, D. VAN DER HEIJDE, L. DIEKMAN, J. SIEPER, S. I. KIM, M. MACK, J. HAN, S. VISVANATHAN, Z. XU, B. HSU, A. BEUTLER & J. BRAUN (2008): Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum.* 58: 3402–3412.
- IULIANO, A. D., K. M. ROGUSKI, H. H. CHANG, D. J. MUSCATELLO, R. PALEKAR, S. TEMPIA, C. COHEN, J. M. GRAN, D. SCHANZER, B. J. COWLING, P. WU, J. KYNCL, L. W. ANG, M. PARK, M. REDLBERGER-FRITZ, H. YU, L. ESPENHAIN, A. KRISHNAN, G. EMUKULE, L. VAN ASTEN, S. PEREIRA DA SILVA, S. AUNGKULANON, U. BUCHHOLZ, M.-A. WIDDOWSON, J. S. BRESEE, E. AZZIZ-BAUMGARTNER, P.-Y. CHENG, F. DAWOOD, I. FOPPA, S. OLSEN, M. HABER, C. JEFFERS, C. R. MACINTYRE, A. T. NEWALL, J. G. WOOD, M. KUNDI, T. POPOW-KRAUPP, M. AHMED, M. RAHMAN, F. MARINHO, C. V. SOTOMAYOR PROSCHLE, N. VERGARA MALLEGAS, F. LUZHAO, L. SA, J. BARBOSA-RAMÍREZ, D. M. SANCHEZ, L. A. GOMEZ, X. B. VARGAS, A. ACOSTA HERRERA, M. J. LLANÉS, T. K. FISCHER, T. G. KRAUSE, K. MØLBAK, J. NIELSEN, R. TREBBIEN, A. BRUNO, J. OJEDA, H. RAMOS, M. AN DER HEIDEN, L. DEL CARMEN CASTILLO SIGNOR, C. E. SERRANO, R. BHARDWAJ, M. CHADHA, V. NARAYAN, S. KOSEN, M. BROMBERG, A. GLATMAN-FREEDMAN, Z. KAUFMAN, Y. ARIMA, K. OISHI, S. CHAVES, B. NYAWANDA, R. A. AL-JARALLAH, P. A. KURI-MORALES, C. R. MATUS, M. E. J. CORONA, A. BURMAA, O. DARMAA, M. OBTEL, I. CHERKAoui, C. C. VAN DEN WIJNGAARD, W. VAN DER HOEK, M. BAKER, D. BANDARANAYAKE, A. BISSIELO, S. HUANG, L. LOPEZ, C. NEWBERN, E. FLEM, G. M. GRØNENG, S. HAUGE, F. G. DE COSÍO, Y. DE MOLTÓ, L. M. CASTILLO, M. A. CABELLO, M. VON HOROCH, J. MEDINA OSIS, A. MACHADO, B. NUNES, A. P. RODRIGUES, E. RODRIGUES, C. CALOMFIRESCU, E. LUPULESCU, R. POPESCU, O. POPOVICI, D. BOGDANOVIC, M. KOSTIC, K. LAZAREVIC, Z. MILOSEVIC, B. TIODOROVIC, M. CHEN, J. CUTTER, V. LEE, R. LIN, S. MA, A. L. COHEN, F. TREURNICHT, W. J. KIM, C. DELGADO-SANZ, S. DE MATEO ONTAÑÓN, A. LARRAURI, I. L. LEÓN, F. VALLEJO, R. BORN, C. JUNKER, D. KOCH, J.-H. CHUANG, W.-T. HUANG, H.-W. KUO, Y.-C. TSAI, K. BUNDHAMCHAROEN, M. CHITTAGANPITCH, H. K. GREEN, R. PEBODY, N. GOÑI, H. CHIPARELLI, L. BRAMMER & D. MUSTAQUIM

- (2017): Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality. A modelling study. *Lancet*.
- JAHRLING, P. B., J. GEISBERT, J. R. SWEARENGEN, G. P. JAAX, T. LEWIS, J. W. HUGGINS, J. J. SCHMIDT, J. W. LEDUC & C. J. PETERS (1996): Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. *Arch. Virol. Suppl.* 11: 135–140.
- JAHRLING, P. B., J. B. GEISBERT, J. R. SWEARENGEN, T. LARSEN & T. W. GEISBERT (2007): Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: 3.
- JANG, Y. H., Y. H. BYUN, Y. J. LEE, Y. H. LEE, K.-H. LEE & B. L. SEONG (2012): Cold-adapted pandemic 2009 H1N1 influenza virus live vaccine elicits cross-reactive immune responses against seasonal and H5 influenza A viruses. *J Virol* 86: 5953–5958.
- JASENOSKY, L. D., G. NEUMANN, I. LUKASHEVICH & Y. KAWAOKA (2001): Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 75: 5205–5214.
- JENNER, E. (1799): Further observations on the variolæ vaccinæ, or cow pox. London.
- JHAVERI, R., W. ROSENFELD, J. D. SALAZAR, H. DOSIK, C.-C. CHENG & H. E. EVANS (1980): High titer multiple dose therapy with HBIG in newborn infants of HBsAg positive mothers. *J. Pediatr.* 97: 305–308.
- JIANG, S., Y. HE & S. LIU (2005): SARS vaccine development. *Emerging Infect. Dis.* 11: 1016–1020.
- JOHANSEN, K., A. NICOLL, B. C. CIANCIO & P. KRAMARZ (2009): Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the European Union. *Eurosurveillance* 14: 19361.
- JONES, K. E., N. G. PATEL, M. A. LEVY, A. STOREYGARD, D. BALK, J. L. GITTLEMAN & P. DASZAK (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990–993.
- JONG, J. C. de, A. M. PALACHE, W. E. P. BEYER, G. F. RIMMELZWAAN, A. C. M. BOON & A. D. M. E. OSTERHAUS (2003): Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel)* 115: 63–73.
- JOSEPH, U., M. LINSTER, Y. SUZUKI, S. KRAUSS, R. A. HALPIN, D. VIJAYKRISHNA, T. P. FABRIZIO, T. M. BESTEBROER, S. MAURER-STROH, R. J. WEBBY, D. E. WENTWORTH, R. A. M. FOUCHIER, J. BAHL & SMITH, GAVIN J. D. (2015): Adaptation of pandemic H2N2 Influenza A viruses in humans. *J Virol* 89: 2442–2447.
- KAHN, J. O., F. SINANGIL, J. BAENZIGER, N. MURCAR, D. WYNNE, R. L. COLEMAN, K. S. STEIMER, C. L. DEKKER & D. CHERNOFF (1994): Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers. *J Infect Dis* 170: 1288–1291.
- KANAGARAJAN, S., C. TOLF, A. LUNDGREN, J. WALDENSTRÖM & P. E. BRODELIUS (2012): Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*. *PloS one* 7: e33010.
- KATZ, S. L., C. H. KEMPE, F. L. BLACK, M. L. LEPOW, S. KRUGMAN, R. J. HAGGERTY & J. F. ENDERS (1960): Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccination. *Am. J. Dis. Child.* 100: 942–946.
- KAUFMAN, D. R., M. BIVAS-BENITA, N. L. SIMMONS, D. MILLER & D. H. BAROUCH (2010): Route of adenovirus-based HIV-1 vaccine delivery impacts the phenotype and trafficking of vaccine-elicited CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 84: 5986–5996.
- KELLER, M. A., & E. R. STIEHM (2000): Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 602–614.
- KHAN, A. S., F. K. TSHIOKO, D. L. HEYMANN, B. LE GUENNO, P. NABETH, B. KERSTIËNS, Y. FLEERACKERS, P. H. KILMARX, G. R. RODIER, O. NKUKU, P. E. ROLLIN, A. SANCHEZ, S. R. ZAKI, R. SWANEPOEL, O. TOMORI, S. T. NICHOL, C. J. PETERS, J. J. MUYEMBE-TAMFUM & T. G. KSIAZEK (1999): The reemergence of

- Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit. *J Infect Dis* 179 Suppl 1: 86.
- KHAN, K. H. (2013): DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* 3: 26–35.
- KILLION, J. J., & E. M. HOLTGREWE (1983): Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin G. *Clin. Chem.* 29: 1982–1984.
- KLENK, H. D., R. ROTT, M. ORLICH & J. BLÖDORN (1975): Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68: 426–439.
- KOBINGER, G. P., I. MEUNIER, A. PATEL, S. PILLET, J. GREN, S. STEBNER, A. LEUNG, J. L. NEUFELD, D. KOBASA & V. von MESSLING (2010): Assessment of the efficacy of commercially available and candidate vaccines against a pandemic H1N1 2009 virus. *J Infect Dis* 201: 1000–1006.
- KÖHLER, G., & C. MILSTEIN (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497.
- KONDURU, K., A. C. SHURTLEFF, S. BAVARI & G. KAPLAN (2018): High degree of correlation between Ebola virus BSL-4 neutralization assays and pseudotyped VSV BSL-2 fluorescence reduction neutralization test. *J. Virol. Methods* 254: 1–7.
- KRÄHLING, V., D. BECKER, C. ROHDE, M. EICKMANN, Y. EROĞLU, A. HERWIG, R. KERBER, K. KOWALSKI, J. VERGARA-ALERT & S. BECKER (2016): Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 205: 173–183.
- KREIJTZ, J. H. C. M., R. A.M. FOUCHIER & G. F. RIMMELZWAAN (2011): Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 162: 19–30.
- KREMER, M., A. VOLZ, J. H. C. M. KREIJTZ, R. FUX, M. H. LEHMANN & G. SUTTER (2012): Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA. *Methods Mol. Biol.* 890: 59–92.
- KREUDER JOHNSON, C., P. L. HITCHENS, T. SMILEY EVANS, T. GOLDSTEIN, K. THOMAS, A. CLEMENTS, D. O. JOLY, N. D. WOLFE, P. DASZAK, W. B. KARESH & J. K. MAZET (2015): Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Sci Rep* 5: 14830.
- KUGELMAN, J. R., M. SANCHEZ-LOCKHART, K. G. ANDERSEN, S. GIRE, D. J. PARK, R. SEALFON, A. E. LIN, S. WOHL, P. C. SABETI, J. H. KUHN & G. F. PALACIOS (2015): Evaluation of the potential impact of Ebola virus genomic drift on the efficacy of sequence-based candidate therapeutics. *mBio* 6.
- KUSHNIR, N., S. J. STREATFIELD & V. YUSIBOV (2012): Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31: 58–83.
- KUUS-REICHEL, K., L. S. GRAUER, L. M. KARAVODIN, C. KNOTT, M. KRUSEMEIER & N. E. KAY (1994): Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1: 365–372.
- LAMBERT, L. C., & A. S. FAUCI (2010): Influenza vaccines for the future. *N. Engl. J. Med.* 363: 2036–2044.
- LAZAROWITZ, S. G., & P. W. CHOPPIN (1975): Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68: 440–454.
- LAZAROWITZ, S. G., R. W. COMPANS & P. W. CHOPPIN (1973): Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* 52: 199–212.
- LEE, J. E., & E. O. SAPHIRE (2009): Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol* 4: 621–635.
- LEE, S. S., K. PHY, K. PEDEN & L. SHENG-FOWLER (2017): Development of a micro-neutralization assay for ebolaviruses using a replication-competent vesicular stomatitis hybrid virus and a quantitative PCR readout. *Vaccine* 35: 5481–5486.

- LEFEVRE, E. A., B. V. CARR, H. PRENTICE & B. CHARLESTON (2009): A quantitative assessment of primary and secondary immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay. *Vet. Res.* 40: 3.
- LEÓN, G., M. HERRERA, Á. SEGURA, M. VILLALTA, M. VARGAS & J. M. GUTIÉRREZ (2013): Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon* 76: 63–76.
- LEROUX-ROELS, G., P. BONANNI, T. TANTAWICHEN & F. ZEPP (2011): Vaccine development. *Perspectives in Vaccinology* 1: 115–150.
- LEROUX-ROELS, I., A. BORKOWSKI, T. VANWOLLEGHEM, M. DRAMÉ, F. CLEMENT, E. HONS, J.-M. DEVASTER & G. LEROUX-ROELS (2007): Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 580–589.
- LINDSEY, N. P., B. A. SCHROEDER, E. R. MILLER, M. M. BRAUN, A. F. HINCKLEY, N. MARANO, B. A. SLADE, E. D. BARNETT, G. W. BRUNETTE, K. HORAN, J. E. STAPLES, P. E. KOZARSKY & E. B. HAYES (2008): Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine* 26: 6077–6082.
- LINGWOOD, D., P. M. MCTAMNEY, H. M. YASSINE, J. R. R. WHITTLE, X. GUO, J. C. BOYINGTON, C.-J. WEI & G. J. NABEL (2012): Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies. *Nature* 489: 566–570.
- LITTLER, E., & B. OBERG (2005): Achievements and challenges in antiviral drug discovery. *Antivir. Chem. Chemother.* 16: 155–168.
- LIU, Y., J. ZHOU, Z. YU, D. FANG, C. FU, X. ZHU, Z. HE, H. YAN & L. JIANG (2014): Tetravalent recombinant dengue virus-like particles as potential vaccine candidates: immunological properties. *BMC Microbiol.* 14: 233.
- LOU, Z., Y. SUN & Z. RAO (2014): Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* 35: 86–102.
- LÖWER, J. (2010): Pandemieimpfstoffe. Überlegungen zum Design im Vorfeld der Influenzapandemie 2009. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 53: 1238–1241.
- LUCZKOWIAK, J., J. R. ARRIBAS, S. GÓMEZ, V. JIMÉNEZ-YUSTE, F. de LA CALLE, A. VIEJO & R. DELGADO (2016): Specific neutralizing response in plasma from convalescent patients of Ebola virus disease against the West Africa Makona variant of Ebola virus. *Virus Res.* 213: 224–229.
- LYON, G. M., A. K. MEHTA, J. B. VARKEY, K. BRANTLY, L. PLYLER, A. K. MCELROY, C. S. KRAFT, J. S. TOWNER, C. SPIROPOULOU, U. STRÖHER, T. M. UYEKI & B. S. RIBNER (2014): Clinical care of two patients with Ebola virus disease in the United States. *N. Engl. J. Med.* 371: 2402–2409.
- MANDOUR, M., I. VliegEN, J. PAESHUYSE & J. NEYTS (2018): Rational design of antiviral drug combinations based on equipotency using HCV subgenomic replicon as an in vitro model. *Antiviral Res.* 149: 150–153.
- MANZOLI, L., C. de VITO, G. SALANTI, M. D'ADDARIO, P. VILLARI & J. P. A. IOANNIDIS (2011): Meta-analysis of the immunogenicity and tolerability of pandemic influenza A 2009 (H1N1) vaccines. *PloS one* 6: e24384.
- MARQUES, E. T. A., & D. S. BURKE (2018): Tradition and innovation in development of a Zika vaccine. *Lancet* 391: 516–517.
- MARTELLI, P., L. FERRARI, M. MORGANTI, E. de ANGELIS, P. BONILAURI, S. GUAZZETTI, A. CALEFFI & P. BORGHETTI (2011): One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet. Microbiol.* 149: 339–351.
- MARZI, A., & H. FELDMANN (2014): Ebola virus vaccines: an overview of current approaches. *Expert Rev Vaccines* 13: 521–531.

- MATSUOKA, Y., H. MATSUMAE, M. KATOH, A. J. EISFELD, G. NEUMANN, T. HASE, S. GHOSH, J. E. SHOEMAKER, T. J. S. LOPES, T. WATANABE, S. WATANABE, S. FUKUYAMA, H. KITANO & Y. KAWAOKA (2013): A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol* 7: 97.
- MAURER-STROH, S., J. MA, R. T. C. LEE, F. L. SIROTA & F. EISENHABER (2009): Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites. *Biol. Direct* 4: 18.
- MEDLOCK, J. M., & S. A. LEACH (2015): Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect Dis* 15: 721–730.
- MENDOZA, E. J., T. RACINE & G. P. KOBINGER (2017): The ongoing evolution of antibody-based treatments for Ebola virus infection. *Immunotherapy* 9: 435–450.
- MESSLING, V. von, G. ZIMMER, G. HERRLER, L. HAAS & R. CATTANEO (2001): The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of virology* 75: 6418–6427.
- MITTLER, E., L. KOLESNIKOVA, B. HARTLIEB, R. DAVEY & S. BECKER (2011): The cytoplasmic domain of Marburg virus GP modulates early steps of viral infection. *J Virol* 85: 8188–8196.
- MODJARRAD, K. (2016): MERS-CoV vaccine candidates in development: The current landscape. *Vaccine* 34: 2982–2987.
- MOHSEN, M. O., L. ZHA, G. CABRAL-MIRANDA & M. F. BACHMANN (2017): Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* 34: 123–132.
- MOREL, S., A. DIDIERLAURENT, P. BOURGUIGNON, S. DELHAYE, B. BARAS, V. JACOB, C. PLANTY, A. ELOUAHABI, P. HARVENGT, H. CARLSEN, A. KIELLAND, P. CHOMEZ, N. GARÇON & M. VAN MECHELEN (2011): Adjuvant System AS03 containing  $\alpha$ -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29: 2461–2473.
- MÜHLBERGER, E. (2007): Filovirus replication and transcription. *Future Virol* 2: 205–215.
- MUPAPA, K., M. MASSAMBA, K. KIBADI, K. KUVULA, A. BWAKA, M. KIPASA, R. COLEBUNDERS & J. J. MUYEMBE-TAMFUM (1999): Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *J Infect Dis* 179 Suppl 1: 23.
- MURPHY, B. R., & E. E. WALSH (1988): Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. *J. Clin. Microbiol.*: 1595–1597.
- NABEL, G. J., & A. S. FAUCI (2010): Induction of unnatural immunity: Prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nat. Med.* 16: 1389–1391.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2007): Biological Sciences Curriculum Study. Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/>. (Download am 25.03.2018).
- NELSON, A. L. (2010): Antibody fragments: hope and hype. *mAbs* 2: 77–83.
- NELSON, P. N., G. M. REYNOLDS, E. E. WALDRON, E. WARD, K. GIANNOPOULOS & P. G. MURRAY (2000): Monoclonal antibodies. *MP, Mol. Pathol.* 53: 111–117.
- NEUMANN, G., T. NODA & Y. KAWAOKA (2009): Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931–939.
- NEWCOMBE, C., & A. R. NEWCOMBE (2007): Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848: 2–7.
- NOAD, R., & P. ROY (2003): Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11: 438–444.
- O'HAGAN, D. T., G. S. OTT, G. VAN NEST, R. RAPPUOLI & G. D. GIUDICE (2013): The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines* 12: 13–30.
- OLINGER, G. G., J. PETTITT, D. KIM, C. WORKING, O. BOHOROV, B. BRATCHER, E. HIATT, S. D. HUME, A. K. JOHNSON, J. MORTON, M. PAULY, K. J. WHALEY, C. M. LEAR, J. E. BIGGINS, C. SCULLY, L. HENSLEY & L.

- ZEITLIN (2012): Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 18030–18035.
- OSWALD, W. B., T. W. GEISBERT, K. J. DAVIS, J. B. GEISBERT, N. J. SULLIVAN, P. B. JAHRLING, P. W. H. I. PARREN & D. R. BURTON (2007): Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog.* 3: e9.
- PALESE, P. (2004): Influenza: old and new threats. *Nat. Med.* 10: 7.
- PANDEY, A., N. SINGH, S. SAMBHARA & S. K. MITTAL (2010): Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Hum Vaccin* 6: 178–188.
- PARKIN, J., & B. COHEN (2001): An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777–1789.
- PARREN, P. W. H. I., T. W. GEISBERT, T. MARUYAMA, P. B. JAHRLING & D. R. BURTON (2002): Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *J Virol* 76: 6408–6412.
- PARTRIDGE, J., & M. P. KIENY (2010): Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccines in 2009–2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. *Vaccine* 28: 4709–4712.
- PAUL EHRlich (1897): Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und dessen theoretische Grundlagen. Bd. 6 *Klinisches Jahrbuch*. Jena.
- PAUWELS, R. (2006): Aspects of successful drug discovery and development. *Antiviral Res.* 71: 77–89.
- PFLEIDERER, M. (2010): Pandemische Influenzaimpfstoffe. *Bundesgesundheitsbl.* 53: 1242–1249.
- PILLET, S., É. AUBIN, S. TRÉPANIER, D. BUSSIÈRE, M. DARGIS, J.-F. POULIN, B. YASSINE-DIAB, B. J. WARD & N. LANDRY (2016): A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. *Clin. Immunol.* 168: 72–87.
- PLOTKIN, S. (2014): History of vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 12283–12287.
- PLOTKIN, S. A. (2008): Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis* 47: 401–409.
- PLOTKIN, S. A., J. D. FARQUHAR, M. KATZ & F. BUSER (1969): Attenuation of RA 27-3 rubella virus in WI-38 human diploid cells. *Am. J. Dis. Child.* 118: 178–185.
- POULET, H., J. MINKE, M. C. PARDO, V. JUILLARD, B. NORDGREN & J.-C. AUDONNET (2007): Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform. *Vaccine* 25: 5606–5612.
- PULENDRAN, B., & R. AHMED (2011): Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12: 509–517.
- QIU, X., J. AUDET, G. WONG, S. PILLET, A. BELLO, T. CABRAL, J. E. STRONG, F. PLUMMER, C. R. CORBETT, J. B. ALIMONTI & G. P. KOBINGER (2012): Successful treatment of ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies. *Sci Transl Med* 4: 138.
- QIU, X., & G. P. KOBINGER (2014): Antibody therapy for Ebola. *Hum Vaccin Immunother* 10: 964–967.
- RACKEMANN, F. M. (1943): Allergy. *Arch. Intern. Med.* 71: 107.
- RASSOW, J., K. HAUSER, R. NETZKER & R. DEUTZMANN (2016): *Biochemie*. Stuttgart.
- RAYMOND, D. D., S. M. STEWART, J. LEE, J. FERDMAN, G. BAJIC, K. T. DO, M. J. ERNANDES, P. SUPHAPHIPHAT, E. C. SETTEMBRE, P. R. DORMITZER, G. DEL GIUDICE, O. FINCO, T. H. KANG, G. C. IPPOLITO, G. GEORGIU, T. B. KEPLER, B. F. HAYNES, M. A. MOODY, H.-X. LIAO, A. G. SCHMIDT & S. C. HARRISON (2016): Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat. Med.* 22: 1465–1469.
- RAZONABLE, R. R. (2011): Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin. Proc.* 86: 1009–1026.

- REICHERT, J. M., C. J. ROSENSWEIG, L. B. FADEN & M. C. DEWITZ (2005): Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* 23: 1073–1078.
- REWAR, S., & D. MIRDHA (2014): Transmission of ebola virus disease: an overview. *Ann Glob Health* 80: 444–451.
- ROBERT-GUROFF, M. (2007): Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 546–556.
- ROBERTSON, J. S., J. S. BOOTMAN, R. NEWMAN, J. S. OXFORD, R. S. DANIELS, R. G. WEBSTER & G. C. SCHILD (1987): Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. *Virology* 160: 31–37.
- ROBERTSON, J. S., C. NICOLSON, R. HARVEY, R. JOHNSON, D. MAJOR, K. GUILFOYLE, S. ROSEBY, R. NEWMAN, R. COLLIN, C. WALLIS, O. G. ENGELHARDT, J. M. WOOD, J. LE, R. MANOJKUMAR, B. A. POKORNY, J. SILVERMAN, R. DEVIS, D. BUCHER, E. VERITY, C. AGIUS, S. CAMUGLIA, C. ONG, S. ROCKMAN, A. CURTIS, P. SCHOOF, O. ZOUEVA, H. XIE, X. LI, Z. LIN, Z. YE, L.-M. CHEN, E. O'NEILL, A. BALISH, A. S. LIPATOV, Z. GUO, I. ISAKOVA, C. T. DAVIS, P. RIVAILLER, K. M. GUSTIN, J. A. BELSER, T. R. MAINES, T. M. TUMPEY, X. XU, J. M. KATZ, A. KLIMOV, N. J. COX & R. O. DONIS (2011): The development of vaccine viruses against pandemic A(H1N1) influenza. *Vaccine* 29: 1836–1843.
- ROBERTSON, J. S., C. NICOLSON, D. MAJOR, E. W. ROBERTSON & J. M. WOOD (1993): The role of amniotic passage in the egg-adaptation of human influenza virus is revealed by haemagglutinin sequence analyses. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 10): 2047–2051.
- ROCHA, B., & C. TANCHOT (2004): Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory. The role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 259–263.
- ROTH, A., A. MERCIER, C. LEPERS, D. HOY, S. DUITUTURAGA, E. BENYON, L. GUILLAUMOT & Y. SOUARÈS (2014): Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* 19.
- ROUGERON, V., H. FELDMANN, G. GRARD, S. BECKER & E. M. LEROY (2015): Ebola and Marburg haemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* 64: 111–119.
- RUSSELL, R. J., P. S. KERRY, D. J. STEVENS, D. A. STEINHAEUER, S. R. MARTIN, S. J. GAMBLIN & J. J. SKEHEL (2008): Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 17736–17741.
- SADLER, A. J., & B. R. G. WILLIAMS (2008): Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 559–568.
- SAEED, M. F., A. A. KOLOKOLTSOV, A. N. FREIBERG, M. R. HOLBROOK & R. A. DAVEY (2008): Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog.* 4: e1000141.
- SALLUSTO, F., A. LANZAVECCHIA, K. ARAKI & R. AHMED (2010): From Vaccines to Memory and Back. *Immunity* 33: 451–463.
- SANDBULTE, M. R., K. B. WESTGEEST, J. GAO, X. XU, A. I. KLIMOV, C. A. RUSSELL, D. F. BURKE, D. J. SMITH, R. A. M. FOUCHIER & M. C. EICHELBERGER (2011): Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 20748–20753.
- SCHIEFFELIN, J. S., J. G. SHAFFER, A. GOBA, M. GBAKIE, S. K. GIRE, A. COLUBRI, R. S. G. SEALFON, L. KANNEH, A. MOIGBOI, M. MOMOH, M. FULLAH, L. M. MOSES, B. L. BROWN, K. G. ANDERSEN, S. WINNICKI, S. F. SCHAFFNER, D. J. PARK, N. L. YOZWIAK, P.-P. JIANG, D. KARGBO, S. JALLOH, M. FONNIE, V. SINNAH, I. FRENCH, A. KOVOMA, F. K. KAMARA, V. TUCKER, E. KONUWA, J. SELLU, I. MUSTAPHA, M. FODAY, M. YILLAH, F. KANNEH, S. SAFFA, J. L. B. MASSALLY, M. L. BOISEN, L. M. BRANCO, M. A. VANDI, D. S. GRANT, C. HAPPI, S. M. GEVAO, T. E. FLETCHER, R. A. FOWLER, D. G. BAUSCH, P. C. SABETI, S. H. KHAN

- & R. F. GARRY (2014): Clinical illness and outcomes in patients with Ebola in Sierra Leone. *N. Engl. J. Med.* 371: 2092–2100.
- SCHRAUWEN, E. J. A., & R. A. M. FOUCHIER (2014): Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect* 3: e9.
- SCHREIBER, S., M. KHALIQ-KAREEMI, I. C. LAWRENCE, O. Ø. THOMSEN, S. B. HANAUER, J. MCCOLM, R. BLOOMFIELD & W. J. SANDBORN (2007): Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 357: 239–250.
- SCHROEDER, H. W., & L. CAVACINI (2010): Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 52.
- SCOTT, A. M., J. P. ALLISON & J. D. WOLCHOK (2012): Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* 12: 14.
- SEITZ, R., & G. KRAUSE (2010): Pandemien: Was haben wir aus der H1N1-Influenza gelernt? *Bundesgesundheitsbl.* 53: 1221–1222.
- SHAO, W., X. LI, M. U. GORAYA, S. WANG & J.-L. CHEN (2017): Evolution of Influenza A virus by mutation and re-assortment. *Int J Mol Sci* 18.
- SHINYA, K., M. EBINA, S. YAMADA, M. ONO, N. KASAI & Y. KAWAOKA (2006): Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440: 435–436.
- SHORT, K. R., M. RICHARD, J. H. VERHAGEN, D. VAN RIEL, E. J. A. SCHRAUWEN, J. M. A. VAN DEN BRAND, B. MÄNZ, R. BODEWES & S. HERFST (2015): One health, multiple challenges. The inter-species transmission of influenza A virus. *One Health* 1: 1–13.
- SHTYRYA, Y. A., L. V. MOCHALOVA & N. V. BOVIN (2009): Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta naturae* 1: 26–32.
- SHUPTRINE, C., R. SURANA & L. M. WEINER (2012): Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer. *Semin. Cancer Biol.* 22: 3–13.
- SHURTLEFF, A. C., J. E. BIGGINS, A. E. KEENEY, E. E. ZUMBRUN, H. A. BLOOMFIELD, A. KUEHNE, J. L. AUDET, K. J. ALFSON, A. GRIFFITHS, G. G. OLINGER & S. BAVARI (2012): Standardization of the filovirus plaque assay for use in preclinical studies. *Viruses* 4: 3511–3530.
- SIEGRIST, C.-A. (2013): Vaccine immunology. S. 14–32. In: *Vaccines*.
- SILVA, H. A. de, N. M. RYAN & H. J. de SILVA (2016): Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol* 81: 446–452.
- SILVERSTEIN, A. M. (2000): Clemens Freiherr von Pirquet: Explaining immune complex disease in 1906. *Nat. Immunol.* 1: 453–455.
- SIMON, J. (2007): Emil Behring's medical culture: from disinfection to serotherapy. *Med Hist* 51: 201–218.
- SINN, P. L., J. E. COFFIN, N. AYITHAN, K. H. HOLT & W. MAURY (2017): Lentiviral vectors pseudotyped with filoviral glycoproteins. *Methods Mol. Biol.* 1628: 65–78.
- SKOWRONSKI, D. M., N. Z. JANJUA, G. de SERRES, T. S. HOTTES, J. A. DICKINSON, N. CROWCROFT, T. L. KWINDT, P. TANG, H. CHAREST, K. FONSECA, J. B. GUBBAY, N. BASTIEN, Y. LI & M. PETRIC (2011): Effectiveness of AS03 adjuvanted pandemic H1N1 vaccine: case-control evaluation based on sentinel surveillance system in Canada, autumn 2009. *BMJ* 342: c7297.
- SKOWRONSKI, D. M., N. Z. JANJUA, G. de SERRES, S. SABAUDUC, A. ESHAGHI, J. A. DICKINSON, K. FONSECA, A.-L. WINTER, J. B. GUBBAY, M. KRAJDEN, M. PETRIC, H. CHAREST, N. BASTIEN, T. L. KWINDT, S. M. MAHMUD, P. VAN CAESELE & Y. LI (2014): Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses. *PloS one* 9: e92153.
- SMITH, GAVIN J. D., D. VIJAYKRISHNA, J. BAHL, S. J. LYCETT, M. WOROBAY, O. G. PYBUS, S. K. MA, C. L. CHEUNG, J. RAGHWANI, S. BHATT, J. S. M. PEIRIS, Y. GUAN & A. RAMBAUT (2009): Origins and

- evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459: 1122–1125.
- SOEMA, P. C., R. KOMPIER, J.-P. AMORIJ & G. F. A. KERSTEN (2015): Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm* 94: 251–263.
- SONG, J. Y., H. J. CHEONG, I. S. HWANG, W. S. CHOI, Y. M. JO, D. W. PARK, G. J. CHO, T. G. HWANG & W. J. KIM (2010): Long-term immunogenicity of influenza vaccine among the elderly. Risk factors for poor immune response and persistence. *Vaccine* 28: 3929–3935.
- SONG, J. Y., H. J. CHEONG, J. Y. NOH, Y. B. SEO, W. S. CHOI, G. J. CHO, T. G. HWANG & W. J. KIM (2013): Long-term and cross-reactive immunogenicity of inactivated trivalent influenza vaccine in the elderly: MF59-adjuvanted vaccine versus unadjuvanted vaccine. *J. Med. Virol.* 85: 1591–1597.
- SONG, J. Y., H. J. CHEONG, Y. B. SEO, I. S. KIM, J. Y. NOH, J. Y. HEO, W. S. CHOI, J. LEE & W. J. KIM (2012): Comparison of the long-term immunogenicity of two pandemic influenza A/H1N1 2009 vaccines, the MF59-adjuvanted and unadjuvanted vaccines, in adults. *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 638–641.
- STÄRK, K. D. C., & D. MORGAN (2015): Emerging zoonoses: tackling the challenges. *Epidemiol. Infect.* 143: 2015–2017.
- STEINBUCH, M., & R. AUDRAN (1969): The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 279–284.
- STEVENS, J., L.-M. CHEN, P. J. CARNEY, R. GARTEN, A. FOUST, J. LE, B. A. POKORNY, R. MANOJKUMAR, J. SILVERMAN, R. DEVIS, K. RHEA, X. XU, D. J. BUCHER, J. C. PAULSON, J. PAULSON, N. J. COX, A. KLIMOV & R. O. DONIS (2010): Receptor specificity of influenza A H3N2 viruses isolated in mammalian cells and embryonated chicken eggs. *J Virol* 84: 8287–8299.
- STRASFELD, L., & S. CHOU (2010): Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24: 413–437.
- SU, B., S. WURTZER, M.-A. RAMEIX-WELTI, D. DWYER, S. VAN DER WERF, N. NAFFAKH, F. CLAVEL & B. LABROSSE (2009): Enhancement of the influenza A hemagglutinin (HA)-mediated cell-cell fusion and virus entry by the viral neuraminidase (NA). *PloS one* 4: e8495.
- SULLIVAN, N. J., A. SANCHEZ, P. E. ROLLIN, Z. Y. YANG & G. J. NABEL (2000): Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408: 605–609.
- SUTTER, G., & B. MOSS (1992): Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10847–10851.
- TAPIA, M. D., S. O. SOW, K. E. LYKE, F. C. HAIDARA, F. DIALLO, M. DOUMBIA, A. TRAORE, F. COULIBALY, M. KODIO, U. ONWUCHEKWA, M. B. SZTEIN, R. WAHID, J. D. CAMPBELL, M.-P. KIENY, V. MOORTHY, E. B. IMOUKHUEDE, T. RAMPLING, F. ROMAN, I. de RYCK, A. R. BELLAMY, L. DALLY, O. T. MBAYA, A. PLOQUIN, Y. ZHOU, D. A. STANLEY, R. BAILER, R. A. KROUP, M. ROEDERER, J. LEDGERWOOD, A. V. S. HILL, W. R. BALLOU, N. SULLIVAN, B. GRAHAM & M. M. LEVINE (2016): Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo. A phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 16: 31–42.
- TATE, M. D., E. R. JOB, Y.-M. DENG, V. GUNALAN, S. MAURER-STROH & P. C. READING (2014): Playing hide and seek: how glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 6: 1294–1316.
- TAUBENBERGER, J. K., & J. C. KASH (2010): Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7: 440–451.

- TAUBENBERGER, J. K., & D. M. MORENS (2010): Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* (1974) 125 Suppl 3: 16–26.
- THE AMERICAN LUNG ASSOCIATION ASTHMA CLINICAL RESEARCH CENTERS (2001): The safety of inactivated influenza vaccine in adults and children with asthma. *N. Engl. J. Med.* 345: 1529–1536.
- THEILER, M., & H. H. SMITH (1937): The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of Yellow fever virus. *J. Exp. Med.* 65: 767–786.
- THOMPSON, W. W., D. K. SHAY, E. WEINTRAUB, L. BRAMMER, C. B. BRIDGES, N. J. COX & K. FUKUDA (2004): Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 292: 1333–1340.
- TONG, S., Y. LI, P. RIVAILLER, C. CONRARDY, D. A. A. CASTILLO, L.-M. CHEN, S. RECUENCO, J. A. ELLISON, C. T. DAVIS, I. A. YORK, A. S. TURMELLE, D. MORAN, S. ROGERS, M. SHI, Y. TAO, M. R. WEIL, K. TANG, L. A. ROWE, S. SAMMONS, X. XU, M. FRACE, K. A. LINDBLADE, N. J. COX, L. J. ANDERSON, C. E. RUPPRECHT & R. O. DONIS (2012): A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 4269–4274.
- TREBBIEN, R., L. E. LARSEN & B. M. VIUFF (2011): Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol. J.* 8: 434.
- TRENT, D. W., P. MINOR, T. JIVAPAISARNPONG & J. SHIN (2013): WHO working group on the quality, safety and efficacy of japanese encephalitis vaccines (live attenuated) for human use, Bangkok, Thailand, 21-23 February 2012. *Biologicals* 41: 450–457.
- TRUELOVE, S., H. ZHU, J. LESSLER, S. RILEY, J. M. READ, S. WANG, K. O. KWOK, Y. GUAN, C. Q. JIANG & D. A. T. CUMMINGS (2016): A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza Other Respir Viruses* 10: 518–524.
- UNSCIC, & WORLD BANK (2010): Animal and Pandemic Influenza. A Framework for Sustaining Momentum. Bd. 5 Global Progress Report.
- URA, T., K. OKUDA & M. SHIMADA (2014): Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines* 2: 624–641.
- UYEKI, T. M., A. K. MEHTA, R. T. DAVEY, A. M. LIDDELL, T. WOLF, P. VETTER, S. SCHMIEDEL, T. GRÜNEWALD, M. JACOBS, J. R. ARRIBAS, L. EVANS, A. L. HEWLETT, A. B. BRANTSÄETER, G. IPPOLITO, C. RAPP, A. I. M. HOEPELMAN & J. GUTMAN (2016): Clinical management of Ebola virus disease in the United States and Europe. *N. Engl. J. Med.* 374: 636–646.
- VILLA, M., S. BLACK, N. GROTH, K. J. ROTHMAN, G. APOLONE, N. S. WEISS, I. AQUINO, L. BOLDORI, F. CARAMASCHI, A. GATTINONI, G. MALCHIODI, A. CRUCITTI, G. DELLA CIOPPA, E. SCARPINI, D. MAVILIO & S. MANNINO (2013): Safety of MF59-adjuvanted influenza vaccination in the elderly: results of a comparative study of MF59-adjuvanted vaccine versus nonadjuvanted influenza vaccine in northern Italy. *Am. J. Epidemiol.* 178: 1139–1145.
- VOGEL, F. R., C. CAILLET, I. C. KUSTERS & J. HAENSLER (2009): Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8: 483–492.
- VOLZ, A., & G. SUTTER (2017): Modified vaccinia virus ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 97: 187–243.
- WABL, M., & C. STEINBERG (1996): Affinity maturation and class switching. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 89–92.
- WAHL-JENSEN, V., S. K. KURZ, P. R. HAZELTON, H.-J. SCHNITTLER, U. STRÖHER, D. R. BURTON & H. FELDMANN (2005): Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. *J Virol* 79: 2413–2419.
- WALKER, L. M., & D. R. BURTON (2018): Passive immunotherapy of viral infections: 'super-antibodies' enter the fray. *Nat. Rev. Immunol.*

- WANG, C., X. ZHENG, W. GAI, Y. ZHAO, H. WANG, H. WANG, N. FENG, H. CHI, B. QIU, N. LI, T. WANG, Y. GAO, S. YANG & X. XIA (2017): MERS-CoV virus-like particles produced in insect cells induce specific humoral and cellular immunity in rhesus macaques. *Oncotarget* 8: 12686–12694.
- WANG, J. W., & R. B. S. RODEN (2013): Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev Vaccines* 12: 129–141.
- WANG, X.-Z., V. W. COLJEE & J. A. MAYNARD (2013): Back to the future: recombinant polyclonal antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Eng* 2: 405–415.
- WHO (1978a): Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International study team. *Bulletin of the World Health Organization* 56: 247–270.
- WHO (1978b): Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bulletin of the World Health Organization* 56: 271–293.
- WHO (1980): The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of Smallpox eradication. Bd. 4 History of international public health. Geneva.
- WHO (2007): A description of the process of seasonal and H5N1 influenza vaccine virus selection and development.  
[http://www.who.int/influenza/resources/documents/influenza\\_vaccine-virus\\_selection/en/](http://www.who.int/influenza/resources/documents/influenza_vaccine-virus_selection/en/).
- WHO (2010–2017): WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines.  
<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>. (Download am 18.03.2018).
- WHO (2014): Ethical considerations for use of unregistered interventions for Ebola virus disease. Report of an advisory panel to WHO.  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ethical-considerations/en/>.
- WHO (2015a): Global health observatory data repository. Causes of death, separated by World Bank income groups.  
[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/index1.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html). (Download am 16.03.18).
- WHO (2015b): Mortality and global health estimates.  
[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/index1.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html).
- WHO (2018): Fact Sheet. Influenza (Seasonal). Influenza (Seasonal).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. (Download am Reviewed January 2018).
- WIDJAJA, L., N. ILYUSHINA, R. G. WEBSTER & R. J. WEBBY (2006): Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. *Virology* 350: 137–145.
- WILKINSON, D. E., M. PAGE, G. MATTIUZZO, M. HASSALL, T. DOUGALL, P. RIGSBY, L. STONE & P. MINOR (2017): Comparison of platform technologies for assaying antibody to Ebola virus. *Vaccine* 35: 1347–1352.
- WINAU, F., & R. WINAU (2002): Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect.* 4: 185–188.
- WINGFIELD, P. (2001): Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci Appendix 3*: 3.
- WOHLBOLD, T. J., R. NACHBAGAUER, H. XU, G. S. TAN, A. HIRSH, K. A. BROKSTAD, R. J. COX, P. PALESE & F. KRAMMER (2015): Vaccination with adjuvanted recombinant neuraminidase induces broad heterologous, but not heterosubtypic, cross-protection against influenza virus infection in mice. *mBio* 6: e02556.
- WONG, G., & G. P. KOBINGER (2015): Backs against the wall: novel and existing strategies used during the 2014–2015 Ebola virus outbreak. *Clin. Microbiol. Rev.* 28: 593–601.
- WOOLHOUSE, M., & E. GAUNT (2007): Ecological origins of novel human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 33: 231–242.

- ZELTINS, A. (2013): Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol. Biotechnol.* 53: 92–107.
- ZHAO, S., L. STONE, D. GAO & D. HE (2018): Modelling the large-scale yellow fever outbreak in Luanda, Angola, and the impact of vaccination. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006158.
- ZHENG, X., G. WONG, Y. ZHAO, H. WANG, S. HE, Y. BI, W. CHEN, H. JIN, W. GAI, DI CHU, Z. CAO, C. WANG, Q. FAN, H. CHI, Y. GAO, T. WANG, N. FENG, F. YAN, G. HUANG, Y. ZHENG, N. LI, Y. LI, J. QIAN, Y. ZOU, G. KOBINGER, G. F. GAO, X. QIU, S. YANG & X. XIA (2016): Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection. *Sci Rep* 6: 24179.
- ZHOU, H., W. W. THOMPSON, C. G. VIBOUD, C. M. RINGHOLZ, P.-Y. CHENG, C. STEINER, G. R. ABEDI, L. J. ANDERSON, L. BRAMMER & D. K. SHAY (2012): Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clin. Infect. Dis.* 54: 1427–1436.
- ZINKERNAGEL, R. M., A. LAMARRE, A. CIUREA, L. HUNZIKER, A. F. OCHSENBEIN, K. D. MCCOY, T. FEHR, M. F. BACHMANN, U. KALINKE & H. HENGARTNER (2001): Neutralizing antiviral antibody responses. *Advances in Immunology* 79: 1–53.

## V ERKLÄRUNG UND VERSICHERUNG

### ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 04.04.2018

.....

### VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über die

**„Entwicklung von Immunisierungsstrategien zur Induktion  
hoher funktionaler Antikörperantworten“**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 04.04.2018

.....

## VI DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und beim Verfassen dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Veronika von Messling für die fachliche Betreuung in den letzten drei Jahren und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe am Paul-Ehrlich-Institut, sowie Prof. Dr. Rolf Marschalek für die universitäre Betreuung dieser Arbeit und die Gelegenheit, diese an der Universität Frankfurt absolvieren zu können.

Für die hilfreiche wissenschaftliche Diskussion und das Begleiten meiner Forschung möchte ich außerdem den weiteren Mitgliedern meines Thesis Committees, Prof. Dr. Barbara Schnierle, Prof. Dr. Stefan Vieths, Dr. Micheal Mühlebach und Dr. Bevan Sawatsky, danken.

Für die Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums möchte ich mich bei der Friedrich-Ebert-Stiftung bedanken, die mir zusätzlich die Gelegenheit gab, meine Arbeit auch außerhalb naturwissenschaftlicher Fachkonferenzen zu diskutieren.

Ein großer Dank gebührt außerdem allen Beteiligten der Influenza-Studie für die geleisteten Vorarbeiten sowie den Kooperationspartnern des Antiseren-Projekts Prof. Dr. Stephan Becker, Dr. Olga Dolnik und Dr. Verena Krähling von der Philipps-Universität Marburg sowie Prof. Dr. Gerd Sutter und Dr. Asisa Volz von der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Weiter gilt mein Dank den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung, insbesondere Dr. Roland Plesker und Alexandra Janovich. Für ihre zuverlässige Unterstützung bei meinen Tierstudien möchte ich mich bei Lisa Walz, Yvonne Krebs und Lea Constanze Belzig bedanken.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvollen Gespräche, aus denen oft neue Ideen entsprungen sind, und den freundschaftlichen Umgang möchte ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe 4/0 und den Doktoranden und Studenten aus der 4/3 sowie den bisherigen Doktoranden, Postdocs, Master- und Bachelorstudenten bedanken. Ihr habt meine letzten drei Jahre ganz wesentlich geprägt. Das gilt auch und gerade für die vielen Aktivitäten außerhalb des Labors. Ich denke gerne an die Zeit, die Wochenenden im Labor und die gemeinsamen Abende zurückdenken!

Bei der „alten“ und neuen Doktorandenvertretung des Paul-Ehrlich-Instituts möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die drei tollen gemeinsam organisierten Konferenzen bedanken, bei denen auch der Spaß nie zu kurz kam!

Im Besonderen bedanke ich mich bei Dr. Bevan Sawatsky, der stets den rechten Tipp zur rechten Zeit und eine helfende magische Hand parat hatte. Mit dir habe ich nicht nur einen wissenschaftlichen Mentor gefunden, sondern auch einen ganz besonderen Menschen und Freund gewonnen.

Bei meinen politischen Wegbegleitern möchte ich mich für das Verständnis während der letzten drei Jahre bedanken. Besonders gilt dies für Dr. Stephan Wetzel, der mich immer motiviert hat, neben meiner wissenschaftlichen Arbeit auch politisch aktiv zu bleiben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie für die Unterstützung, die Geduld und den stetigen Glauben an mich, wenn ich tatsächlich einmal selbst an mir zweifelte: Danke Mama, „Papa“ Albrecht, Conni und Gerd-Rainer, Judith und Maxi – und nicht zu vergessen mein lieber Ehemann Fabian!