Alpaka-Antikörper

Therapeutische Nanobodies gegen SARS-CoV-2

THOMAS GÜTTLER¹, MATTHIAS DOBBELSTEIN², DIRK GÖRLICH¹

¹MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MULTIDISZIPLINÄRE NATURWISSENSCHAFTEN, GÖTTINGEN

²INSTITUT FÜR MOLEKULARE ONKOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN

Monoclonal immunoglobulins are widely successful as therapeutics and have also been effective in treating COVID-19. However, their production in mammalian cells is expensive and cannot be scaled to meet the demand in a global pandemic. Camelid V_HH antibodies (also called nanobodies), however, can be manufactured cost-efficiently in bacteria or yeast. Here we highlight our progress in developing nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2 and its variants.

DOI: 10.1007/s12268-022-1684-y
© Die Autoren 2022

■ Sie werden eingesetzt als Immunsuppressiva nach Organtransplantationen, in der Krebstherapie, bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, Asthma, Allergien, Infektionen und Osteoporose. Auch in der Diagnostik sind sie längst Standard. Die Rede ist von monoklonalen Antikörpern (mAbs). Seit der Entwicklung der Hybridoma-Technologie durch Georges Köhler und César Milstein um das Jahr 1975 [1] und der ersten klinischen Zulassung 1986 haben mAbs die Biomedizin buchstäblich revolutioniert. Sie machen inzwischen knapp ein Fünftel aller neuen Medikamente und etwa die Hälfte der 20 meistverkauften Pharmaka aus [2]. Kein

Wunder, denn mAbs verfügen über eine exzellente Zielspezifität und lassen sich genau auf ihre Anwendung zuschneiden. Auch in der COVID-19-Pandemie kommen sie seit November 2020 bei der Prophylaxe und Therapie von Risikopatienten zum Einsatz.

Mit zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verknüpft sind, ist das typisch Y-förmige Immunglobulin G (IgG) ein relativ großes und flexibles Molekül (**Abb. 1A**). Die Antigenbindestellen (Paratope) werden von den variablen Ig-Domänen der leichten und schweren Kette am Ende der Y-Arme gestellt. Diese passen genau auf die entsprechende

Target-Oberfläche (Epitop). Die Fc-Einheit am Fuß des „Y“ ist glykosyliert, wodurch IgGs bestimmte Effektorfunktionen aktivieren können. Durch ihre Komplexität müssen mAbs aufwändig aus Säugerzellen gewonnen werden, lange Produktionszeiten und hohe Therapiekosten sind die Folge.

Kompakte Einzeldomänen-Antikörper im Nanometer-Format

Die Limitierungen von IgGs waren bereits in den 1980er-Jahren abzusehen. Gleich mehrere Laboratorien versuchten daher, kompakte Mini-Antikörper zu entwickeln, die sich kostengünstiger aus Mikroorganismen (wie z. B. *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris*) gewinnen lassen. Fab-Fragmente [3] und Einzelketten-Fv-Antikörper [4, 5] sind deutlich kleiner als IgGs, umfassen aber noch mehrere Domänen aus leichter und schwerer Kette (**Abb. 1A**). Kurz nach ihrer Entwicklung wurde entdeckt, dass allein eine isolierte variable Ig-Domäne der schweren Kette eine beträchtliche Antigenaffinität aufweisen kann [6]. Dies ließ auf kostengünstige Einzeldomänen-Antikörper hoffen. Fehlt jedoch die leichte Kette, muss die neu exponierte Oberfläche der schweren Kette so verändert werden, dass die Ig-Domänen nicht aggregieren – kein einfaches Unterfangen, möchte man die ohnehin schwächere Epitopbindung erhalten.

Hier steht eine Anzeige.

Springer

▲ **Abb. 1:** Vergleich von IgGs und Nanobodies. **A**, Struktur von konventionellen IgGs. **B**, Schwere-Ketten IgGs. **C**, Nanobodies. Die konstanten (C) und variablen (V) Ig-Domänen von leichter (L) und schwerer (H) Kette sind markiert. Disulfid-verbrückte Cysteinreste zwischen den Ketten sind violett hervorgehoben. Die Antigenbindestellen sind hellblau (schwere Kette) bzw. dunkelblau (leichte Kette) unterlegt.

Eine Zufallsentdeckung an der Freien Universität in Brüssel brachte in den späten 1980er-Jahren den Durchbruch: Während eines Studentenkurses fielen in Dromedarseren Immunglobuline auf, die deutlich kleiner waren als herkömmliche IgGs [7]. Sie bestehen lediglich aus zwei verkürzten schweren Ketten, in denen jeweils eine einzige variable Ig-Domäne das Paratop stellt (**Abb. 1B**). Diese Domänen lassen sich ohne Aggregationsprobleme oder Affinitätsverlust abgetrennt vom Rest der schweren Kette produzieren, als V_H-H-Antikörper (**Abb. 1C**), aufgrund ihrer kompakten Größe auch Nanobodies genannt. Nanobodies lassen sich auch aus anderen Alt- und Neuweltkamelen (wie Alpakas) gewinnen.

SARS-CoV-2-spezifische Nanobodies

Das Spike-Protein auf der Oberfläche von SARS-CoV-2 ist ein hervorragendes pharmazeutisches Target. Mit dessen Rezeptorbindedomäne (RBD) dockt das Virus an den zellulären Rezeptor ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*). Daraufhin fusionieren die Membranen von Virus und Zelle, wodurch das Virusgenom in den Wirt eingeschleust wird [8]. Unser Ziel war es, die Interaktion zwischen RBD und ACE2 mit RBD-spezifischen Nanobodies zu blockieren, und SARS-CoV-2 somit zu stoppen, bevor es Zellen infizieren kann [9].

Um solche Nanobodies zu gewinnen, haben wir drei Tiere unserer Alpakaherde mit einer geringen Menge des Spike-Proteins immunisiert. Bereits fünf Wochen später gewannen wir aus etwas Blut periphere B-Lymphozyten – jene Zellen, die auch Spike-Antikörper produzieren. Aus der revers-

transkribierten mRNA dieser Zellen ließen sich nun die Nanobody-codierenden Bereiche durch PCR amplifizieren und klonieren. Hier zeigt die Nanobody-Technologie eine ihrer größten Stärken: V_H Hs sind viel einfacher zu klonieren als Multidomänen-Antikörper aus mehreren Ketten. In vergleichbar wenigen Schritten ließ sich so das gesamte V_H-H-Repertoire der Alpakas (~10⁸ individuelle Sequenzen pro Tier) in einer Nanobody-DNA-Bibliothek (wie man den Satz an Nanobody-kodierenden Plasmiden nennt) spiegeln.

Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen

Die Selektion der antigenspezifischen Nanobodies aus dem Pool aller rekombinanten V_H Hs gleicht der Suche einer Nadel im Heuhaufen. Hierbei kommen Bakteriophagen zum Einsatz – Viren, die Bakterien infizieren und deren Biosynthesemaschinerie für ihre Vermehrung kapern. Bei der Konstruktion der Immunbibliothek wird der V_H-H-codierende Bereich mit dem eines Bakteriophagen-Hüllproteins fusioniert. Infiziert man nun Bakterien, die die Bibliothek exprimieren, so präsentiert ein Teil der neu produzierten Phagen einen Nanobody auf der Oberfläche – daher der Name „Phage Display“ [10, 11]. Die Plasmide der Bibliothek, die Phagemide, tragen ein Phagen-eigenes Replikationssignal und werden daher in den Phagenpartikeln verpackt. Durch Selektion der Phagen über die präsentierten Nanobodies (mittels Affinitätschromatographie) kommt man so auch der Nanobody-Sequenz auf die Spur. Mit der RBD des Spike-Proteins als Köder fischten wir nun die RBD-bindenden Nano-

bodies aus der Immunbibliothek und produzierten eine Auswahl dieser in *E. coli*.

Hochwirksam gegen SARS-CoV-2

Nicht jeder RBD-spezifische Nanobody kann das Virus stoppen. Ob die ausgewählten Nanobodies SARS-CoV-2 ausschalten, ermittelten wir mit einem eigens entwickelten Test, der das Virus sogar im frühen Stadium der Infektion und in einzelnen Zellen detektieren kann [9]. Dafür infizierten wir Zellkulturen mit dem Virus, das zu Beginn des ersten Lockdowns in der Göttinger Universitätsklinik isoliert wurde. Zellen, die infolge der Infektion neue Viruspartikel produzieren, ließen sich mit fluoreszenzmarkierten anti-RBD-Nanobodies per Mikroskop detektieren. Versetzt man das Virus mit einem Nanobody, der die Infektion verhindert, bleibt das Fluoreszenzsignal aus – man spricht dann von Virus-neutralisierenden Nanobodies. 43 von 60 getesteten Nanobodies waren in der Lage, das Virus zu stoppen.

Ein wichtiges Kriterium in der pharmazeutischen Entwicklung ist die minimale Dosis, bei der ein Antikörper wirksam ist. Die verabreichte Menge entscheidet über Nebenwirkungen und nicht zuletzt über Produktionskosten und Marktpreis. Dieser liegt bei dem mAb-Präparat REGEN-COV mit einer Dosis von etwa einem Gramm bei mindestens 2.000 Euro – viel zu hoch für den breiten Einsatz während einer globalen Pandemie. Indem wir die Kandidaten-Nanobodies bei unterschiedlichen Konzentrationen testeten, konnten wir ermitteln, welche Menge für den Neutralisationseffekt ausreicht. Das Ergebnis war erstaunlich: Die potentesten Nanobodies (z. B. Kandidat Re5D06) neutralisierten das Virus bereits

bei weniger als einem millionstel Gramm pro Liter. Für einen Patienten könnte also bereits ein Milligramm dieses Nanobodys ausreichen, um die effektive therapeutische Dosis 100fach zu überschreiten [9].

Mechanismus der antiviralen Aktivität

Mit Immunfluoreszenz-Experimenten erkannten wir bereits früh, dass neutralisierende Nanobodies eines von zwei nicht überlappende RBD-Epitopen (1 oder 2) besetzen, wobei die besten Neutralisierer (wie z. B. Re5D06) Epitop 1 abdecken. Re5D06 gehört gar zu den am stärksten bindenden Nanobodies, die jemals beschrieben wurden. Mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelten wir die 3D-Struktur eines Komplexes aus RBD, Re5D06 und einem Epitop-2-Binder (**Abb. 2**). Hier zeigte sich, dass beide Nanobodies die ACE2-Bindung verhindern. Das Paratop von Re5D06 schließt einen auffällig langen CDR3-Loop ein, wodurch der Nanobody formgenau auf Epitop 1 der RBD passt. Solche Bindungsmuster sind eine strukturelle Besonderheit von Nanobodies: CDR3 verleiht ihnen oft eine

elongierte, konvexe Gestalt (**Abb. 1C**, [12]). Dadurch passen sie in für IgGs nur schwer zugängliche konkave Oberflächenbereiche und können so auch komplizierte 3D-Epitope lesen und sogar aktive Zentren von Enzymen blockieren [13]. Das Paratop von IgGs ist hingegen meist flach oder konkav, wodurch diese eher lineare Peptide mit hoher Affinität binden [12]. Über Kryo-Elektronenmikroskopie erschlossen wir, dass Re5D06 das Spike-Protein in all dessen Konformationen zu blockieren vermag – es kann sich dem Nanobody praktisch nicht entziehen. Die Röntgenstruktur des freien, nicht RBD-gebundenen Re5D06 zeigte zudem, dass dieser außerordentlich formstabil ist und seine RBD-kompatible Konformation nicht erst allmählich mit der RBD-Bindung einnimmt, sondern diese von Anfang an aufweist.

Außergewöhnliche Stabilität

Strukturelle Stabilität von Proteinen geht nicht selten mit Temperaturtoleranz einher. Unsere Favoriten-Nanobodies überstehen sogar eine Temperatur von 95 °C, ohne unwirksam zu werden [9]. Sie zeigen damit

eine bisher einzigartige Kombination aus antiviraler Aktivität und Thermostabilität. Letztere gilt sogar als Schlüsselkriterium in der Wirkstoffentwicklung [14]: Zum einen zeigt sie, dass Nanobodies die oft langen Produktions- und Lieferketten unbeschadet durchlaufen können, zum anderen ist sie ein Indikator für lange Wirksamkeit im Körper.

Schutz vor SARS-CoV-2-Varianten

Seit Herbst 2020 traten immer neue Virusvarianten auf, die das Pandemiegeschehen rasch dominierten. Die nun allgegenwärtigen Delta- und Omikron-Varianten sind leichter übertragbar und entziehen sich auch häufiger dem Impfschutz, da die Mutationen vor allem Epitope neutralisierender Antikörper betreffen. Dies führt nicht nur zu Infektionsdurchbrüchen; auch bereits entwickelte therapeutische Antikörper (wie z. B. Bamlanivimab von Eli Lilly) verlieren einen Großteil ihrer Wirkung. Mit der Nanobody-Pipeline lässt sich eine solche „therapeutische Lücke“ zügig schließen: Mittels Phage Display selektierten wir bereits jene Nanobodies aus der Bibliothek unserer besten RBD-Binder, die

Hier steht eine Anzeige.

Springer

◀ **Abb. 2:** Die Rezeptorbindedomäne (RBD, grün) des SARS-CoV-2 Spike-Proteins (links) wird durch Nanobodies gegen Epitop 1 (magenta) und Epitop 2 (blau) blockiert, wodurch das Virus neutralisiert wird.

aussichtlich konventionellen mAbs überlegen sein. Die intranasale Anwendung oder Inhalation ist für anti-RBD-Nanobodies

trotz der RBD-Mutationen die Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta-Varianten des Virus inaktivieren können [9].

Alle RBD-Mutationen vor Omikron der bislang global dominanten Virusvarianten trafen Epitop 1; Epitop 2 blieb bis dahin verschont. Da Epitop-1- und Epitop-2-Binder gleichzeitig dieselbe RBD besetzen können, konnten wir sie zu wirksamen Tandems fusionieren. Diese neutralisieren auch die Virusvarianten Alpha bis Delta und übertragen sogar die Nanobody-Monomere in ihrer antiviralen Aktivität.

In einer dritten Strategie bündelten wir Epitop-2-Binder zu trimeren Komplexen. So entsprechen sie der Dreier-Symmetrie des Spikes und binden auch die Alpha bis Delta praktisch irreversibel. Nanobodies lassen sich also modular zu effektiven Wirkstoffen kombinieren. Die Nanobody-Pipeline kann man in Echtzeit dem Pandemiegeschehen anpassen. Unsere derzeitige Aufmerksamkeit gilt vor allem der Omikron-Variante.

Therapeutische Anwendung im Blick

Caplacizumab, ein Thrombozytenaggregationshemmer, ist das bislang einzige zugelassene Nanobody-basierte Präparat [12]. Dass weitere Nanobodies den Weg in die Klinik finden, ist wahrscheinlich. Vor allem dort, wo kompakte Struktur und hohe Stabilität ausschlaggebend sind, werden Nanobodies vor-

besonders vielversprechend, denn Nanobodies können leicht in Gewebe eindringen und das Virus bereits am Infektionsort ausbremsen oder sogar stoppen. Erste Ergebnisse aus dem Hamstermodell sind vielversprechend. Falls diese sich bestätigen lassen, könnten klinische Studien bereits im kommenden Jahr beginnen.

Danksagung

Wir danken unseren Arbeitsgruppen am MPI für Multidisziplinäre Naturwissenschaften und an der Universitätsmedizin Göttingen für die hervorragende Teamarbeit an den SARS-CoV-2-Projekten sowie den Facility-Teams am MPI (Tierhaltung, Kristallisation, cryo-EM und Live-Cell Imaging) für die ausgezeichnete Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft und der Max-Planck-Stiftung gefördert.

Literatur

- [1] Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497
- [2] The Antibody Society, www.antibodysociety.org
- [3] Better M, Chang CP, Robinson RR et al. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041-1043
- [4] Skerra A, Plückthun A (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240: 1038-1041
- [5] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-5883

- [6] Ward ES, Güssow D, Griffiths AD et al. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341: 544-546
- [7] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S et al. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448
- [8] Jackson CB, Farzan M, Chen B et al. (2021) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:3-20
- [9] Güttler T, Aksu M, Dickmanns A. et al. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *EMBO J* 40: e107985
- [10] Smith GP (2019) Phage display: simple evolution in a petri dish (Nobellecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 58: 14428-14437
- [11] Winter G (2019) Harnessing evolution to make medicines (Nobellecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 58: 14438-14445
- [12] Jovčevska I, Muyldermans S (2020) The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs* 34: 11-26
- [13] Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA et al. (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* 3: 803-811
- [14] Jarasch A, Koll H, Regula JT et al. (2015) Developability assessment during the selection of novel therapeutic antibodies. *J Pharm Sci* 104: 1885-1898

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Dirk Görlich
Max-Planck-Institut für Multidisziplinäre Naturwissenschaften
Am Fassberg 11
D-37077 Göttingen
goerlich@mpibpc.mpg.de

Prof. Dr. Matthias Döbelstein
Universitätsmedizin Göttingen
Institut für molekulare Onkologie
Justus-von-Liebig-Weg 11
D-37077 Göttingen
mdobbel@uni-goettingen.de

AUTOREN

Thomas Güttler

1998–2003 Studium der Biologie und Molekularen Zellbiologie an den Universitäten Jena, Oxford, MS, USA, und Heidelberg. 2004–2010 Promotion am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie und an der Universität Göttingen. 2010–2019 Postdoktorand an der Harvard Medical School und Boston University, USA. Seit 2019 Wissenschaftler am Max-Planck-Institut für Multidisziplinäre Naturwissenschaften (früher Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie) in Göttingen.

Matthias Döbelstein

1986–1992 Medizinstudium an der LMU München mit Promotion am Institut für Biochemie. 1993–1996 Postdoktorand an der Princeton University, USA. 1997–2004 Gruppenleiter am Institut für Virologie der Universität Marburg. 2005–2006 Professor an der Süddänischen Universität Odense. Seit 2006 Professor an der Universitätsmedizin Göttingen.

Dirk Görlich

1985–1989 Biochemiestudium an der Universität Halle. 1990–1993 Promotion am Max-Delbrück-Zentrum/HU Berlin. 1993–1995 Postdoktorand am Wellcome/CRC Institute Cambridge, UK. Forschungsgruppenleiter (1996–2001) und Professor (2001–2006) am Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg (ZMBH). Seit 2005 Direktor am Max-Planck-Institut für Multidisziplinäre Naturwissenschaften (früher Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie) in Göttingen.