



Nanobodies fra kameler - En ny klasse antistoffer til diagnostik og behandling

Skottrup, Peter Durand; Clausen, Rasmus Prætorius; Riise, Erik

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2011

Document version
Tidlig version også kaldet pre-print

Citation for published version (APA):
Skottrup, P. D., Clausen, R. P., & Riise, E. (2011). Nanobodies fra kameler - En ny klasse antistoffer til diagnostik og behandling. *Lægemiddelforskning*, 2011, 4-6.

Nanobodies fra kameler

– en ny klasse antistoffer til diagnostik og behandling

Dyr i kamelfamilien danner specielle antistoffer i blodet, hvorfra man kan konstruere små fragmenter, som kaldes nanobodies. De små antistofdele har unikke egenskaber, som gør dem meget anvendelige som lægemidler og til diagnostik. Vi har udviklet et nanobody, der kan detektere en bakterie, som medfører parodontose.

Af Peter Durand Skottrup, Rasmus Prætorius Clausen og Erik Riise

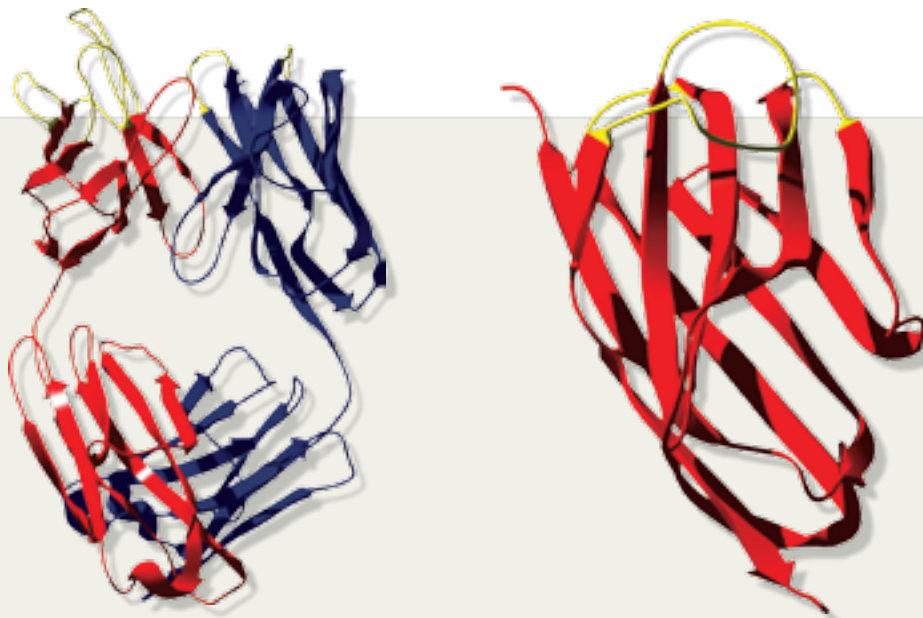
Antistoffer er en del af kroppens immunforsvar, som beskytter os mod bakterier, svampe og virus, men nu udvikles antistoffer i stigende udstrækning som lægemidler og til diagnosticering af sygdomme. I begge tilfælde udnytter man, at antistoffer kun binder sig til ét bestemt mål-molekyle, som kaldes for antigenet. Ved medicinsk behandling er antigenet typisk et protein i kroppen, som lægemidlet skal påvirke, og ved diagnostik kan antigenet fx være et protein, som er specifikt for en sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Mange farmaceutiske antistoffer fremstilles ved hjælp af en teknik, hvor man fusionerer en antistofproducerende celle og en kræftcelle. Derved får man en cellelinie, som konstant vokser via celledeling, og hvor alle cellerne danner antistof. Men desværre er der ulemper ved metoden. Antistof-

fer kan være ustabile, og samtidig er de ofte store molekyler, der kan have svært ved at trænge ind til deres antigen, som kan være væv dybt inde i kroppen. Desuden er det både vanskeligt og kostbart at dyrke cellelinier.

Småt er godt

Derfor produceres antistoffer også i gensplejsede bakterier. Her behøver man ikke få dannet hele antistoffet, fordi man selv bestemmer, hvor stor en del af genet for antistoffet, man vil klonere og indsætte i bakterien. På den måde kan man fremstille et mindre og mere stabilt antistoffragment, som stadig besidder de dele, som er nødvendige for, at antistoffet kan genkende og binde sig til sit antigen.

Antistoffer er proteiner, der består af aminosyrer, som danner to tunge kæder og to lette kæder. Den struktur af antistoffet, der binder antigenet, befinder sig i de yderste domæner af disse kæder. Forskere og medicinalfirmaer, som fremstiller antistoffer i bakterier, nøjes derfor med at klonere de antigenbindende domæner af kæderne. Det er nemlig tilstrækkeligt til, at det formindskede antistof kan binde sig til det antigen, som det skal detektere ved diagnostik eller påvirke medicinsk. Undersøgelser har imidlertid vist, at det primært er den tunge kæde i det antigenbindende domæne af antistoffet, som er vigtig for bindingen til antigenet, så for at få et end-



Til venstre ses strukturen af et almindeligt antistoffragment, som består af to tunge kæder (rød) og to lette kæder (blå). De gule yderområder er den del af antistoffet, som binder antigenet. Bindingsområdet har en konkav form, og det fanger antigenet som et par kæber, der klapper sammen om sit bytte. Til højre ses et nanobody, der kun består af de tunge kæder. Den antigenbindende del har en konvex form, og denne top passer ind i en kløft på antigenet.

nu mindre, men fuldt funktionsdygtigt fragment, har man uden held forsøgt at fremstille antistoffer, som kun består af det relevante domæne af den tunge kæde. Når det ikke er lykkedes, skyldes det, at disse domæner er meget ustabile, når man forsøger at fremstille dem uden tilstedeværelse af det tilsvarende domæne fra den lette kæde.

Naturens minimalisme

Som så ofte før har det nu vist sig, at naturen selv har fundet på en løsning, idet så forskellige dyr som kameler og hajer danner specielle antistoffer, som adskiller sig fra normale antistoffer ved kun at have to tunge kæder. Tung-kæde-antistoffernes antigen-bindende domæner er markant forskellige fra normale antistoffers i flere afgørende aminosyrepositioner. Det gør domænet meget stabilt, når det klones og produceres alene. Det antigen-bindende domæne af kamelens antistoffer kaldes for et nanobody. De små nanobodies har typisk en udstrækning på kun 4x3 nanometer, og det øger deres evne til at trænge ind til antigener i kroppen.

Tilmed har nanobodies endnu en interessant egenskab, fordi de binder til antigenet på en helt unik måde. Normale antistoffer fanger antigenet i en konkav lomme, men det er omvendt for nanobodies, hvor de bindende aminosyrer udgør en konvex spids, som kan passe ind i en kløft på antigenet (se ill. side 6). Man forventer derfor at kunne finde antistoffer mod antigener, som vi ikke har antistoffer mod i det traditionelle antistofsystem. Specielt er det interessant at identificere nanobodies, som kan hæmme enzymer og receptorer ved at binde i områder, hvor der ikke er adgang for almindelige antistoffer.

Hurtig identifikation af bakterier

Nanobodies er også lovende til detektion af sygdomsfremkaldende bakterier. At skelne mellem ufarlige og farlige bakterier med antistoffer er særdeles attraktivt i situationer, hvor det er

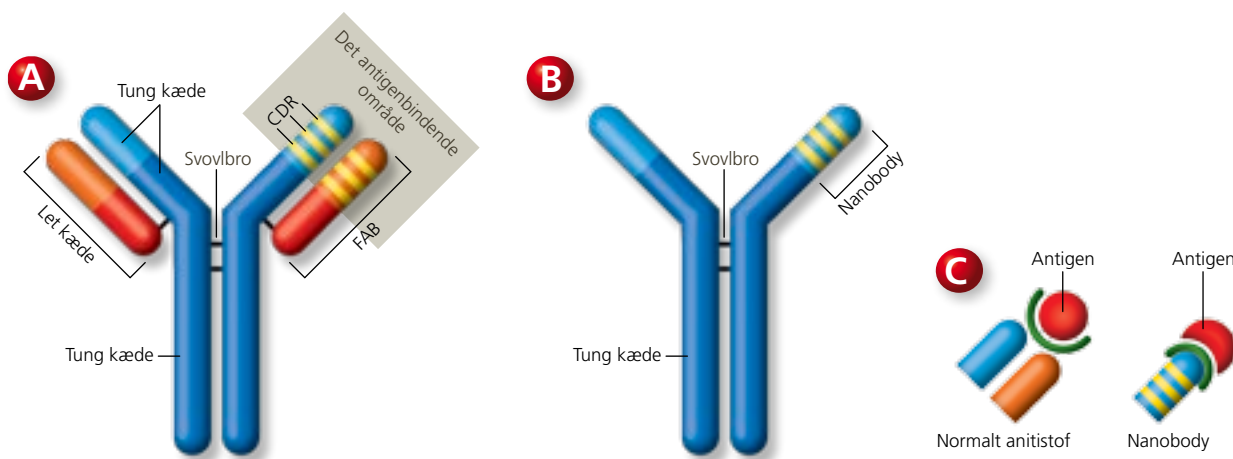
vigtigt at stille en korrekt diagnose hurtigt og præcist; fx på hospitaler, i fødevareproduktionen eller på lægens kontor. Det er dog tit vanskeligt at udvikle antistoffer, som er tilstrækkelig specifikke, fordi mange bakterier danner de samme overfladeproteiner, hvilket medfører risiko for fejldiagnoser. Ved at udnytte den specielle konvekse antigen-bindende struktur i nanobodies, kan man fange antigener, som er dybere begravet under bakteriers overflade, og på den måde opnå en mere specifik detektion. Derfor kan nanobodies blive en vigtig del af fremtidige tests for sygdomsfremkaldende bakterier.

I vores laboratorium har vi udviklet et stort bibliotek af nanobodies ud fra kamelblod. Biblioteket indeholder kamelblodets naturlige antistoffer og kaldes 'naivt', fordi kamelen ikke blev immuniseret, inden blodet blev aftappet. Vi har konstrueret biblioteket således, at de enkelte nanobodies bliver præsenteret på overfladen af bakteriofager, som er virus, der inficerer bakterier. Biblioteket består af millioner af fager, som hver især præsenterer et enkelt nanobody på overfladen, samtidig med at det kodende DNA for det pågældende antistof er indbygget i viruspartiklens genom. Denne teknik giver en enestående mulighed for hurtig isolering af et bindende nanobody til et givet antigen.

Diagnostik af parodontose

I et af vores projekter udvikler vi metoder til at detektere bakterier, der forårsager parodontose. Parodontose kaldes de løse tænders sygdom og rammer en stor del af den voksne befolkning. Forløbet starter typisk midt i 30'erne, og sygdommen skrider langsomt frem. Parodontose skyldes, at bakterier nedbryder de knogler, som tænderne er hæftet fast i, indtil tænderne med tiden begynder at løsne sig. Behandlingen består af hyppige tandlægebesøg, grundig mundhygiejne og antibiotikabehandlinger.

Parodontose kan også i sjældne tilfælde forekomme hos



KONVENTIONELLE ANTISTOFFER OG NANOBODIES

Almindelige antistoffer er større og mere komplekse end de små nanobodies, som udmærker sig ved at binde sig til deres antigen på en helt speciel måde.

A Konventionelle antistoffer er opbygget af to identiske lette kæder og to identiske tunge kæder. De lette kæder er hver især bundet til en tung kæde med svovlbroer, og de to tunge kæder er ligeledes bundet til hinanden med svovlbroer. Tilsammen ligner antistoffets struktur et Y. Den yderste del af de tunge og lette kæder kaldes tilsammen for Fab-delen og udgør bindingsstedet for et antigen. Dvs. at forskellen mellem to antistoffer ligger i strukturen af det bindende domæne, mens resten er næsten ens. Variatio-

nen i Fab-delen, som afgør, hvilket antigen antistoffet kan binde, ligger i tre områder, der kaldes CDRs (Complementary Determining Regions).

B Antistoffer i kamelen mangler den lette kæde, og deres bindende domæne kaldes et nanobody. Dette nanobody kan klones ind i et fag-bibliotek. Ud fra 10 ml blod fra en kamel i Københavns Zoologiske Have har vi lavet et stort 'naivt' nanobody fag-bibliotek med ca. 70 millioner kloner, som kan bruges til at isolere nanobodies mod forskellige proteiner i menneskekroppen eller fra bakterier.

C Nanobodies binder i dybe lommer på antigener. Det skyldes deres specielle konvekse struktur, som bruges til bindingen.

børn, og her kan der være tale om en speciel form af sygdommen, hvor knogledbrydningen går ekstra hurtigt, hvilket kræver mange og omfattende behandlinger. Endelig har den nyeste forskning vist, at paradentose kan føre til andre lidelser i kroppen, især hjerte-kar-sygdomme, sukkersyge og leddegigt. Derfor er en hurtig og præcis detektion af paradentosebakterier vigtig for at kunne identificere sygdommen på et tidligt tidspunkt, så en korrekt behandling kan blive sat i værk. Desuden kan en sådan test bruges til at måle effekten af antibiotikabehandlinger.

Måling i spytpøver

I mundhulen findes der hundredevis af forskellige bakterier, men kun en lille gruppe forårsager paradentose. En af de værste hedder *Porphyromonas gingivalis*, og denne bakterie producerer som den eneste et proteaseenzym – RgpB – som nedbryder knoglevævet omkring tanden. Vi har derfor

valgt at benytte RgpB som en specifik biomarkør for denne patogene bakterie.

Vi brugte vores bibliotek til at isolere et nanobody, der binder sig til enzymet, og det udvalgte nanobody blev efterfølgende anvendt til at udvikle en test til specifik detektion af RgpB på overfladen af *P. gingivalis*. Testen kan foretages i spytpøver, hvilket gør det nemt at få biologisk materiale fra patienten til undersøgelsen. Vores metode kan potentielt overføres til en nem og hurtig test i stil med en graviditetstest. Det vil give tandlægen et nyttigt redskab, som kan bruges i klinikken, og som ikke er afhængig af stort og kompliceret laboratorieudstyr.

Udover dette projekt arbejder vi målrettet med at udnytte nanobody-teknologien til at udvikle lægemidler rettet mod receptorer i centralnervesystemet til behandling af psykiatriske lidelser, til at neutralisere enzymer, som er involveret i kræft, samt til at bekæmpe skadelige bakterielle enzymer.

Ph.d. Peter Durand Skottrup er postdoc på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Rasmus Prætorius Clausen er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Erik Riise er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

