

## Summary

Almost a century ago, antibodies were envisioned as ‘magic bullets’ for the specific targeting of disease sites, but until recently they struggled to meet their expectations. Clinical success with monoclonal antibodies has now reinforced the role of these molecules as a major source of drugs for the treatments of human diseases. Furthermore, protein engineering led to the design of smaller recombinant antibody fragments, such as Fabs (~50 kDa) and single-chain Fv fragments (~25 kDa), which are emerging as credible alternatives. Even single immunoglobulin variable domains have been engineered and shown to retain their antigen-binding capacity and functionality. It is anticipated that these domain antibodies (dAbs) will expand the repertoire of antibody-based reagents against a vast range of novel biomarkers. Unfortunately, dAbs are often associated with poor stability and solubility and low levels of expression. Nanobodies, single-domain antigen-binding fragments of camelid-specific heavy-chain only antibodies offer in this respect special advantages over classical antibody fragments because of their smaller size, robustness, improved solubility and a high degree of specificity and affinity for their antigen without requiring VL-domain pairing.

The beneficial properties of Nanobodies have been attributed to the unique presence of four hallmark amino acids in the framework-2 region (positions 42, 49, 50, 52) and a longer third antigen-binding loop (H3) folding over this area. Human dAbs have been engineered, i.e. camelized, by integrating in their sequences the Nanobody hallmark residues, in an attempt to develop well-behaved entities. Additional studies suggested that other mutations within a VH domain might contribute to the solubility of dAbs as well. We evaluated, in this study the substitution of a residue at position 118, abutting the CDR3 region as an alternative approach to generate an autonomous human dAb library.

However, in many aspects, Nanobodies remain superior to camelized VH domains. Obviously, for therapeutic applications, Nanobodies require to be humanized, i.e. mutating camelid-specific amino acid sequences in the framework to their human VH equivalent. We performed this humanization exercise on Nanobodies from different *VHH* subfamilies and investigated the effects on their biochemical and biophysical properties. We demonstrated that the humanization of Nanobody-specific residues outside framework-2, are neutral to the Nanobody properties. Surprisingly, the Glu49Gly and Arg50Leu humanization of hallmark amino acids generates a single domain that is more stable though probably less soluble. The other framework-2 substitutions, Tyr/Phe42Val and Gly/Ala52Trp, are detrimental for antigen affinity, due to a repositioning of the H3 loop as shown by their crystal structures. In addition, imprinting the sequence signature of a human VH in a *VHH* restores the VL binding capacity of a Nanobody with a short CDR3 loop that does not cover the former VL binding site. These insights were employed to identify a soluble, stable, well expressed universal humanized Nanobody scaffold that allows grafts of antigen-binding loops from other Nanobodies for transfer of the antigen specificity and affinity.

Nanobodies are expected to provide new binding specificities and are creating possibilities for the development of therapeutic compounds to treat amyloid disorders such as Alzheimer’s disease, a neurodegenerative impairment evolving towards a major public health issue. The amyloid cascade hypothesis holds that generation and deposition of the amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ; 40-42 amino acids), obtained by cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase, are key events driving neurodegeneration in AD. We explored several approaches based on Nanobodies aiming at reducing or preventing  $A\beta$  production and fibrillation to develop next-generation therapeutics. Successful immunization of a llama with  $A\beta$  resulted in the isolation of several  $A\beta$ -specific Nanobodies, which recognize their antigen with affinities in the nanomolar range. The targeted epitope was identified to be located between the residues 18 and 25 of the  $A\beta$ -peptide. This region of the peptide plays a central role in the peptide-peptide interactions, which was confirmed by the ability of the  $A\beta$ -specific Nanobodies to inhibit fibril formation in a concentration dependent manner. Alternatively, the unique property of Nanobodies to preferentially target the catalytic site of enzymes provides a unique opportunity to reduce  $A\beta$  accumulation by inhibiting  $\beta$ -secretase (BACE1). BACE1 inhibitors are widely accepted as a promising therapeutic strategy since this enzyme represents the initiating and rate-limiting step in the production of the  $A\beta$ -peptide. A myriad of Nanobodies were selected targeting different regions of BACE1 and were characterized on their ability to inhibit the enzyme’s activity. Three different inhibitory Nanobodies were identified and demonstrated to influence APP processing in primary neurons.

## Samenvatting

Al meer dan een eeuw geleden werden antilichamen beschouwd als ‘magic bullets’ om zeer specifiek ziekte-doelwitten te herkennen, maar tot voor kort, waren de hoge verwachtingen moeilijk in te lossen. Recente klinische successen met monoclonale antilichamen hebben de rol van deze moleculen als belangrijke bron van geneesmiddelen voor het behandelen van menselijke ziekten versterkt. Bijkomend werden over de jaren heen ook verschillende kleinere antigeen-bindende varianten, zoals Fabs (~50 kDa) en *single-chain* Fv fragmenten (~25 kDa) ontwikkeld, die nu opkomen als geloofwaardige alternatieven. Zelfs enkeldomein variabel antilichaam fragmenten werden aangetoond hun antigeen-bindingscapaciteit en functionaliteit te behouden. Voor deze domein antilichamen wordt verwacht dat ze het toepassingsgebied van antilichaam-gebaseerde producten tegen een brede waaier van nieuwe biomerkers zullen uitbreiden. Dergelijke domein antilichamen gaan echter vaak gepaard met verlaagde expressie, oplosbaarheid en stabiliteit, waarschijnlijk te wijten aan de blootstelling aan het solvent van hydrofobische gebieden van het VH domein die gewoonlijk in contact zijn met een VL domein. Nanobodies, enkeldomein antigeen-bindende fragmenten van kameel-specifieke zware keten antilichamen, bieden in dit opzicht bijzondere voordelen vergeleken met conventionele antilichamen, doordat ze erg klein zijn, bestand zijn tegen extreme omstandigheden en beschikken over een goede oplosbaarheid en een hoge graad van specificiteit en affiniteit voor hun antigeen zonder vereiste van associatie met een VL domein.

De gunstige eigenschappen van Nanobodies (of VHHs) werden toegeschreven aan vier kenmerkende Nanobody-specifieke aminozuren in het *framework-2* gebied (posities 42, 49, 50 en 52) en een verlengde derde antigeen-bindende lus (H3) die over dit gebied plooit. Mens VHs werden verbeterd door ‘kamelizatie’, een strategie die berust op het inbrengen van de kenmerkende Nanobody-specifieke aminozuren in mens VH sequenties, in een poging om autonome entiteiten te ontwikkelen. Bijkomende studies toonden aan dat andere mutaties in een VH domein ook kunnen bijdragen tot de oplosbaarheid van domein antilichamen. In deze studie hebben we onderzoek gedaan naar de vervanging van een aminozuur op positie 118, gelegen naast de CDR3, met als doel een bank van oplosbare mens VH domeinen te genereren.

Desondanks blijven Nanobodies vaak superieur in vergelijking met ‘gekamelizeerde’ VH domeinen. Voor therapeutische toepassingen dienen Nanobodies allicht gehumaniseerd te worden, door kameel-specifieke aminozuren te vervangen door de aminozuren die op deze plaats voorkomen in mens VH. We voltooiden deze humanizatie met Nanobodies van verschillende subfamilies en onderzochten de invloed hiervan op hun biochemische en biofysische eigenschappen. We toonden aan dat het humanizeren van Nanobody-specifieke residus buiten het *framework-2* gebied, nauwelijks invloed hadden op de eigenschappen van Nanobodies. Opvallend was dat de humanizatie van de VHH-kenmerkende residus Glu49Gly en Arg50Leu leidde tot een stabielere enkeldomein antilichaam fragment, hoewel waarschijnlijk minder oplosbaar. De overige vervangingen in *framework-2*, Phe/Tyr42Val en Gly/Ala52Trp hebben een negatieve invloed op de antigeen affiniteit, veroorzaakt door een verplaatsing van de H3 lus zoals aangetoond door hun kristalstructuur. Verder kon aangetoond worden dat het inbrengen van humane VH residus in een VHH, met een korte H3 lus die niet plooit over de voormalige VL bindingsplaats, zijn vermogen om te binden met een VL domein hersteld. Deze bevindingen werden gebruikt voor het ontwerpen van een oplosbaar en stabiel universeel, gehumaniseerd Nanobody met goede expressie die het inbrengen van antigeen-bindende lussen van andere Nanobodies toelaat met overdracht van antigeen affiniteit en specificiteit tot resultaat.

Van Nanobodies wordt verwacht dat ze nieuwe bindingsspecificiteiten aanleveren en mogelijkheden bieden om nieuwe therapeutische componenten te ontwikkelen in de behandeling van amyloïdosen zoals de ziekte van Alzheimer, een neurodegeneratieve verstoring, die evolueert tot een wereldwijd gezondheidsprobleem. De amyloïde hypothese houdt in dat vorming en accumulatie van het amyloïd- $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ; 40-42 aminozuren lang), ontstaan uit het knippen van APP (*amyloid precursor protein*) door  $\beta$ - en  $\gamma$ -secretase, aan de basis liggen van de neurodegeneratie in de ziekte van Alzheimer. We onderzochten in deze studie verschillende therapeutische alternatieven om de productie en fibrillatie van  $A\beta$  te minderen met behulp van Nanobodies. Een lama werd geïmmuniseerd met  $A\beta$  en dit leidde tot de isolatie van verscheidene  $A\beta$ -specifieke Nanobodies, welke het antigeen binden met nanomolaire affiniteit. Het herkende epitoom werd gesitueerd tussen residus 18 en 25 van het  $A\beta$ -peptide. Dit gebied van het peptide speelt een centrale rol tijdens de interacties tussen peptiden. Dit werd bevestigd door de capaciteit van de Nanobodies om fibrilvorming te

voorkomen op een concentratie afhankelijke wijze. De unieke eigenschap van Nanobodies om bij voorkeur de katalytische site van enzymen te herkennen, leverde een bijkomende mogelijkheid, gebaseerd op de inhibitie van BACE1, om de accumulatie van A $\beta$  tegen te gaan. BACE1 inhibitoren worden algemeen aanzien als een veelbelovende therapeutische strategie, aangezien dit enzym de initiële en limiterende stap vormt voor de productie van het A $\beta$ -peptide. Talrijke Nanobodies werden geselecteerd die verschillende gebieden van het BACE1 enzym herkennen en werden gekarakteriseerd op hun vermogen om de activiteit van BACE1 te inhiberen. Drie verschillende Nanobodies werden geïdentificeerd die in staat zijn de APP afbraak te beïnvloeden in primaire neuronen.