

**Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-
Verbundprojekt**

Entwicklung und Implementierung eines COVID-19-scFv-TRAP-Portfolios für
diagnostische und therapeutische Anwendungen (COVITRAP);

Teilvorhaben: Entwicklung eines Antikörperfragment-Polymer Konjugats als
multivalentes Therapeutikum gegen Viren

Förderkennzeichen:

01DP2102

Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., Postfach
20 07 33, 80007 München

Ausführende Stelle:

Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP, Geiselbergstr. 69,
14476 Potsdam

Projektleitung:

Dr. Ulrich Glebe

Projektlaufzeit:

01.11.2021 bis 31.10.2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren
Yannic Müllers, Dr. Anne Krüger-Genge und Dr. Ulrich Glebe

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung und wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Es gibt bisher kaum Medikamente gegen Viruserkrankungen. Antikörper, die an Oberflächenproteine von Viren binden, sind daher eine Möglichkeit. Da die Herstellung von Antikörpern aufwändig und teuer ist, sind Nanobodies, kleine Fragmente von Antikörpern, eine Alternative. Deren Stabilität ist jedoch vergleichsweise gering und sie haben eine kürzere Verweilzeit im Körper als Antikörper. Eine Stabilisierung kann durch die Anbindung von Polymeren erfolgen. Bisher sind nur Konjugate von therapeutischen Proteinen mit Polyethylenglykol (PEG) klinisch zugelassen. Allerdings wurden inzwischen anti-PEG Antikörper in vielen Menschen nachgewiesen, die zu einer schnellen Entfernung PEGylierter Wirkstoffe aus dem Körper führen. In dem Fall ist deren therapeutische Wirkung stark vermindert.

Im Rahmen des Projekts COVITRAP war unser Ziel, Protein-Polymer-Konjugate mit einem Nanobody gegen SARS-CoV-2 herzustellen. Nach bestätigter Wirksamkeit können diese Konjugate (nach Austausch des Nanobodies) als Plattform auch zur Behandlung anderer viraler Erkrankungen genutzt werden. Im Rahmen des Antrags haben wir die folgenden Hypothesen und Zielsetzungen verfolgt.

1. Die Konjugation eines Nanobodies mit Polymeren stabilisiert diesen und soll den etablierten Effekt, dass eine PEGylierung die Zirkulationszeit von therapeutischen Proteinen im Körper verlängert, auf Nanobodies gegen SARS-CoV-2 übertragen
2. Die Verwendung alternativer Polymere statt PEG soll sicherstellen, dass auch bei Vorliegen von anti-PEG Antikörpern keine beschleunigte Entfernung der Nanobody-Polymer-Konjugate aus dem Körper erfolgt
3. Die hergestellten Nanobody-Polymer-Konjugate sollen hinsichtlich ihres Potentials zur Virus-inaktivierung und ihrer Zytotoxizität untersucht werden, um ihre Eignung als Therapeutika oder zur prophylaktischen Anwendung bewerten zu können
4. Die Spikeproteine von SARS-CoV-2 haben 3 Bindestellen für Rezeptoren menschlicher Zellen bzw. Antikörper / Nanobodies. Es sollen somit multivalenten Konjugate durch Verlinkung mehrerer Nanobodies durch ein Polymer synthetisiert werden, deren Effizienz zur Virus-Inaktivierung noch höher als von monovalenten Konjugaten sein könnte

Mehrere Nanobodies gegen SARS-CoV-2 sind inzwischen bekannt. Wir haben den Nanobody „Ty1“ verwendet, da dieser eine hohe Bindungsaffinität an das Spikeprotein gezeigt hat und ortsspezifisch durch Sortase-vermittelte Ligation (SML) modifiziert werden kann.

2. Ablauf des Vorhabens

In regelmäßigen Videokonferenzen, meistens 1-mal/Monat, wurde der Projektfortschritt der drei Partner, der Universität Gent in Belgien (Projektkoordinator), der Universität Padjadjaran in Indonesien und dem Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam, besprochen. In Gent wurden auf Mikrofluidik-basierende Nachweismethoden entwickelt. In Indonesien wurden Antikörperfragmente gegen SARS-CoV-2 hergestellt. Bis diese für die beiden europäischen Projektpartner zur Verfügung gestellt werden konnten, wurde im IAP mit dem Modellsystem Ty1 gearbeitet, um die Konjugatsynthese zu etablieren. Die erhaltenen Ergebnisse zu Ty1-Polymer-Konjugaten sind in 3. zusammengefasst.

3. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Wir haben ortsspezifische Ty1-Polymer-Konjugate, also mit einer Polymerkette an einer vordefinierten Stelle von Ty1, synthetisiert. Dafür wurde eine Kombination von Sortase-vermittelter Ligation am C-Terminus von Ty1 und anschließender Anbindung verschiedener Polymere durch eine Klick-Reaktion (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) angewendet. Die Konjugate wurden mit verschiedenen Polymeren, die eine Alternative zu PEG darstellen, hergestellt. Durch Biolayer Interferometrie (BLI) und einem COVID-19 Pseudovirus-Neutralisationsassay wurde die Affinität der Bindung an SARS-CoV-2 Spikeproteine und die Abschirmungseigenschaften mit Virus-ähnlichen Partikeln untersucht. Für letzteres wurde ein Pseudovirus, der das SARS-CoV-2 Spikeprotein in seiner Hülle enthält, verwendet. In diesem COVID-19 Pseudovirus-Assay haben die Konjugate hervorragende Neutralisierungseigenschaften gezeigt, die z.T. signifikant besser als von unmodifizierten Nanobodies waren.

Alle hergestellten Polymere (OEGMA-N₃, HPMA70-N₃, HPMA140-N₃, HPMA280-N₃, PEG2k-N₃, PEG5k-N₃, DMA90-N₃) wurden laut DIN EN ISO 10993-5 hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in verschiedenen Konzentrationen untersucht und als nicht toxisch bewertet. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der hergestellten Konjugate mit regiospezifischen humanen, primären, venösen Endothelzellen (HUVEC) bezüglich einer möglichen Zellschädigung und eingeschränkter Zellfunktion. Diese Untersuchung war erforderlich, da eine intravenöse Gabe der späteren Therapeutika angenommen wird. Endothelzellen stellen die innerste Schicht des gesamten Blutgefäßes dar, so dass eine Untersuchung der Konjugate mit diesen Zellen einen guten Überblick ihrer Kompatibilität gibt. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass die Ty1-Polymer-Konjugate keinen negativen Einfluss auf die untersuchten zellulären Parameter der HUVEC ausübten.

Bei multivalenten Konjugaten gegen Viren ist eine Re-Bindung (Ablösen einer Bindungsgruppe und erneutes Anbinden an die Virusoberfläche, da viele Bindungsgruppen in räumlicher Nähe gehalten werden) und ein Multivalenzeffekt (gleichzeitiges Binden mehrerer Bindungsgruppen an einen Virus) denkbar. Als Beitrag zur Unterscheidung dieser zwei Bindungsphänomene wurden bivalente Konjugate, zwei Nanobodies, die durch unterschiedlich lange Polymere miteinander verbunden sind, synthetisiert. Außerdem wurden mehrere Polymere zur Synthese multivalenter Konjugate – mehrere, durch eine Polymerkette verbundene Nanobodies – hergestellt. Die bi- und multivalenten Konjugate werden im Anschluss an die Projektlaufzeit hinsichtlich ihrer Affinität an SARS-CoV-2 Spikeproteine zu binden und ihrer Virus-Neutralisierung charakterisiert.

Ty1 wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Petra Wendler (Universität Potsdam) und dem Projektpartner Puxano hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sortase A wurde durch die Gruppe von Prof. Dr. Heiko Möller (Universität Potsdam) produziert und zur Verfügung gestellt. Die Klick-Reaktion zur Anbindung der Polymere an das Protein ist eine zu biologischen Prozessen orthogonale Reaktion, die häufig angewendet wird (Nobelpreis für Chemie 2022). Die Kinetik und Effizienz dieser Reaktion mit Makromolekülen wurde im Rahmen einer Dienstreise zu dem Partner UGENT mittels Mikrofluidik untersucht. Die BLI-Messungen erfolgten bei PUXANO.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelfall, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

AP 1: Entwicklung eines scFv-Portfolios gegen Oberflächenproteine von SARS-CoV-2 (UNPAD/PXN)

An der Universität Padjadjaran (UNPAD, Indonesien) wurden Antikörper-Fragmente entwickelt, die an das Spikeprotein von SARS-CoV-2 binden. Die scFv-Fragmente (von Engl. single-chain variable fragment) setzen sich aus Teilen der leichten und schweren Kette monoklonaler Antikörper zusammen (Abb. 1a). Die Domänen VL (variable light) und VH (variable heavy) sind über einen Linker verbunden. Ein Abschnitt aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP, Engl. green fluorescent protein) ermöglicht die Fluoreszenz-Detektion der Antikörper-Fragmente. Bei UNPAD wurden zwei Varianten des scFvs entwickelt, mit und ohne die Erkennungssequenz für das Enzym Sortase A. Das scFv-Fragment ohne diese Sequenz sollte bei PUXANO mit hochauflösender cryo-Elektronenmikroskopie hinsichtlich seiner Bindung an das Spikeprotein untersucht werden. Die Variante mit der Sortase A-Erkennungssequenz LPETGG kann an ihrem C-Terminus durch das Enzym Sortase A modifiziert werden, um eine Anbindung von Polymeren zu ermöglichen. Der sich an das LPETGG anschließende HIS-Tag wird zur Reinigung der scFvs verwendet und während der Sortase-vermittelten Ligation abgespalten. UNPAD hat ein auf dem in Abb. 1b gezeigten Design basierendes Antikörper-Fragment hergestellt. Schwierigkeiten bei der Herstellung, Reinigung und Maßstabsvergrößerung haben die Arbeiten bis Sommer 2023, wenige Monate vor Projektende, verzögert. Die Variante ohne Sortase A-Erkennungssequenz wurde an die Projektpartner in Belgien versendet, aber leider nicht in funktionaler Form erhalten. Eine Variante mit Sortase A-Erkennungssequenz wurde nicht verschickt.

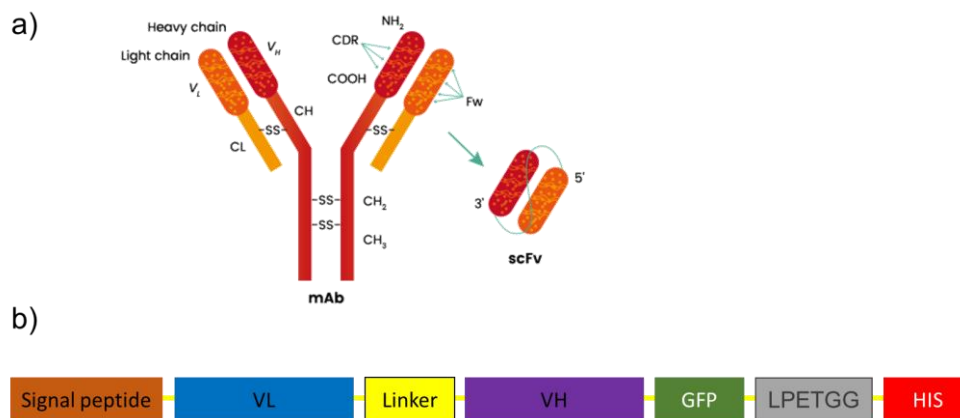


Abbildung 1: Verdeutlichung der Entwicklung von scFv-Antikörper-Fragmenten aus monoklonalen Antikörpern (mAb) (a) und Aufbau der bei UNPAD hergestellten scFv gegen SARS-CoV-2 am Beispiel der Variante mit Sortase A-Erkennungssequenz (b).

AP 2: Entwicklung einer neuartigen diagnostischen Plattform zur Erkennung von SARS-CoV-2-Viren oder Virus-ähnlichen Partikeln (UGENT/PXN/UNPAD/ FH-IAP)

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Messmethode für die Größe von Nano- und Mikropartikeln. Diese Methode wurde an der Universität Gent (UGENT, Belgien) in ein mikrofluidisches System integriert, welches die Detektion von Viren im Durchfluss ermöglichen soll. Bei einem auf Mikrofluidik basierenden Setup können schnelle Messungen mit hohen Auflösungen bei minimalen Probenvolumina erreicht werden. Im Rahmen von COVITRAP wurde eine Technologie entwickelt und getestet, um optische Sensoren in einen mikrofluidischen Aufbau zu integrieren. Mittels Femtosekunden-Laserbestrahlung gefolgt von chemischem Ätzen (FLICE) wurden sowohl Kanäle als auch optische Wellenleiter im selben Material realisiert. Dafür wurden Silica-Substrate verwendet und in einen Aufbau mit Laser, Detektor, Computer etc. integriert (Abb. 2). Der Aufbau wurde mit Standard-Polystyrol-Polymerpartikeln mit einem Durchmesser von ungefähr 200 nm erfolgreich getestet. Eine Lösung mit 0,01% Polymerpartikeln wurde durch den Mikrofluidik-Chip geleitet. Während der Laserbeleuchtung für 2 Sekunden wurde das gestreute Licht über einen faseroptischen Detektor aufgenommen und amplifiziert. Die Partikelgröße konnte präzise mit einer Standardabweichung unter 5% bestimmt werden. Durch die Verwendung von einem Partikeldurchmesser im Bereich von Viren wurde die Eignung zur weiteren Entwicklung von neuen optofluidischen Techniken für biomedizinische Anwendungen gezeigt.

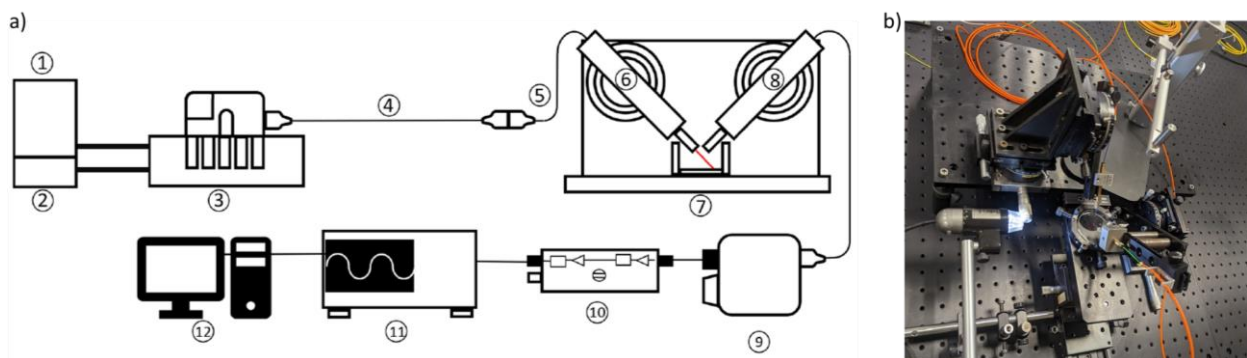


Abbildung 2: (a) Schematische Darstellung des faseroptischen DLS-Aufbaus. Die Komponenten umfassen (1) Laser Dioden-Controller, (2) TEC-Controller, (3) Halterung für Laserdioden mit (4) einer LP638-SF50 - 638 nm, 50 mW Laserdiode, (5) Anschlusskabel, (6) verstellbare Sondenhalter mit eintauchbaren Sondenspitzen, (7) kleinvolumige Probenzelle, (9) Photodetektor, (10) rauscharmer Stromverstärker mit variabler Verstärkung, (11) Oszilloskop, (12) PC. (b) Bild des DLS-Aufbaus im Labor. Übernommen aus ^[1].

AP 3: Entwicklung eines Antikörperfragment-Polymer-Konjugats als multivalentes Therapeutikum gegen Viren (FH-IAP/UNPAD/PXN)

Nachdem sich die scFv-Herstellung in Indonesien verzögerte, wurde im Projektkonsortium entschieden, dass wir ein anderes Modellsystem zur Etablierung der Konjugatsynthese verwenden. Hierbei haben wir uns für den aus Alpakas gewonnenen Nanobody Ty1 entschieden, der ein hohes Potenzial zur Neutralisierung von SARS-CoV-2 zeigte und auch schon in PEGylierter Form hergestellt wurde.^[2,3] Nanobodies sind kleine Fragmente von Antikörpern, welche schnell und tief ins Gewebe eindringen, eine hohe Stabilität, Löslichkeit und eine geringe Immunogenität besitzen und in ihrer Herstellung wesentlich kostengünstiger als Antikörper sind.^[4] Ihre schnelle Ausscheidung aus dem Körper ist jedoch nachteilig.

Ty1-LPETG wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Dr. Petra Wendler (Universität Potsdam) produziert (Abb. 3) und zur Verfügung gestellt. Anhand der Vorschrift der Gruppe von Prof. Wendler wurde weiteres Ty1 bei dem COVITRAP-Unterauftragnehmer PUXANO (Belgien) hergestellt. Für die Sortase-vermittelte Ligation wurde eine engineerete Sortase A-Variante verwendet, die von der Gruppe von Prof. Dr. Heiko Möller (Universität Potsdam) exprimiert und gereinigt wurde. Die Herstellung der rekombinanten Proteine in ausreichenden Mengen für die Konjugatsynthese war aufwändiger als erwartet. Letztlich wurden aber ausreichende Mengen erhalten, um alle Konjugate in der Projektlaufzeit herstellen zu können. Die monovalenten Konjugate konnten vollständig charakterisiert werden. Für die multivalenten Konjugate stehen manche Charakterisierungsmethoden noch aus und erfolgen auf eigene Kosten nach Ende der Projektlaufzeit.

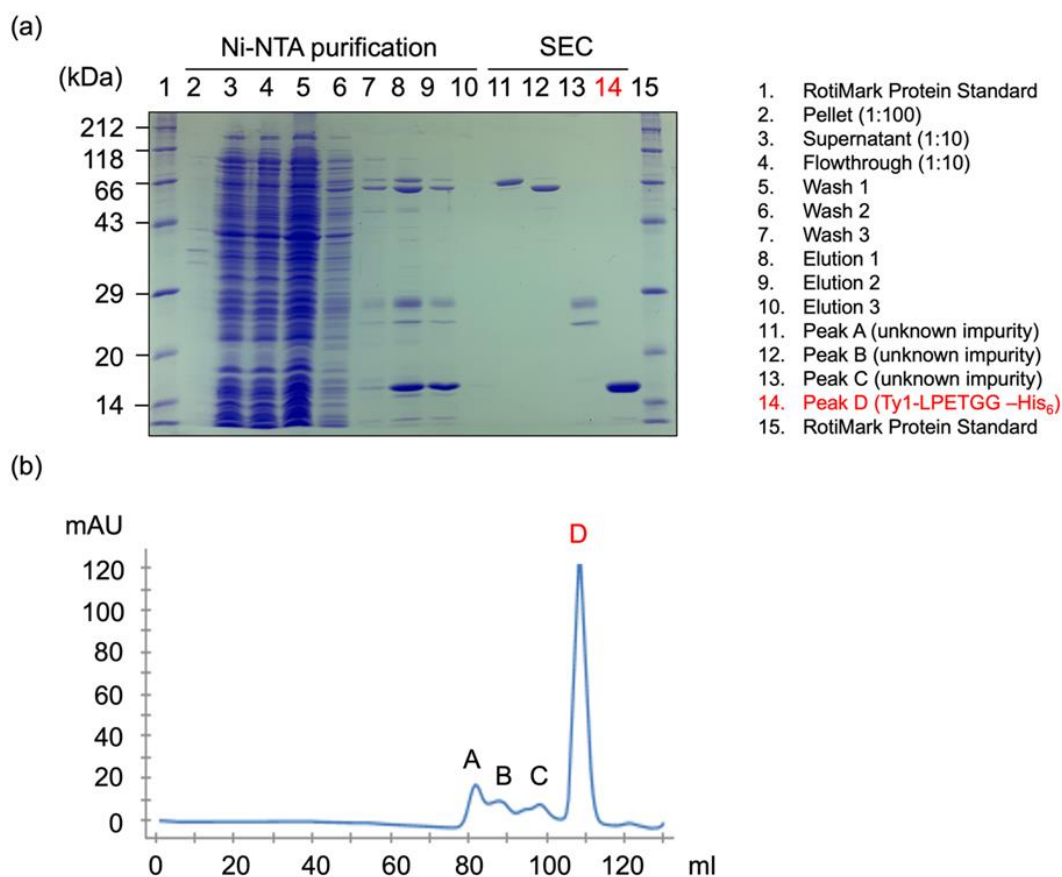


Abbildung 3: Aufreinigung von Ty1-LPETGG-H6 aus *E. coli*. SDS-PAGE der Affinitätschromatographie (Ni-NTA) und SEC-Proben (a). SEC-Profil der Ty1-LPETGG-H6-Reinigung auf einer Superose 6 XK 16 70-Säule, wobei Peak D den Fraktionen entspricht, die reines Ty1-LPETGG-H6 enthalten (b). Entnommen aus ^[5].

Synthese ortsspezifischer Ty1-Polymer-Konjugate

Therapeutische Proteine haben oft nur eine vergleichsweise kurze Zirkulationszeit im Blut, weil sie vom Immunsystem erkannt und schnell aus dem Körper entfernt werden. Die Konjugation von synthetischen Polymeren ist eine häufig genutzte Möglichkeit, um Proteine zu stabilisieren und ihre Halbwertszeit im Körper zu verlängern.^[6,7] Bislang wird dies ausschließlich durch Anbindung von Poly(ethylenglykol) (PEG) erreicht. Aktuell sind ca. 30 PEGylierte Proteine klinisch zugelassen. Jedoch haben inzwischen viele Menschen Antikörper gegen das omnipräsente PEG entwickelt, welche zu einer schnellen Ausscheidung

von PEGylierten Arzneimitteln beitragen.^[8,9] Entsprechend wichtig ist die Forschung zu PEG-Alternativen. Mehrere Polymere werden derzeit dafür in Betracht gezogen.^[6,8,10]

Wir haben im Rahmen des Projekts COVITRAP Ty1-Polymer-Konjugate in einem zweistufigen Ansatz synthetisiert. Zunächst wurden durch Sortase-vermittelte Ligation Klick-chemische Gruppen an den C-Terminus von Ty1 gebunden, um anschließend endfunktionalisierte Polymere durch eine Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) anzubinden (Abb. 4). Diese Synthesestrategie ist bekannt,^[2] wurde aber bisher nicht für die Synthese von Ty1-Konjugaten mit Polymeren verwendet, die als PEG-Ersatz in Frage kommen. Die ortsspezifische Modifizierung am C-Terminus stellt sicher, dass ein Polymer an einer Stelle des Nanobodies angebunden wird, an der keine Beeinträchtigung der Binderegion an das SARS-CoV-2 Spikeprotein erwartet wird.

Im ersten Schritt der SML-Reaktion wurde Ty1 mit einem Überschuss Dibenzocyclooctin-Amin (DBCO-Amin), einem gespannten Alkin, welches für die SPAAC geeignet ist, unter Katalyse von 10 Mol% Sortase A umgesetzt (Abb. 4-1). Die Entfernung von überschüssiger Sortase sowie unreaktiertem Ty1 wurde durch Behandlung der Reaktionslösung mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-(NiNTA)-Agarose Partikeln durchgeführt. Restliches DBCO-Amin wurde durch Zentrifugalfiltration über einer Membran mit *molecular weight cut-off* (MWCO) von 3 kDa entfernt. Die SPAAC erfolgte durch Anbindung einer Reihe von Azid-modifizierten Polymeren mit einem Überschuss von 4 Äquivalenten über 48 Stunden (Abb. 4-2). Freies Polymer wurde schließlich über Ionenaustauschchromatographie (IEX) mittels einem starken Kationenaustauschharz in 20 mM Phosphatpuffer pH 6.4 und einem NaCl Gradienten entfernt.

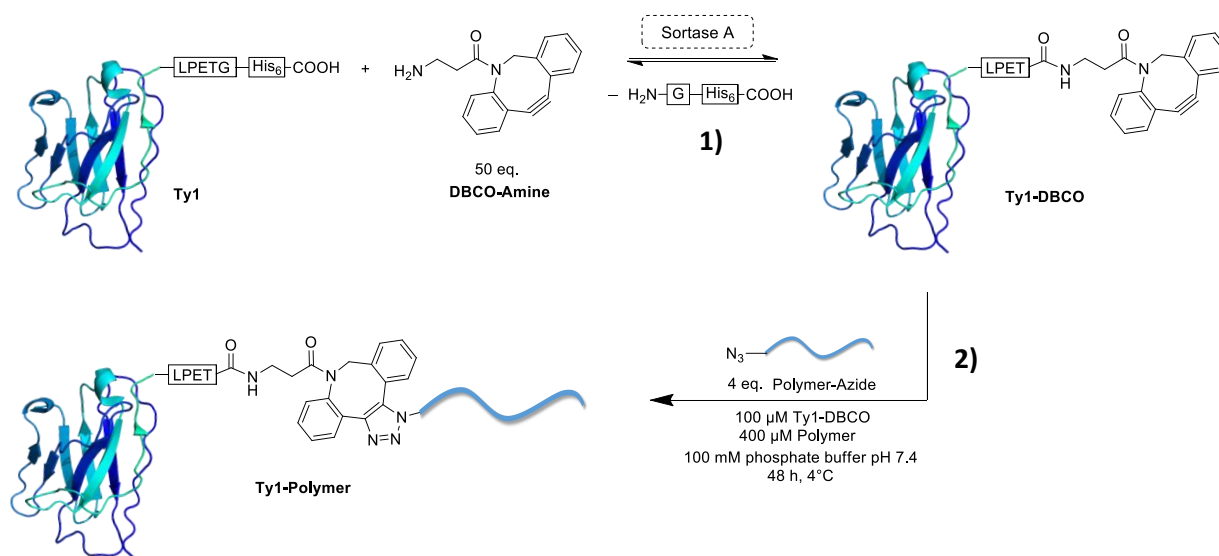


Abbildung 4: Übersicht der Synthese von Ty1-Polymer-Konjugaten durch SML (1) und SPAAC (2).

Wir haben drei Polymere, die als PEG-Ersatz diskutiert werden, Poly(dimethylacrylamid) (PDMA), Poly(oligoethylenglycolmethacrylat) (POEGMA) und Poly(2-hydroxypropylmethacrylamid) (PHPMA; mit drei verschiedenen Kettenlängen) verwendet und, zum Vergleich, PEG (mit zwei verschiedenen Kettenlängen) (Abb. 5b). PDMA, POEGMA und PHPMA wurden mit einer Azid-Endgruppe durch RAFT-Polymerisation synthetisiert (Abb. 5a). Dazu wurde ein carbonsäurehaltiger CTA (für Englisch chain-transfer agent) mittels dem Aktivierungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)

und 2-Azidoethylamin umgesetzt. Der erhaltene CTA mit Azidgruppe wurde anschließend zur Generierung der verschiedenen Polymere, unter Zuhilfenahme von Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Radikalquelle, genutzt. PEG wurde kommerziell bezogen und die Azid-Endgruppe in einer Post-Polymerisationsfunktionalisierung analog nach Bisso *et al.* eingebaut.^[11]

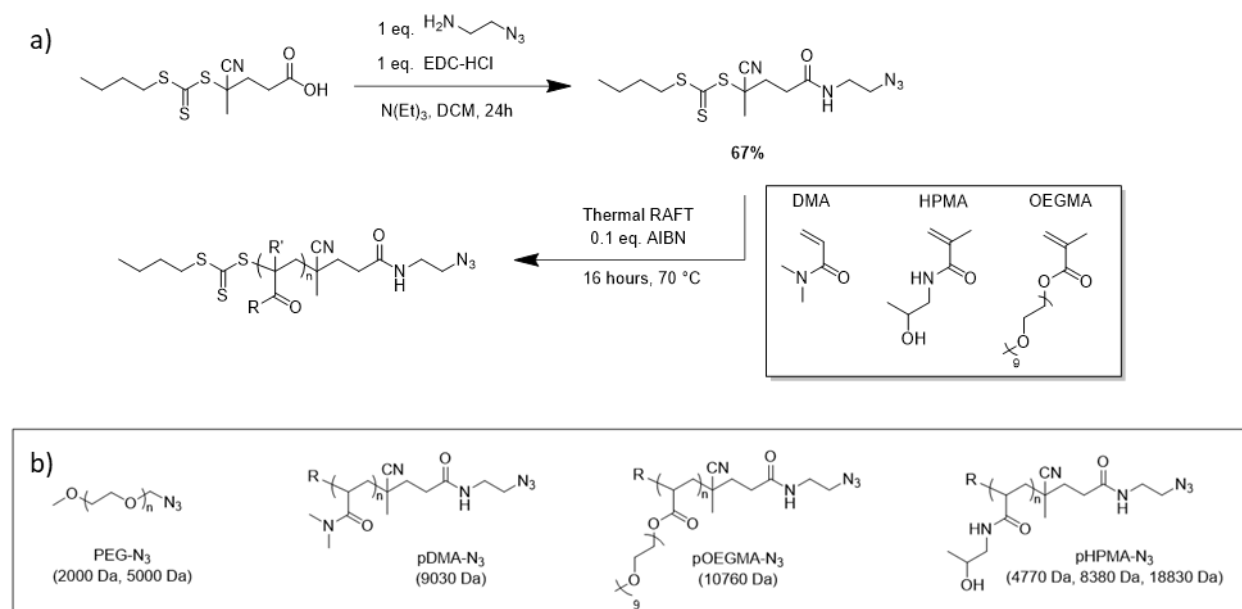


Abbildung 5: Reaktionsschema der Synthese von Azid-haltigem RAFT-CTA sowie thermischer RAFT-Polymerisation mit DMA, HPMA und OEGMA (a). Abbildung aller Azid-funktionalisierten Polymere (b).

Charakterisierung ortsspezifischer Ty1-Polymer-Konjugate

Die erfolgreiche Synthese der Konjugate wurde durch SDS-PAGE (Abb. 6a) und MALDI-ToF Massenspektrometrie (Abb. 6b) nachgewiesen. In der Gelelektrophorese können dabei unmodifizierter Nanobody Ty1 und der über SML veränderte Nanobody mit reaktivem Alkin, Ty1-DBCO, unterschieden werden. Bei den Nanobody-Polymer-Konjugaten sind zu höheren Massen verschobene und, für Protein-Polymer Konjugate charakteristische, breite Banden zu sehen, welche auf die erfolgreiche Funktionalisierung hinweisen.

Die durch MALDI-ToF-MS ermittelten Massen konnten vollständig dem unmodifizierten Nanobody Ty1 und Ty1-DBCO sowie den Polymer-Konjugaten zugeordnet werden. Die erhaltenen Massen stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten überein. Auch hier sind die breiten Signale charakteristisch für Protein-Polymer-Konjugate.

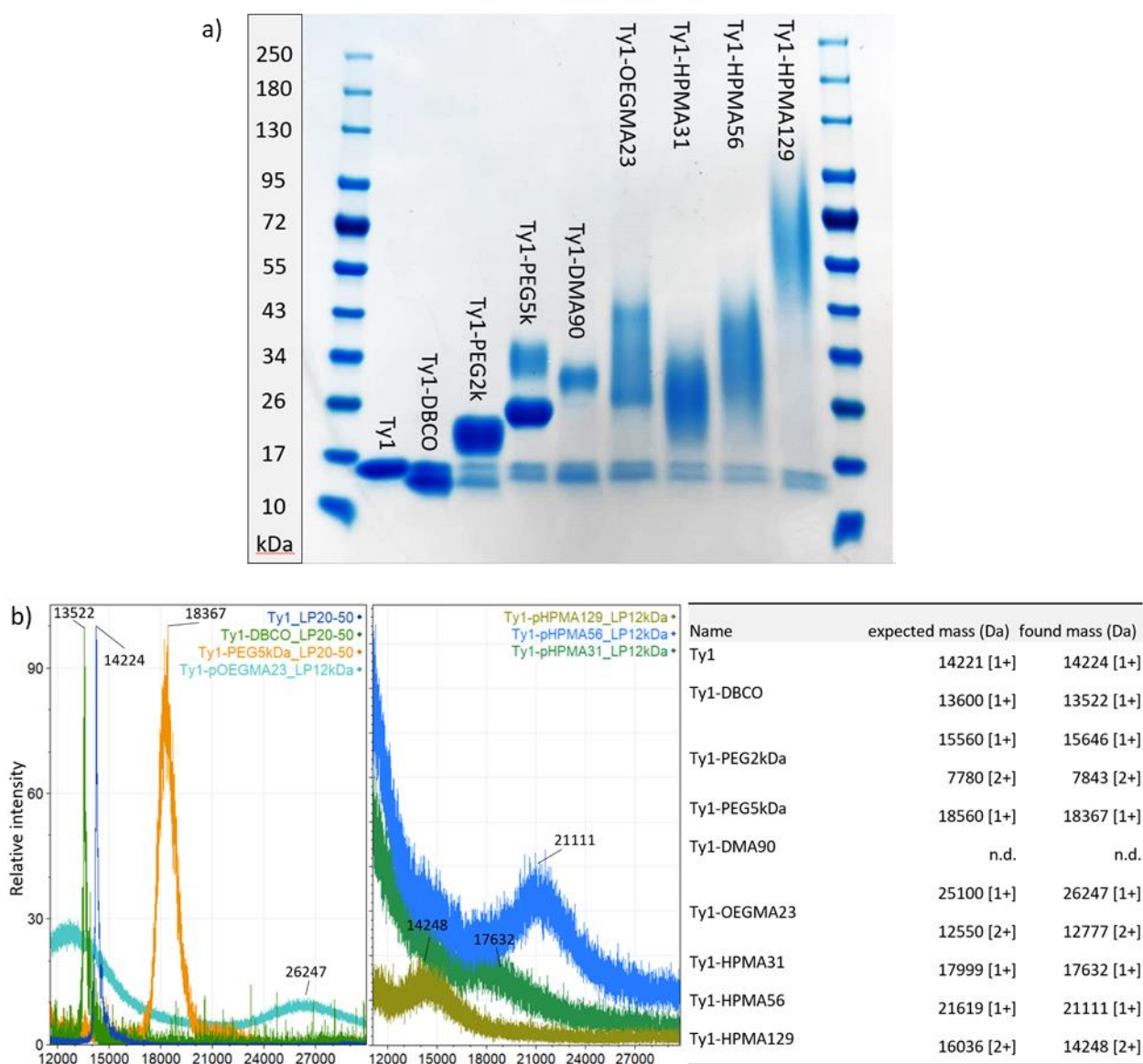


Abbildung 6: SDS-PAGE des unmodifizierten Nanobodys Ty1 sowie Produkte der SML zu Ty1-DBCO und Polymer-Konjugate nach SPAAC. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie Färbung (a). MALDI-ToF Spekten von Nanobody und Konjugaten (b). Nomenklatur: Ty1 – der Nanobody, PEG / DMA / OEGMA / HPMA – Art des Polymers, folgende Zahl – kennzeichnet die Länge des jeweiligen Polymers.

Alle Konjugate zeigten in der Biolayer-Interferometrie (BLI) eine einheitlich starke Bindung an das Spikeprotein von SARS-CoV-2 (Abb. 7). Die ermittelte Dissoziationskonstante (K_D) von Ty1 liegt mit 28 nM leicht über dem in der Literatur bekannten Wert von 5-10 nM.^[2] Der Vergleich mit den durch BLI ermittelten Konstanten der Konjugate verdeutlicht, dass die Anbindung der Polymere keinen nachteiligen Effekt auf die Bindung an das Spikeprotein hat.

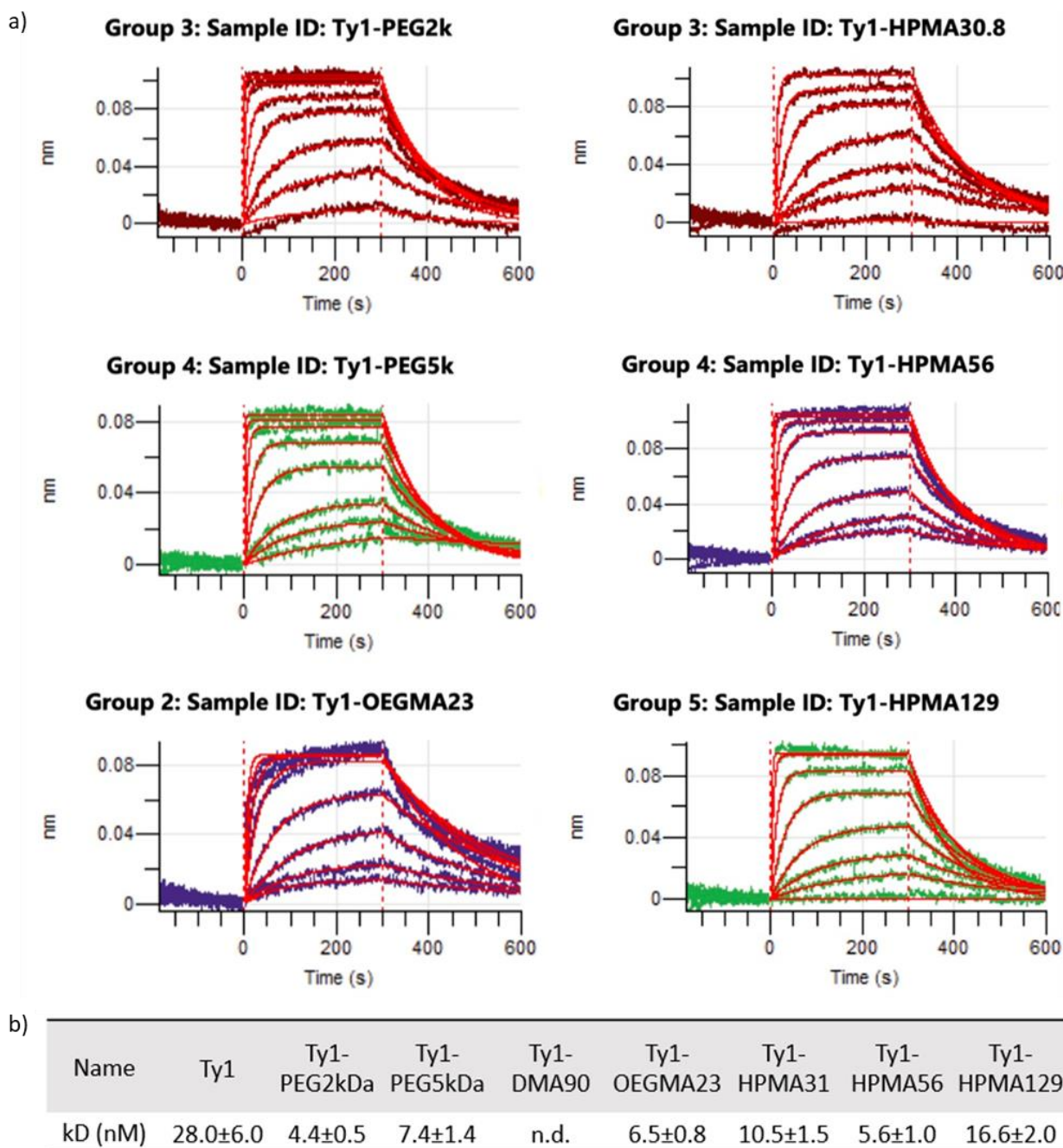


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige BLI-Messungen der verschiedenen Konjugate mit dem SARS-CoV-2-Spikeprotein (a) und daraus ermittelte Dissoziationskonstanten (b).

Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Konjugate zur Neutralisation von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) über einen Zell-basierten Luziferase Assay (Neutralisationsassay) bestimmt. Der unmodifizierte Nanobody zeigte dabei eine gute Neutralisation ähnlich den publizierten Werten (Abb. 8a).^[2] Bemerkenswerterweise waren die Konjugate mit PEG, PDMA und POEGMA bei der Virusinaktivierung effektiver als der ursprüngliche Nanobody, was unseres Wissens nach bisher noch nicht beobachtet wurde (Abb. 8b). Die Konjugate mit HPMA zeigten eine mindestens gleichwertige Fähigkeit zur Inhibierung der Virusinfektion im Vergleich zu Ty1. Aus den Daten kann abgeleitet werden, dass die Länge der hier genutzten Polymere keinen Einfluss auf die Neutralisationswirkung hat. Vielmehr beeinflusst die „Art“ des Polymers die Neutralisationsfähigkeit.

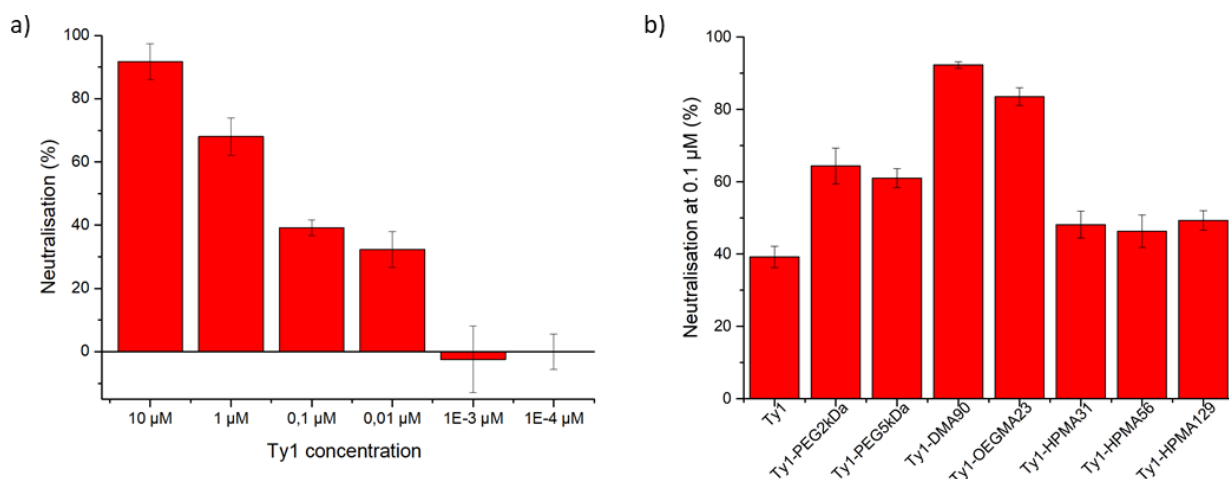


Abbildung 8: Neutralisationsassay mit unterschiedlicher Ty1 Konzentration (a) und den verschiedenen Konjugaten bei einer Konzentration von 0,1 µM (b).

Untersuchung der Zytotoxizität und Kompatibilität mit regiospezifischen Zellen

Da eine spätere Anwendung als Medizinprodukt angedacht ist, wurden die hergestellten Polymere, welche später für die Proteinkonjugate verwendet wurden, in einem ersten Schritt bezüglich ihrer Zytotoxizität laut DIN EN ISO 10993-5 untersucht.

Um einen initialen Überblick der Zytotoxizität zu erhalten, wurden verschiedene Polymere mittels Zellimpedanz untersucht. Eine toxische Probe, welche in „Echtzeit“ mittels Zellimpedanz untersucht wird, zeigt sich nach Probenzugabe durch einen raschen Kurvenabfall. Es wurde hierbei aber deutlich, dass alle Proben in der zugesetzten Konzentration (jede Probe wurde mit jeweils 10 und 100 µg/ml getestet) und im untersuchten Beobachtungszeitraum nicht toxisch waren (Abb. 9).

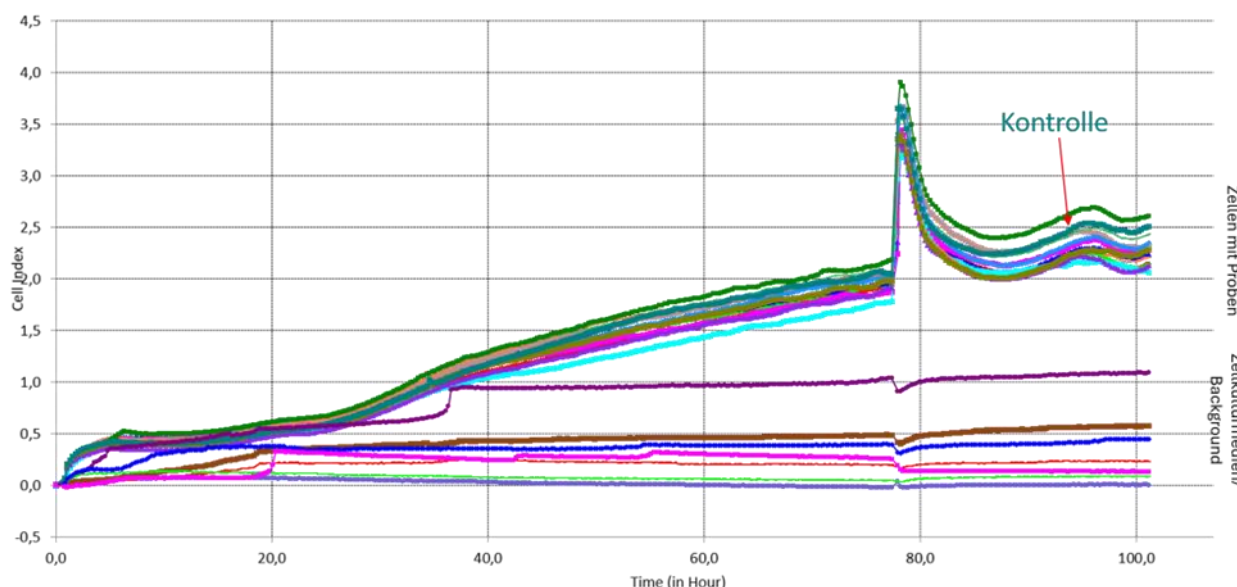


Abbildung 9: Aussaat von L929 Zellen mit Probenzugabe ca. 75 h nach Zellaussaat mit ca 48 h Inkubationszeit (sichtbar durch den Peak). Folgende Proben wurden untersucht mit jeweils 10 und 100 µg/ml: pDMA95-co-pAA5, pDMA95-co-pAA5, pDMA95-co-pPFA5, pDMA50, pDMA65-Azid, pDMA57-Alkin. Die ersten drei Polymere sind beispielhaft zur Synthese multivalenter Konjugate und die letzten drei beispielhaft zur Synthese monovalenter Konjugate ausgewählt.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zytotoxizität laut DIN EN ISO 10993 mit L929 Zellen. Es wurden die folgenden Polymere untersucht: OEGMA23-N3, HPMa31-N3, HPMa56-N3, HPMa128-N3, PEG2kDa-N3, PEG5kDa-N3, DMA90-N3. Die Untersuchung erfolgte nach der Herstellung von Extrakten, welche anschließend in 2 Konzentrationen über 24 h mit L929 Zellen inkubiert wurden. Anschließend wurden 5 zelluläre Parameter bestimmt: Gesamtzellzahl, Zellvitalität, Zellmembranintegrität, Zellmetabolismus und Zellmorphologie. Jeder Parameter wurde hierbei separat untersucht und ermöglichte anschließend eine Gesamtbeurteilung der Probe. Alle Proben wurden hierbei als nicht zytotoxisch in den untersuchten Konzentrationen beurteilt (Ergebnis nicht dargestellt; siehe Anhang).

Nach bestandener Zytotoxizitätsuntersuchung erfolgte die Untersuchung der Protein-Polymer-Konjugate bezüglich ihrer Kompatibilität mit humanen, primären, venösen Endothelzellen (HUVEC), da eine spätere Anwendung nach intravenöser Gabe wahrscheinlich ist. Es wurden hierbei die folgenden Protein-Polymer-Konjugate untersucht: Ty1-OEGMA23, Ty1-PEG5kDa, Ty1-DMA90, Ty1-HPMA56. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, welche mit dem Ty1-Nanobody allein behandelt wurden. Nanobody bzw. Protein-Polymer-Konjugate wurden hierbei in einer Konzentration von 0,1 μ M mit den Zellen inkubiert. Die folgenden Parameter wurden analysiert: 1. Einfluss der Konjugate auf die Zellmorphologie, 2. Zellmembranintegrität, 3. Zellmetabolismus, 4. Zellvitalität und 5. Zellfunktion.

Es wurde hierbei deutlich, dass die Morphologie der HUVEC nach einer Inkubationszeit von 24 h nicht negativ beeinflusst wurde. Sowohl die unbehandelten, als auch die konjugat- und nanobodybehandelten Zellen waren vergleichbar (siehe Abb. 10).

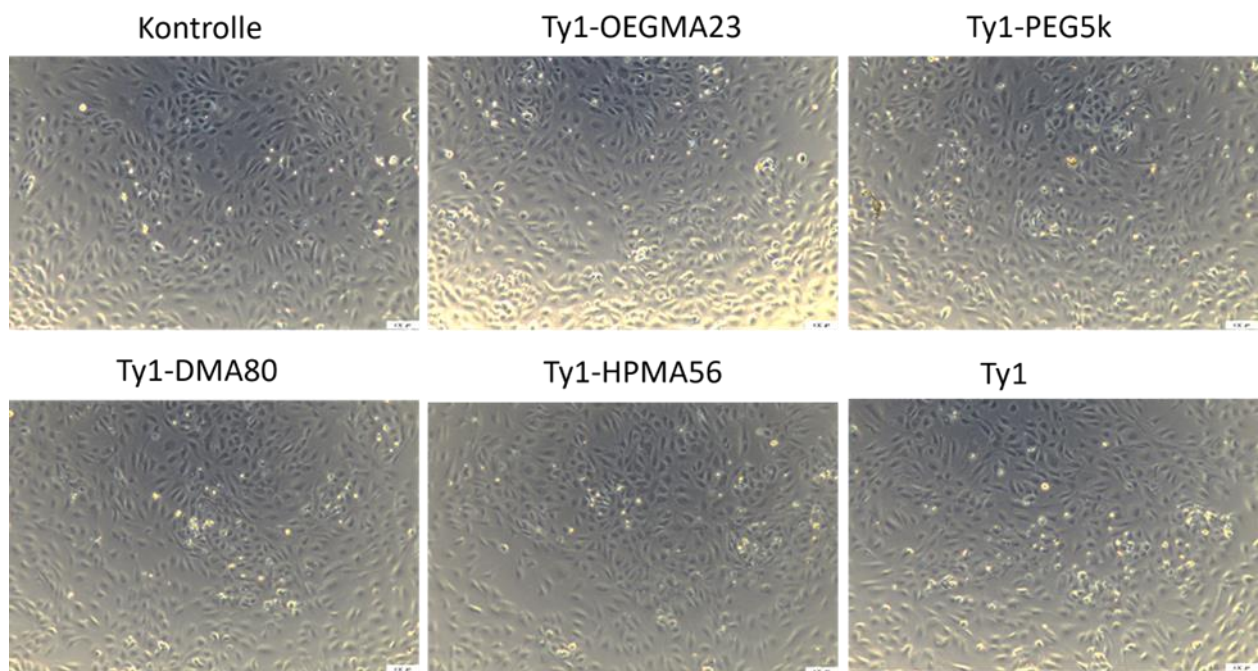


Abbildung 10: HUVEC unbehandelt bzw. nach 24 h Inkubation mit den verschiedenen Ty1-Polymer-Konjugaten (0,1 μ M) in 10x Primärvergrößerung, Phasenkontrastmikroskopie.

Die Untersuchung der Zellmembranintegrität und somit der Nachweis einer möglichen Zellschädigung erfolgte durch die Analyse der Lactadehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand. Eine hohe LDH-Freisetzung ist hierbei mit einer Schädigung der Zellmembran assoziiert. Es zeigte sich, dass die Inkubation von HUVEC mit dem Nanobody allein bzw. mit den Konjugaten z.T. eine signifikant erhöhte Freisetzung

der LDH hervorrief. Die Bestimmung des standardisierten Unterschiedes ergab jedoch, dass dies nur als geringer Effekt eingestuft werden kann. Dies wird untermauert durch die LDH-Freisetzung bei HUVEC, welche gezielt lysiert wurden, um ein Maximum der Freisetzung zu induzieren ($OD: 0,85 \pm 0,063$, nicht dargestellt im Diagramm, Abb. 11a).

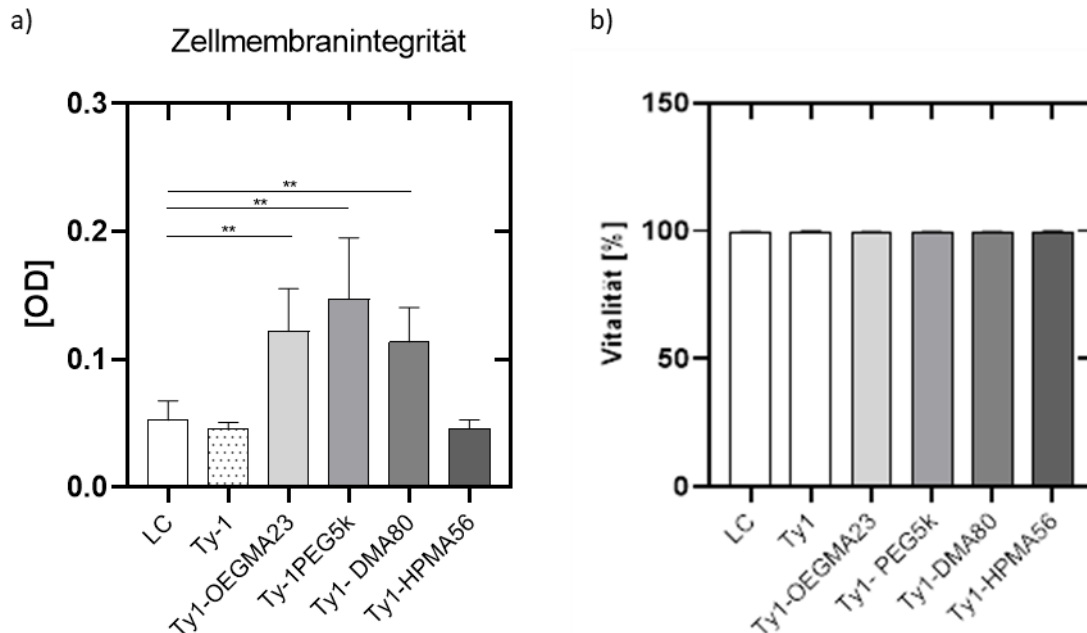


Abbildung 11: Freisetzung von LDH 24 h nach der Inkubation mit den Nanobodykonstrukten (a) und Vitalität von HUVEC 24 h nach Zugabe der Ty1- bzw. Ty1- Polymer-Konstrukte (b). Darstellung statistischer Unterschiede erfolgte mittels One-Way Anova. **: $p < 0,01$.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit den Nanobody-Konstrukten keinen negativen Einfluss auf den Metabolismus der HUVEC zeigte. Der Metabolismus der Zellen war vergleichbar bzw. z.T. erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die Untersuchung der Zellvitalität. Auch hier konnte keine reduzierte Zellvitalität im Vergleich zu den unbehandelten HUVEC detektiert werden. Es konnte eine Vitalität von rund 99% bei allen unbehandelten und behandelten Primärzellen beobachtet werden (siehe Abb. 11b).

Zur Beurteilung der Zellfunktion wurde die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine untersucht. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, welche *in vivo* eine Aktivierung des Immunsystems hervorrufen können, wurde mittels IL-6, IL-8 und MCP-1 Detektion analysiert. Es zeigte sich hierbei eine signifikant reduzierte IL-6 Freisetzung für alle behandelten HUVEC (Nanobody allein und Protein-Polymer-Konjugate) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 12). Auch die Freisetzung des proinflammatorisch wirkenden IL-8 war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht. Vielmehr konnte im Trend eine deutlich zur Kontrolle reduzierte Freisetzung beobachtet werden. Weiterhin war die Freisetzung von MCP-1, als proinflammatorisches Zytokin, welches einen Einfluss auf Komponenten des Immunsystems hat (Makrophagen), signifikant bzw. im Trend im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Somit kann festgehalten werden, dass die Behandlung der primären Endothelzellen mit den Protein-Polymer-Konstrukten keine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induzierte, welche *in vivo* eine Aktivierung des Immunsystems herbeiführen können.

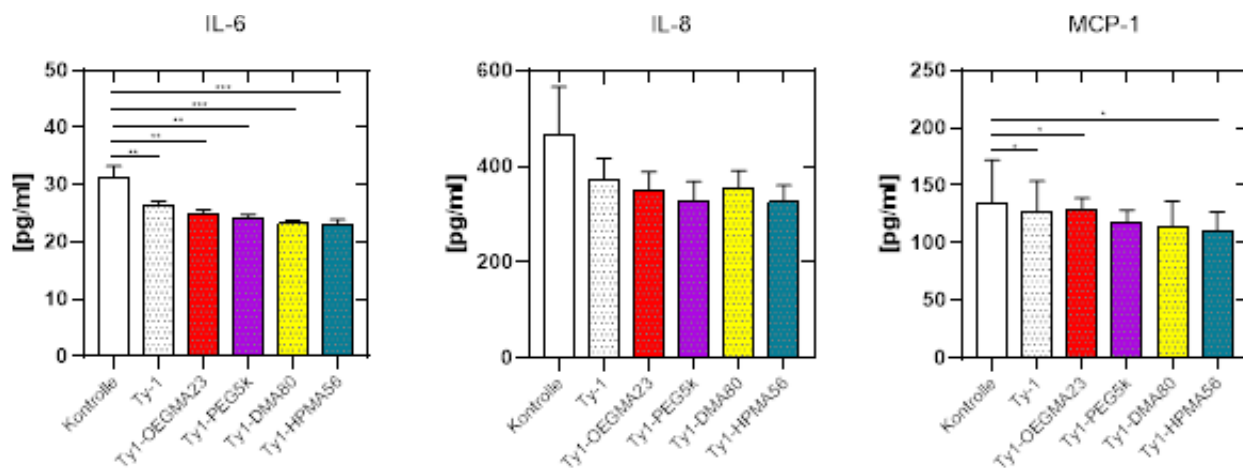


Abbildung 12: Zytokinfreisetzung in pg/ml durch HUVEC nach 24 h Probeninkubation mit Ty1- bzw. Ty1-Polymer-Konjugaten (0,1 µM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way Anova. *: p < 0,05; **: p < 0,01, ***: p < 0,001

Synthese bi- und multivalenter Ty1-Polymer-Konjugate

Die bisher beschriebenen Konjugate enthalten eine Polymerkette, die an den C-Terminus von Ty1 gebunden ist. Da das Spikeprotein von SARS-CoV-2 drei Rezeptorbindungsstellen hat, könnten multivalente Konjugate die Neutralisierungseffizienz weiter erhöhen. Bei multivalenten Konjugaten gegen Viren ist eine Re-Bindung (Ablösen einer Bindungsgruppe und erneutes Anbinden an die Virusoberfläche, da viele Bindungsgruppen in räumlicher Nähe gehalten werden) und ein Multivalenzeffekt (gleichzeitiges Binden mehrerer Bindungsgruppen an einen Virus) denkbar. Als Beitrag zur Unterscheidung dieser zwei Bindungsphänomene wurden bivalente Konjugate, zwei Nanobodies, die durch unterschiedlich lange Polymere miteinander verbunden sind, synthetisiert.

Dazu wurden Polymere mit zwei terminalen Azidgruppen hergestellt. Als Modell wurde PEG gewählt, da es kommerziell in einer großen Bandbreite an Längen verfügbar und die Post-polymerisationsfunktionalisierung zur Einführung von zwei funktionellen Gruppen leicht zugänglich ist. Polymere mit einer Masse von 1-35 kDa wurden so nach Bisso *et al.* funktionalisiert (Abb. 13).^[11] Zunächst wurden durch Reaktion von einem Überschuss an Tosylchlorid mit PEG zwei gute Abgangsgruppen eingeführt. Nach anschließender Reaktion mit Natriumazid erhält man bifunktionales PEG mit terminalen Azid-Gruppen.

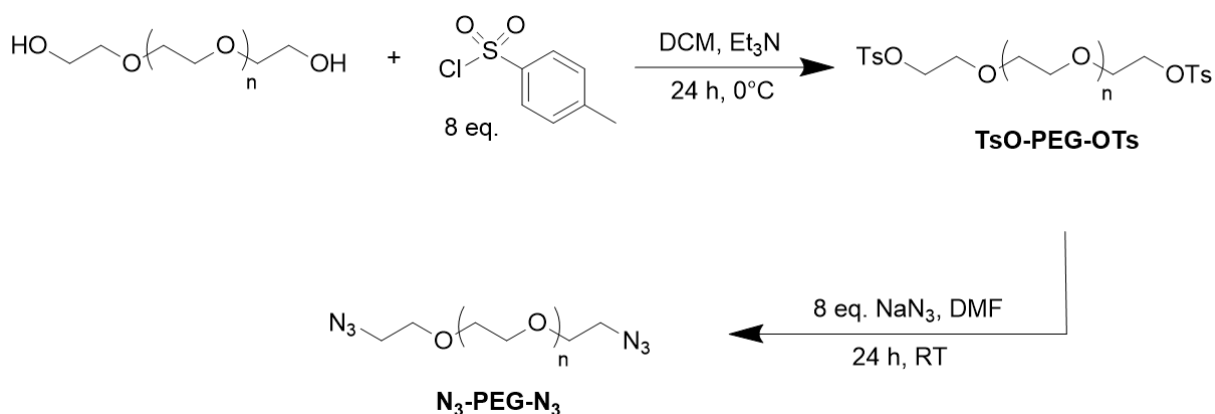


Abbildung 13: Reaktionsschema der Synthese von bifunktionalem PEG mit terminalen Azid-Gruppen.

Die Polymere wurden anschließend, wie bei den monovalenten Ty1-Polymer-Konjugaten, mit Ty1-DBCO zur Reaktion gebracht. Dazu wurde 0.5 Äq. bifunktionales PEG mit 1 Äq. Nanobody für 7 Tage inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über SDS-PAGE analysiert (Abb. 14). Auch hier sind zu höheren Massen verschobene Banden zu sehen, welche auf die erfolgreiche Funktionalisierung hinweisen. Bei den Polymermassen 3000 Da bis 35000 Da sind jeweils zwei zusätzliche Banden zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass die Anbindung von zwei Nanobodies an längere Polymergerüste unvollständig abläuft, und dass sowohl bivalente, also auch monovalente Konjugate in dem Reaktionsgemisch vorliegen. Die Reaktion mit 1000 Da PEG verläuft hier entweder vollständig zu bivalenten Konjugaten, oder Ketten mit lediglich einem Nanobody können in dem Gel nicht von unmodifiziertem Ty1 getrennt bzw. aufgelöst werden. Zur Reinigung und Isolierung der bivalenten Konjugate wird eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt.

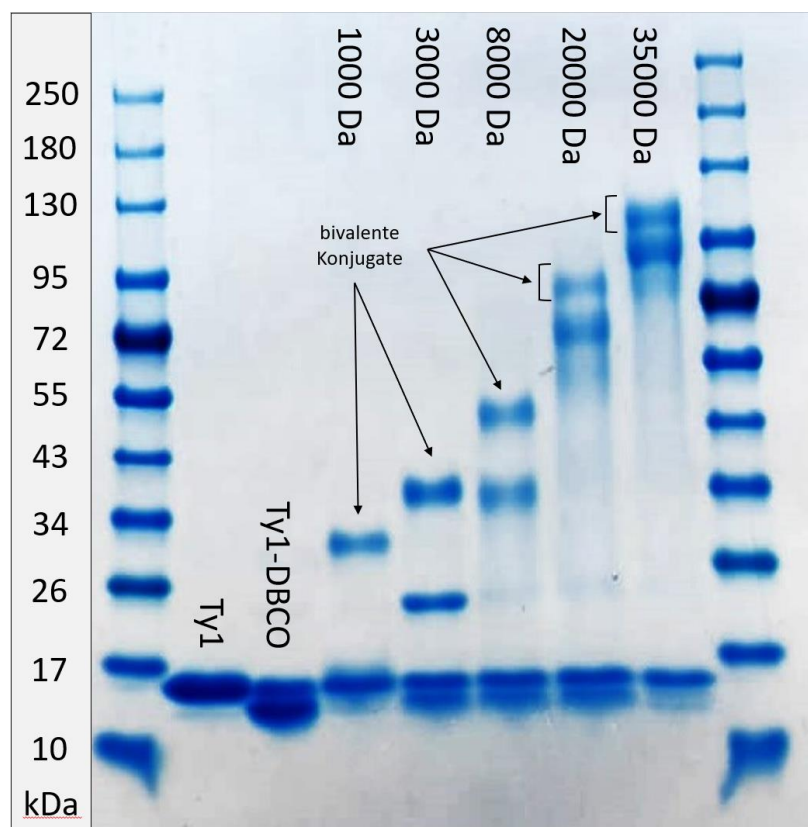


Abbildung 14: SDS-PAGE des unmodifizierten Nanobodys Ty1 und Ty1-DBCO sowie der Produkte der SPAAC Reaktion mit bivalenten PEGs mit Massen von 1000 Da bis 35000 Da. Mögliche bivalente Konjugate sind hier mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgt durch Coomassie Färbung.

Außerdem wurden Polymere zur Herstellung von multivalenten Konjugaten synthetisiert. Um Polymere mit mehreren Azid-Gruppen zu erhalten wurde auf zwei verschiedene Ansätze gesetzt. In Ansatz 1 wurden Polymere durch Copolymerisation von DMA und Pentafluorophenylacrylat (PFPA), zur Einführung von Aktivestern, hergestellt (Abb. 15). Funktionelle Gruppen können anschließend durch nukleophile Reaktion mit dem aktivierten Carbonylkohlenstoff des Aktivesters eingeführt werden. Diese Methode ist der direkten Polymerisation eines Azid- bzw. Alkin-haltigen Monomers vorzuziehen, da solche Monomere oft Nebenreaktionen unterliegen. In Ansatz 2 wurden Polymere durch Homopolymerisation des Monomers

mit Aktivester generiert. Anschließend kann ein kleiner Teil mit funktionellen Gruppen modifiziert werden und die restlichen Aktivester mit Dimethylamin zu pDMA umgewandelt werden. Der Vorteil dieser Methode ist eine statistisch zufällige Distribution der Azid/Alkin-Gruppen im Polymer. In der Projektlaufzeit konnten noch keine multivalenten Konjugate hergestellt werden, da nicht ausreichend Nanobody vorlag. Die multivalenten Konjugate werden im Anschluss an das Projekt hergestellt und zusammen mit den bivalenten Konjugaten hinsichtlich ihrer Affinität an SARS-CoV-2-Spikeproteine und ihrer Virus-Neutralisierung charakterisiert.

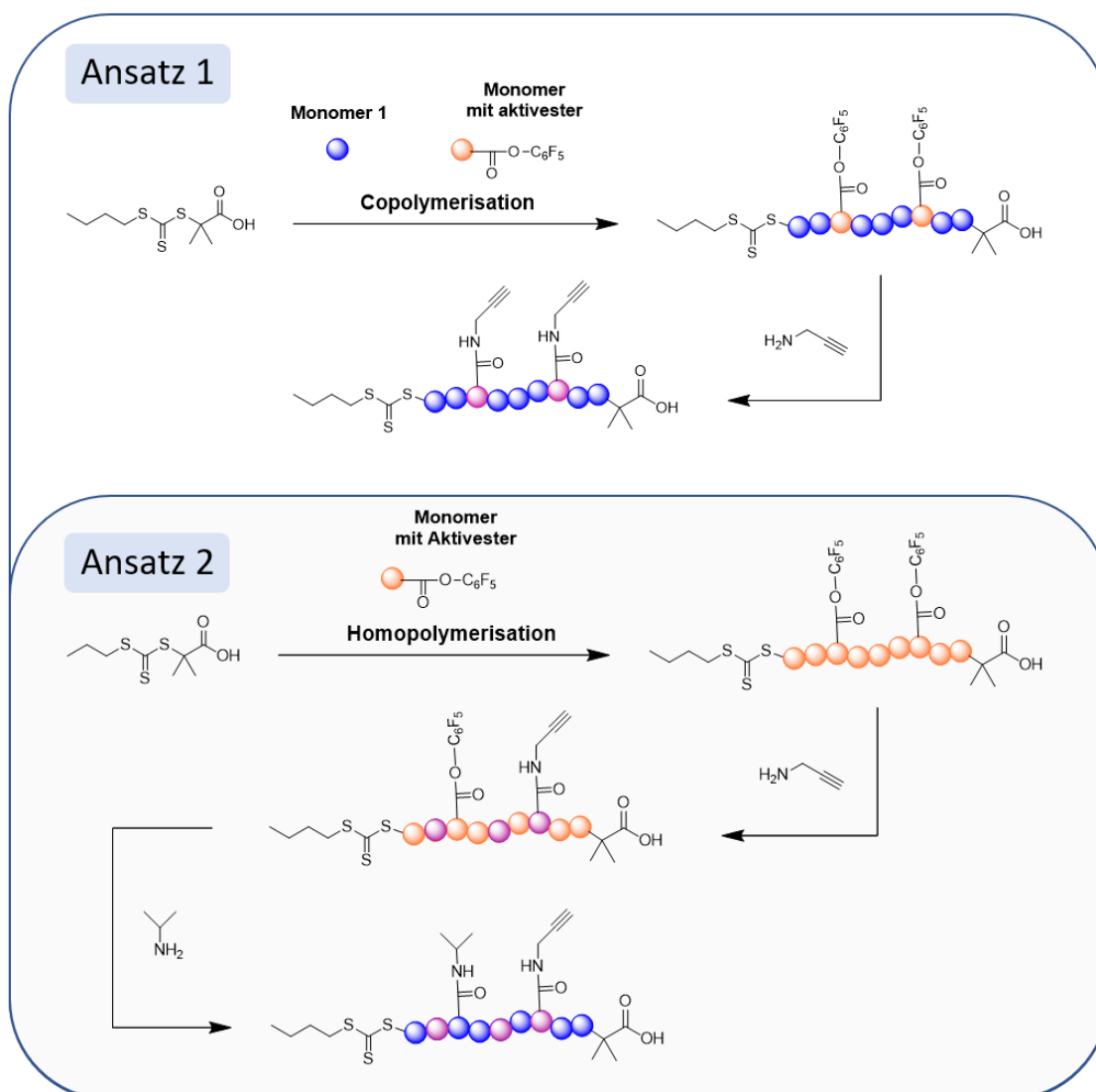


Abbildung 15: Ansatz 1 (oben): Copolymerisation von DMA und PFPa mit anschließender Einführung von Alkynguppen durch Reaktion mit Propargylamin. Ansatz 2 (unten): Homopolymerisation von aktivesterhaltigem Monomer und anschließende partielle Umsetzung mit Propargylamin und vollständige Umsetzung mit Dimethylamin.

Mikrofluidische Untersuchung der SPAAC-Reaktionskinetik mit Makromolekülen

Mikrofluidische Chips stellen einen interessanten Ansatz dar, um Reaktionskinetiken von Makromolekülen zu überwachen. Der Vorteil liegt darin, dass nur sehr niedrige Probenvolumina (5-20 μL)

benötigt werden und zusammen mit einem Probendurchfluss sogar Hochdurchsatzmessungen möglich werden. Die SPAAC Reaktion mit DBCO eignet sich dabei besonders gut, da DBCO ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 310 nm aufweist, welches in diesem Bereich nur marginal von Proteinabsorption überlagert wird und nach der Klick-Reaktion verschwindet. Da die Absorption bei 310 nm im Verlauf der SPAAC Reaktion abnimmt, kann so Reaktionskinetik und Umsatz über UV/Vis Spektroskopie bestimmt werden.

Im Rahmen einer Dienstreise an die Universität Gent wurde die Reaktion von DBCO mit PEG2kDa-N₃ und PEG5kDa-N₃ untersucht (Abb. 16). Dazu wurde 20 µL Reaktionslösung mit 500 µM DBCO-Amin und 750 µM Polymer in den Chip injiziert und die Absorption über 1000 Sekunden überwacht. Für PEG2kDa-N₃ und PEG5kDa-N₃ konnten hierbei Reaktionsraten zweiter Ordnung von 3,1 bzw. 3,3 M⁻¹s⁻¹ bestimmt werden (Abb. 16 b und c). Diese liegen in dem für DBCO bekannten Spektrum von ca. 1-60 M⁻¹s⁻¹.^[16] Zum Vergleich wurden die Reaktionskinetiken der Polymere mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät verifiziert, und mit Ty1-DBCO und OEGMA23-N₃ ergänzt. Interessanterweise verlaufen Reaktionen mit dem sterisch anspruchsvollen OEGMA23 schneller ab als mit den leichteren PEG Polymeren.

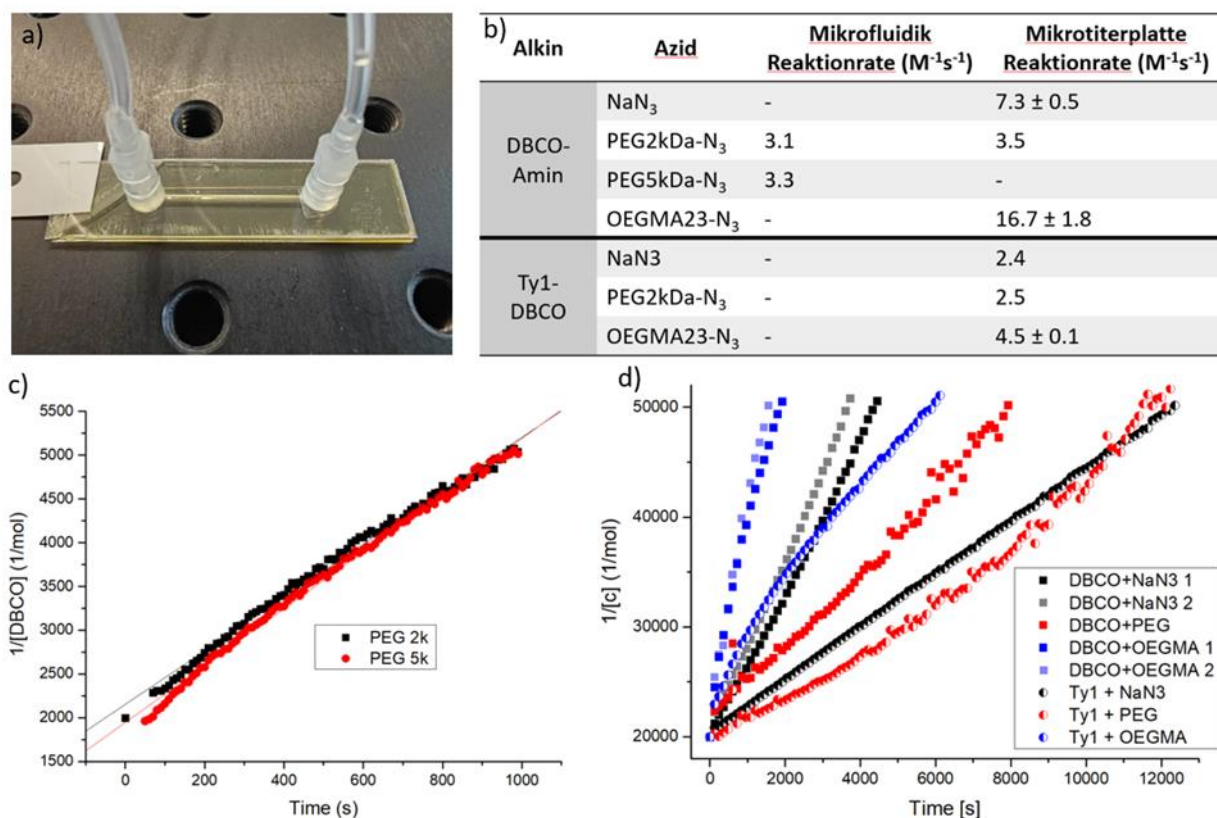


Abbildung 16: Aufbau mikrofluidischer Chips mit 10 µL Kanal (a). Zusammengefasste Reaktionsraten von DBCO-Amin und Ty1-DBCO (b). Zeitabhängige Konzentrationsänderung von DBCO-Amin mit PEG2kDa-N₃ und PEG5kDa-N₃ (c). Zeitabhängige Konzentrationsänderung von diversen Azid-Alkin Reaktionen (d).

Meilenstein 9 (nach 15 Monaten): Erfolgreiche Synthese eines scFv-Polymer Konjugats durch *grafting-through* Polymerisation mit mehreren scFvs in einer Polymerkette

➔ Bivalente Ty1-Polymer-Konjugate (Abb. 14) und Polymere zur Herstellung von multivalenten Ty1-Polymer-Konjugaten (Abb. 15) wurden erfolgreich synthetisiert.

Meilenstein 10 (nach 22 Monaten): *In vitro* Nachweis der Biokompatibilität und antiviralen Wirksamkeit von ausgewählten scFv-Polymer Konjugaten

→ Der Nachweis der Biokompatibilität ausgewählter Protein-Polymer-Konjugate und der antiviralen Wirksamkeit ist erfolgt (Ty1-OEGMA-23, Ty1-PEG5k, Ty1-DMA80, Ty1-HPMA56).

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Projekt wurden Personal und Verbrauchsmittel verwendet. Die Mittel für Verbrauchsmaterialien und Reisekosten wurden nicht ausgeschöpft. Dafür wurden die Personalkosten im Rahmen der bewilligten Mittel leicht überzogen (< 7%).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Nur durch die finanzielle Unterstützung durch das BMBF wurde die experimentelle Durchführung ermöglicht. Dabei konnten insbesondere die Personalkosten, aber auch die Kosten für Verbrauchsmaterial nicht aus Haushaltsmitteln bestritten werden und rechtfertigen die aufgewendeten Mittel.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwendbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Polymerkonjugation ist besonders für die vergleichsweise kleinen Nanobodies, die entsprechend schnell aus dem Körper entfernt werden, relevant. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inaktivierung von Viren je nach konjugiertem Polymer sogar noch effektiver ist als bei unmodifizierten Nanobodies. Gegenüber biotechnologisch erzeugten multimeren Nanobodies oder PEG-verknüpften Nanobodies besteht ein Vorteil in dem durch die Polymerisation variablen Abstand der Biomoleküle, der an die Abstände von Bindungsstellen an Viren angepasst werden kann.

Über weitere Grundlagenforschung soll zunächst nachgewiesen werden, dass die Zirkulationszeit im Blut des hier verwendeten Nanobodies Ty1 durch die Konjugation von Polymeren tatsächlich signifikant verlängert werden kann. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Protein-Polymer-Konstrukte auch zu

einer Inaktivierung anderer Viren beitragen können, um dann später als Therapeutikum bzw. zur Prophylaxe Anwendung zu finden.

Da es sich um neue Ansätze (Stabilisierung von Nanobodies durch PEG-alternative Polymere, variable multivalente Konjugate) mit erstaunlichen Ergebnissen (sogar höhere Virus-Inaktivierung durch Polymerkonjugation) in einem hoch aktuellen Forschungsgebiet handelt, sind wir sehr daran interessiert, in grundlegenden Anschlussvorhaben eine weitere Optimierung der Konjugate zu erzielen und ihr therapeutisches Potential zu eruieren. Folgeprojekte sollen im Rahmen der im Februar 2024 begonnenen Heisenberg-Förderung von Dr. Ulrich Glebe an der Universität Potsdam umgesetzt werden, beispielsweise zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung der Nanobody-Polymer-Konjugate (Kooperation Prof. Dr. Heiko Möller, Universität Potsdam) oder der Synthese neuartiger Konjugate für die Inaktivierung von Viren.

Die biomedizinische Weiterentwicklung und Nutzung der Projektergebnisse sind auch in einem größeren Kontext als nur den im vorliegenden Projekt synthetisierten Nanobody-Polymer-Konjugaten zu sehen. Neben der Ausweitung auf andere Viren als nur SARS-CoV-2 ist die Polymerstabilisierung für viele therapeutische Proteine mit kurzer Halbwertszeit relevant. Klinisch zugelassen sind hier bisher nur PEGylierte Proteine. Deren therapeutische Wirkung ist zwar durch die (besonders unspezifische) Polymeranbindung verringert. Allerdings wird dieser Effekt durch die deutlich verlängerte Zirkulationszeit im Blut in der Regel mehr als ausgeglichen. Die in COVITRAP verwendeten Polymere könnten für viele andere therapeutische Proteine ein möglicher Ersatz für PEG sein. Gerade auch unter dem Aspekt, dass durch PEGylierte Lipid-Nanopartikel bei mRNA-Impfstoffen gegen COVID-19 in den letzten Jahren noch mal mehr Menschen in Kontakt zu PEG gekommen sind und möglicherweise Antikörper entwickelt haben, die die Wirksamkeit PEGylierter Arzneimittel zukünftig in Frage stellen könnten, könnten die erzielten Ergebnisse von besonderer Relevanz sein.

5. des während der Durchführung des Vorhabens am ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens anderer Stellen

Ty1 wurde für die Herstellung heterodimerer Nanobodies^[12] sowie für die Funktionalisierung von Zellulose zum Einfangen von Viren^[13] und von Nanoporen für die Proteinsensorik^[14] verwendet. Diese Arbeiten berühren unsere Ansätze zu Ty1-Polymer-Konjugaten nicht.

Außerdem haben wir eine Diskussion verfolgt, ob bisherige multivalente Systeme „nur“ zu einem Re-Binden an Viren führen oder ein echter Multivalenzeffekt vorliegt.^[15] Dies haben wir bei der Synthese bivalenter Konjugate mit unterschiedlichen Polymerlängen während unseren Projektarbeiten aktiv aufgenommen.

Auch wurden neue Studien zum Vorliegen von anti-PEG Antikörpern veröffentlicht,^[9] die unseren Fokus auf PEG-Alternativen im Projekt gestärkt haben.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 6.

Nach geplanter Patentanmeldung werden die erhaltenen Projektergebnisse auf Konferenzen präsentiert und als Open Access-Publikationen veröffentlicht. Die folgenden Veröffentlichungen sind geplant.

Geplante Publikationen

- Nanobody-Polymer-Konjugate: Synthese, Charakterisierung, Zytotoxizität und Kompatibilität, Affinität zu SARS-CoV-2-Spikeprotein (Kooperation belgischer Unterauftragnehmer PUXANO), Zell-basierte Inaktivierung von virusähnlichen Partikeln, Stabilität / Zirkulationszeit im Blut (ggf. über neue Kooperationspartner), ca. Herbst 2024
- Mikrofluidische Reaktionsverfolgung einer Klick-Reaktion am Beispiel der Synthese von Nanobody-Polymer-Konjugaten (Kooperation mit belgischem Partner UGENT), ca. Herbst 2024
- Virus-Inaktivierung mit bivalenten Nanobody-Polymer-Konjugaten mit unterschiedlich langen Polymeren – Re-Bindung oder Multivalenzeffekt?, ca. Winter 2024/2025
- Multivalente Nanobody-Polymer-Konjugate: Effizienz der Virus-Inaktivierung im Vergleich zu monovalenten Konjugaten, ca. Winter 2024/2025

Geplante Konferenzbeiträge

2024

PSP Conference 2024 - HEALTH, Potsdam, 14.-15.10.2024

Vortrag von Dr. U. Glebe

2025

Makromolekulares Kolloquium, Freiburg, 27.-28.02.2025

Vortrag oder Poster von Y. Müllers

Geplante Patentanmeldung

Y. Müllers, U. Glebe

„Nanobody-Polymer-Konjugate zur Inaktivierung von Viren“

Ca. Sommer 2024

Referenzen

- [1] W. Van Lysebettens, G. Van Steenberge, L. Chaccour, J. Missinne, "Fused silica microfluidic chip platform for dynamic light scattering and particle size calculation", *Conference SPIE Photonics Europe* **2024**, 13008.
- [2] A. Moliner-Morro, D. J Sheward, V. Karl, L. Perez Vidakovics, B. Murrell, G. M. McInerney, L. Hanke, "Picomolar SARS-CoV-2 Neutralization Using Multi-Arm PEG Nanobody Constructs", *Biomolecules* **2020**, *10*, 1661, DOI 10.3390/biom10121661.

- [3] L. Hanke, L. Vidakovics Perez, D. J. Sheward, H. Das, T. Schulte, A. Moliner-Morro, M. Corcoran, A. Achour, G. B. Karlsson Hedestam, B. M. Hällberg, B. Murrell, G. M. McInerney, "An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction", *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4420, DOI 10.1038/s41467-020-18174-5.
- [4] B.-K. Jin, S. Odongo, M. Radwanska, S. Magez, "Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics", *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5994, DOI 10.3390/ijms24065994.
- [5] J. Martin, M. Michaelis, S. Petrović, A.-C. Lehnen, P. Wendler, H. Möller, M. Hartlieb, U. Glebe, "Application of Sortase-Mediated Ligation for the Synthesis of Block Copolymers and Protein-Polymer Conjugates", *in preparation for submission to Biomacromolecules*.
- [6] J. H. Ko, H. D. Maynard, "A guide to maximizing the therapeutic potential of protein–polymer conjugates by rational design", *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8998, DOI 10.1039/C8CS00606G.
- [7] a) B. Kaupbayeva, A. J. Russell, "Polymer-enhanced biomacromolecules", *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *101*, 101194, DOI 10.1016/j.progpolymsci.2019.101194; b) C. Chen, D. Y. W. Ng, T. Weil, "Polymer bioconjugates: Modern design concepts toward precision hybrid materials", *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101241, DOI 10.1016/j.progpolymsci.2020.101241.
- [8] T. T. Hoang Thi, H. E. Pilkington, H. D. Nguyen, S. J. Lee, D. K. Park, P. N. Truong, "The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation", *Polymers* **2020**, *12*, 298, DOI 10.3390/polym12020298.
- [9] M. F. S. Deuker, V. Mailänder, S. Morsbach, K. Landfester, "Anti-PEG antibodies enriched in the protein corona of PEGylated nanocarriers impact the cell uptake", *Nanoscale Horiz.* **2023**, *8*, 1377, DOI 10.1039/D3NH00198A.
- [10] Y. Hou, H. Lu, "Protein PEPylation: A New Paradigm of Protein–Polymer Conjugation", *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1604, DOI 10.1021/acs.bioconjchem.9b00236.
- [11] S. Bisso, S. Mura, B. Castagner, P. Couvreur, J.-C. Leroux, "Dual delivery of nucleic acids and PEGylated-bisphosphonates via calcium phosphate nanoparticles", *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *142*, 142, DOI 10.1016/j.ejpb.2019.06.013.
- [12] L. Hanke, H. Das, D. J. Sheward, L. Perez Vidakovics, E. Urgard, A. Moliner-Morro, C. Kim, V. Karl, A. Pankow, N. L. Smith, B. Porebski, O. Fernandez-Capetillo, E. Sezgin, G. K. Pedersen, J. M. Coquet, B. M. Hällberg, B. Murrell, G. M. McInerney, "A bispecific monomeric nanobody induces spike trimer dimers and neutralizes SARS-CoV-2 in vivo", *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 155, DOI 10.1038/s41467-021-27610-z.
- [13] X. Sun, S. Yang, A. A. Al-Dossary, S. Broitman, Y. Ni, M. Guan, M. Yang, J. Li, "Nanobody-Functionalized Cellulose for Capturing SARS-CoV-2", *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, *88*, e0230321, DOI 10.1128/aem.02303-21.
- [14] X. Zhang, N. S. Galenkamp, N. J. van der Heide, J. Moreno, G. Maglia, J. Kjems, "Specific Detection of Proteins by a Nanobody-Functionalized Nanopore Sensor", *ACS Nano* **2023**, *17*, 9167, DOI 10.1021/acsnano.2c12733.
- [15] H. P. Erickson, L. Corbin Goodman, "Recently Designed Multivalent Spike Binders Cannot Bind Multivalently—How Do They Achieve Enhanced Avidity to SARS-CoV-2?", *Biochemistry* **2023**, *62*, 163, DOI 10.1021/acs.biochem.2c00291.
- [16] E. Kim, H. Koo, "Biomedical applications of copper-free click chemistry: *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*", *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 7835, DOI 10.1039/C9SC03368H.