

Entwicklung von Gentherapien für Nierenerkrankungen mittels gezielter Transduktion von glomerulären Zellen durch Nanobody-gekoppelte Adeno-assoziierte Viren

Projektleiter:

Dr. rer. nat. Nicola Wanner
III. Medizinische Klinik, Nephrologie,
AG Prof. Tobias B. Huber,
Martinistr. 52
20246 Hamburg

Zusammenfassung:

Der Mangel an zellspezifischen Therapien in der Niere stellt eine bedeutende Herausforderung dar, da viele therapeutische Ansätze die spezifischen Zelltypen nicht effizient erreichen und dadurch in ihrer Wirksamkeit begrenzt bleiben. Die Nutzung Adeno-assozierter Viren (AAV) als vielversprechende *in vivo* Gen-Transfer-Plattform bietet zahlreiche Vorteile bei der Verabreichung therapeutischer Moleküle an schwer erreichbare oder nicht behandelbare Zellen. Allerdings weisen natürliche AAV-Serotypen eine unzureichende Transduktionsspezifität und Effizienz in Nierenzellen auf. Hier kombinieren wir AAV-Varianten mit verbesserter Transduktionseffizienz für glomeruläre Endothelzellen mit Nanobodies, Einzeldomänen-Antikörpern mit hoher Affinität zu Zelloberflächenmolekülen. Das spezifische Targeting der glomerulären Zellen dient als Plattform, um durch Genexpression glomeruläre Endothelzellen zu beeinflussen und benachbarte Podozyten mittels sezernierter Botenstoffe zu modulieren. Des Weiteren sollen die Kopplung podozytenspezifischer Nanobodies and AAVs die Transduktion von Podozyten ermöglichen. Ziel dieses Projektes ist es, neue Gentherapien zu entwickeln, diese im Mausmodell zu testen und validieren, um immunvermittelte und/oder genetisch bedingte Nierenerkrankungen in Zukunft besser behandeln zu können.

Stand der Forschung:

Trotz vieler neuer Erkenntnisse zu molekularen Ursachen von Nierenerkrankungen konnte die Entwicklung von spezifischen Therapien in den letzten Jahrzehnten wenig Fortschritte machen. Wegen der Komplexität und zellulären Heterogenität der Niere ist ein zelltypspezifischer Therapieansatz besonders erstrebenswert. Gentherapie hat das Potenzial, defekte Gene zu reparieren oder die Genexpression zu modulieren, was zu einer nachhaltigen Verbesserung der Nierenfunktion führen kann. Dies ist besonders wichtig für chronische Nierenerkrankungen, die derzeit nur durch Dialyse oder Transplantation behandelt werden können. Durch gezielte Gentherapie in frühen Krankheitsstadien könnten die Lebensqualität und Lebenserwartung von Patienten erheblich verbessert werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass die AAV-Gentherapie den Krankheitsverlauf im nephrotischen Syndrom in der Maus, verursacht durch Mutationen im NPHS2-Gen, aufhalten kann¹. Im induzierbaren NPHS2 KO Mausmodell führte die AAV 2/9-vermittelte Genübertragung zu einer Verbesserung der Albuminurie, des Kreatinin- und Harnstoffspiegels, des Cholesterins, der histologischen Veränderungen und der Überlebensrate der Mäuse¹. Trotz des vielversprechenden Ansatzes weisen die natürlichen AAV-Serotypen nur eine unzureichende Zielgerichtetheit und Transduktionseffizienz in Nierenzellen auf und erfüllen daher noch nicht die Anforderungen für eine nierenspezifische Therapie. Da die Niere ein Organ mit einer komplexen Struktur und einer Vielzahl verschiedener Zelltypen ist, sind Ansätze zur Erweiterung des Tropismus von

AAV und Screenings für nierenzellspezifische AAV-Vektoren essentiell, um eine zielgerichtete, niedrigdosierte und dadurch nebenwirkungsarme Therapie entwickeln zu können.

Vorarbeiten:

Um AAV-Varianten spezifisch für renale Zelltypen zu erhalten, hat unser Labor ein AAV-Targeting-Protokoll für die Niere entwickelt, das eine *in vivo* Selektion von AAV-Bibliotheken verwendet² (Wu#, Liu#, ..., Wanner, ..., Lu*, Huber*, Manuscript in Revision bei JCI). Für das *in vivo*-Screening in den Mäusenieren wurden AAV2- und AAV9-Random-Display-Peptid-Bibliotheken verwendet und mehrere Anreicherungsrunden in definierten Zellpopulationen durchgeführt. Virale DNA wurde aus dem Gewebe extrahiert, um AAV-Bibliotheken für die nächste Selektionsrunde zu generieren, was zu einer Verringerung der AAV-Diversität und einer Erhöhung der Spezifität führte. Next Generation Sequencing wurde durchgeführt, um die Oligonukleotidsequenzen der AAV-Klone in den Glomeruli zu identifizieren und zu analysieren. Die Anreicherung der AAV-Klone wurde anhand der relativen Häufigkeit im Zielorgan und ihrer Verteilung im Vergleich zu Off-Target-Organen wie Leber, Milz, Herz und Lunge bewertet. Eine *in vivo* Validierung mittels GFP-Expression zeigte die Transduktionsspezifität im Gewebe (Abb. 1). Der beste Kandidat für die spezifische und effiziente AAV-Transduktion von glomerulären Endothelzellen (GECs) wurde ausgewählt.

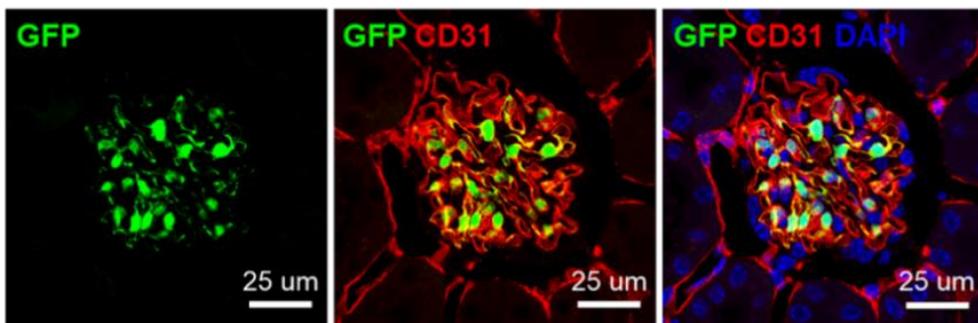


Abbildung 1. *In vivo* Selektion der AAV2 Peptidbibliothek. AAV2-GEC-basierten GFP-Expression in Nierengewebe von C57BL/6J Mäusen zeigt Expression in glomerulären Endothelzellen, colokalisierend mit Endothelzellmarker CD31. Nuclei gefärbt mit DAPI. Abbildung aus: Guochao Wu#, Shuya Liu#, ..., Nicola Wanner, ..., Shun Lu*, Tobias B. Huber*, Manuscript in Revision bei JCI. * und #: die Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Die AAV-GEC Virusvariante bietet nun viele Möglichkeiten, um das Glomerulus gezielt anzusteuern. So kann die Expression und Sekretion der Streptokokken-IgG-Peptidase IdeS gezielt pathologische Autoantikörper direkt im Glomerulus zerstören: Der AAV-GEC-Gen-Transfer wurde mit 1×10^{13} vg/kg AAV-GEC-IdeS zur Behandlung von experimenteller Autoantikörper-Glomerulonephritis getestet, die durch Injektion von nephrotoxischem Serum bei Mäusen induziert wurde (Abb. 2A). Die ideS-Behandlung verhinderte vollständig die Proteinurie, ein Kennzeichen glomerulärer Erkrankungen (Abb. 2B), und spaltete ausreichend anti-GBM-IgG, wodurch erfolgreich die Ablagerung von Antikörpern und Komplement in den Glomeruli und die Gesamtprogression der anti-GBM-Glomerulonephritis verhindert wurden (Wu#, Liu#, Manuscript in Revision bei JCI). Zusammengefasst zeigt dieses Proof-of-Concept-Experiment das therapeutische Potenzial von AAV-GEC-IdeS zur gezielten Modulation des glomerulären Mikromilieus.

Diese Möglichkeit zur Therapie immun-vermittelter Nierenkrankheiten ist auch im Hinblick auf neueste Erkenntnisse beim Nephrotischen Syndrom bei Kindern, sowie der Minimal Change Erkrankung bei Erwachsenen interessant, wo in einer Vielzahl der Fälle Autoantikörper gegen das Podozytenprotein Nephrin nachgewiesen werden konnten^{3,4}. Hier könnte die AAV-basierte Sekretion von Autoantikörper-eliminierender Proteine eine potentielle Gentherapie darstellen (Abb. 2C).

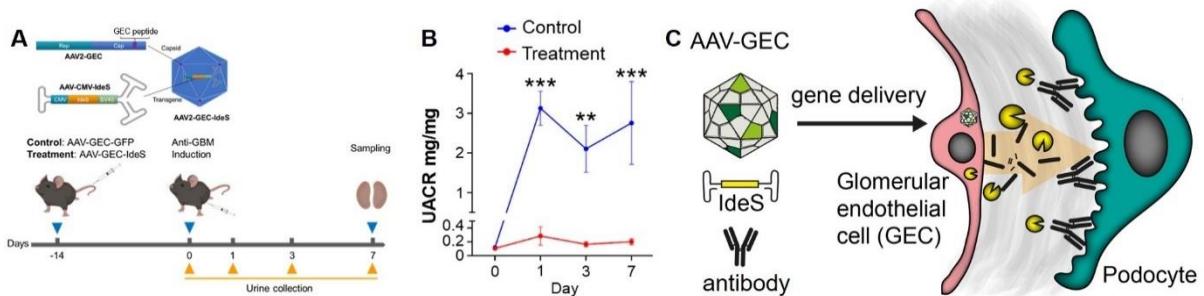


Abbildung 2. Ides Expression durch AAV-GEC Gentherapie führt zur Eliminierung von glomerulären Antikörperablagerungen. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und experimentelles Protokoll. n=10 pro Gruppe. (B) Das Verhältnis von Albumin zu Kreatinin im Urin (UACR) zeigt keine Proteinurie in den Behandlungsgruppen. t tests, **p < 0.01, ***p < 0.001. Guochao Wu[#], Shuya Liu[#], ..., Nicola Wanner, ..., Shun Lu*, Tobias B. Huber*, Manuskript in Revision. * und #: die Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen. (C) Nutzung der AAV-GEC-Ides Variante für zielgerichtete Gentherapie im Glomerulus bei Autoantikörpern.

Weitere Verbesserungen der AAV-Spezifität konnten mittels der Verwendung von Nanobodies, Einzelzeldomän-Antikörpern aus Kamelid-Schwerekettenantikörpern, gewonnen werden (Abb. 3A). Die Arbeitsgruppe von Friedrich Koch-Nolte konnte AAV-Vektoren mit Integration von P2X7-spezifischen Nanobodies an das Kapsidprotein VP1 generieren (Abb. 3B), die eine hohe Spezifität in *in vitro*-Versuchen zeigten⁵. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Friedrich Koch-Nolte konnten wir P2X7-spezifische Nanobodies *in vivo* charakterisieren⁶ und eine erhöhte Bindung der Nanobodies an glomerulären Endothelzellen in der experimentellen Glomerulonephritis zeigen (Abb. 3C). Erste *in vivo*-Experimente durch Injektion der anti-P2X7-AAV9 Kapside in der experimentellen Nephritis in der Maus zeigten ebenfalls eine verbesserte Transduktionsrate der glomerulären Endothelzellen im Vergleich zu P2X7 KO-Mäusen (Abb. 3D).

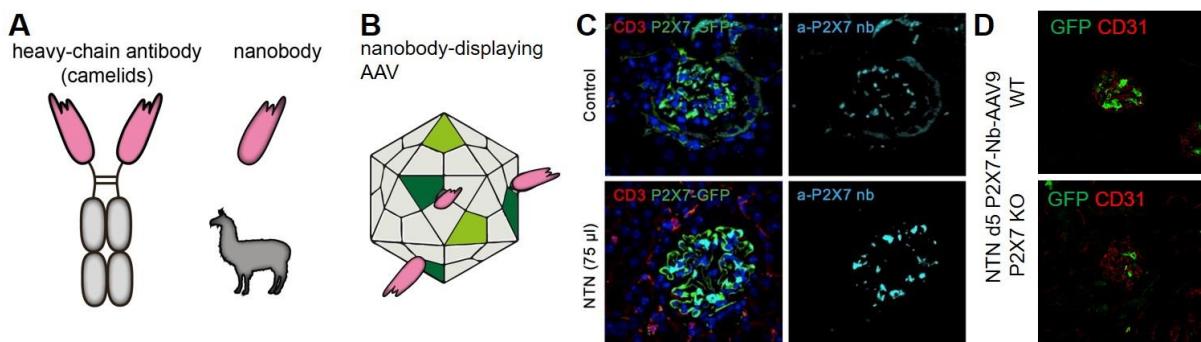


Abbildung 3. Nanobody-gekoppelte AAVs. (A) Nanobodies sind Einzeldomän-Antikörper, die von Schwereketten-Antikörpern abstammen, die u.a. in Kameliden (Lamas, Alpacas) zu finden sind. (B) Nanobodies gegen P2X7 wurden erfolgreich in das AAV-Viruskapsid integriert (Eichhoff et al., Molecular therapy. Methods & clinical development, 2019). (C) P2X7 wird in der experimentellen Nephritis (nephrotoxic serum nephritis, NTN) vermehrt in den glomerulären Endothelzellen exprimiert. Die Bindung von Anti-P2X7-Nanobodies an glomeruläre Endothelzellen in der NTN ist erhöht. (D) In der NTN ist die Transduktionsrate von AAV9 gekoppelt an P2X7-Nanobodies in WT-Mäusen im Vergleich zu P2X7 KO Mäusen erhöht (CD31: Endothelzellmarker).

Projektziele

Mit unserem Ansatz wollen wir zellspezifische Nanobody-gekoppelte AAV-Varianten weiterentwickeln und ihre Zellspezifität validieren. Mit diesen AAV-Varianten wollen wir diverse Gentherapiemöglichkeiten in immunvermittelten und genetischen Nierenerkrankungen von Nanobody-AAVs im Mausmodell testen und etablieren.

Arbeitsprogramm

Arbeitspaket 1: *In vivo* Validierung neuer zell-spezifischer Nanobody-gekoppelter AAV-Varianten

In Kollaboration mit Dr. Anna Mann und Prof. Friedrich Koch-Nolte wurden P2X7 Nb-gekoppelte AAV9 -Kapside erstmals *in vivo* getestet. Die Spezifität der P2X7-Nb-AAV9-Kapside soll weiter quantifiziert und Off-Target Effekte analysiert werden. Dazu werden die AAV-Kapside mit GFP-Transgen in einer Dosis von 5x 10¹² vg/kg i.v. in Mäuse injiziert. Sowohl gesunde Mäuse, als auch Mäuse mit mittels nephrotoxischen Serums induzierter experimenteller Glomerulonephritis, werden untersucht. Nach ca 14 Tagen werden die Organe der Experimentaltiere entnommen und sowohl Kryo- als auch in Paraffin asserviert und analysiert. Verschiedene Kapsidvarianten werden so getestet und verglichen: Unter anderem wurde der P2X7-Nanobody in das AAV-GEC-Kapsid kloniert (in Kollaboration mit Dr. Anna Mann/Prof. Friedrich Koch-Nolte). Hier soll untersucht werden, ob die duale Spezifität einen zusätzlichen Benefit für die Zelltransduktion und Off-target-Minimierung hat.

Des Weiteren sollen weitere AAV-Kapside mit Nanobody-Inkorporation produziert und getestet werden. Darunter befinden sich auch Nanobodies gegen Podozyten-Oberflächenmoleküle, wie Thsd7a und Nephrin (in Kollaboration mit Dr. Nicola Tomas, Dr. Anna Mann und Prof. Friedrich Koch-Nolte). Die hier entstehenden AAV-Varianten sollen sowohl im gesunden Tier als auch im nephrotischen Syndrom (zB. induzierter Nephrin KO in der Maus) *in vivo* untersucht werden und ihre Spezifität, Off-Target-Effekte und Transduktionseffizienz von Podozyten untersucht werden.

Arbeitspaket 2: Entwicklung von Therapieansätzen für die Gentherapie von glomerulären Nierenerkrankungen

Die in Arbeitspaket 1 vielversprechendsten AAV-Varianten sollen für weiterführende Gentherapieansätze verwendet werden:

In der experimenteller Glomerulonephritis soll die P2X7Nb-AAV(-GEC) Variante genutzt werden, um den Krankheitsverlauf einzudämmen. Dies soll durch die Expression sezernierter immunmodulatorischer Gene versucht werden, die lokal in den Entzündungsprozess eingreifen können (Abb. 4A). Aus der Literatur bekannte renoprotektive Faktoren wie TGF-beta, IL-10, PD-L1 oder Annexin A1 sollen hier zum Einsatz kommen. omics-Analysen der Glomeruli behandelter vs un behandelter Tiere sollen durchgeführt werden, um neben den funktionellen und histologischen Bewertungen der Nierenfunktion Einblicke in die Veränderungen der Genexpression zu bekommen.

Podozyten-spezifische Nb-AAV-Varianten sollen im nephrotischen Tiermodell genutzt werden, um durch Gentherapie eine genetische Reparatur, bzw Modulation der Genexpression durch Einbringung eines Transgens oder shRNA hervorzurufen (Abb. 4B). Dafür wird im ersten Schritt das defekte Gen im KO-Mausmodell eingebracht und die Genexpression, sowie der Effekt auf die Nierenfunktion analysiert. Im zweiten Schritt sollen weitere Modifikationen, wie Transgenexpression unter einem podozytenspezifischen Promotor, untersucht werden, um die Spezifität der AAV-basierten Gentherapie weiter zu verbessern.

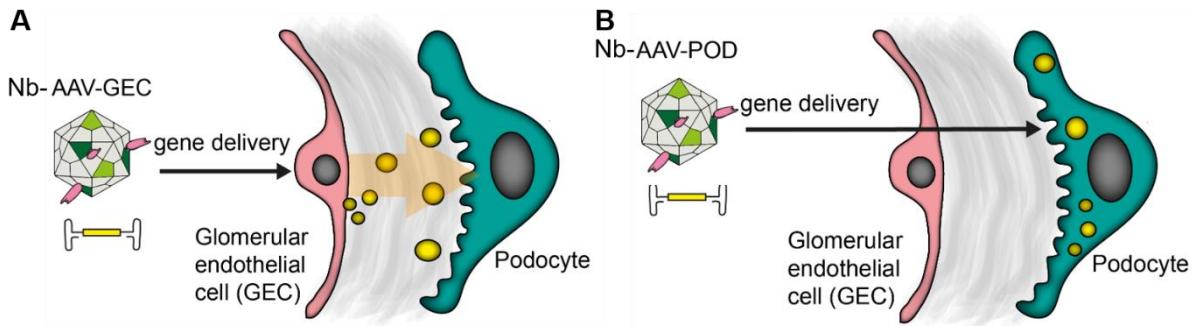


Abbildung 4. Entwicklung von Gentherapien mittels Nanobody-gekoppelten AAVs. (A) Anti-P2X7-Nanobody-AAV-GEC-basierte Genexpression in glomerulären Endothelzellen zur Modulation der glomerulären Mikroumgebung. **(B)** Anti-Podozyten-Nanobody-AAV-basierte Genexpression zur Modulation der podozytären Genexpression.

Referenzen

- 1 Ding, W. Y. *et al.* Adeno-associated virus gene therapy prevents progression of kidney disease in genetic models of nephrotic syndrome. *Sci Transl Med* **15**, eabc8226, doi:10.1126/scitranslmed.abc8226 (2023).
- 2 Korbelen, J. *et al.* Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. *Mol Ther* **24**, 1050-1061, doi:10.1038/mt.2016.62 (2016).
- 3 Hengel, F. E. *et al.* Autoantibodies Targeting Nephrin in Podocytopathies. *N Engl J Med*, doi:10.1056/NEJMoa2314471 (2024).
- 4 Watts, A. J. B. *et al.* Discovery of Autoantibodies Targeting Nephrin in Minimal Change Disease Supports a Novel Autoimmune Etiology. *J Am Soc Nephrol* **33**, 238-252, doi:10.1681/ASN.2021060794 (2022).
- 5 Eichhoff, A. M. *et al.* Nanobody-Enhanced Targeting of AAV Gene Therapy Vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* **15**, 211-220, doi:10.1016/j.omtm.2019.09.003 (2019).
- 6 Pinto-Espinoza, C. *et al.* Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs. *Front Pharmacol* **13**, 1029236, doi:10.3389/fphar.2022.1029236 (2022).