

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Nuklearmedizin

Prof. Dr. med. Gerhard Adam

**CD38-spezifische HLE Nanobody-Dimere
für die Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katharina Petry
aus Trier

Hamburg 2023

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.11.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Katja Weisel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Peter Bannas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antikörper.....	1
1.2	Fc-Effektorfunktionen eines Antikörpers.....	3
1.2.1	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC).....	4
1.2.2	Komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC)	4
1.3	Multiples Myelom	6
1.4	Daratumumab, ein Antikörper für die Therapie des Multiplen Myeloms.....	7
1.5	CD38.....	8
1.6	Schwerketten-Antikörper.....	9
1.7	CD38-spezifische Nanobodies	11
2	Zielsetzung und Fragestellung.....	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Material.....	14
3.1.1	Antikörper.....	14
3.1.2	Chemikalien.....	15
3.1.3	Geräte	16
3.1.4	Größenstandards	17
3.1.5	Kulturmedien	17
3.1.6	Medikamente	18
3.1.7	Plasmide	18
3.1.8	Primer	18
3.1.9	Proteine.....	19
3.1.10	Puffer	19
3.1.11	Reagenzsysteme (Kits)	20
3.1.12	Versuchstiere	20
3.1.13	Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.14	Zellen.....	22
3.2	Methoden.....	23
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	23
3.2.2	Zellbiologische Methoden	28
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.4	Immunologische Methoden <i>in vitro</i>	31

3.2.5	Kopplung von Nanobody-Fusionsproteinen an den Nah-Infrarot-Farbstoff Alexa Fluor 680 und Präanalytik für <i>in vivo</i> -Bildgebungsversuche.....	34
3.2.6	Immunologische Methoden <i>ex vivo</i>	36
3.2.7	Targeting-Versuch <i>in</i> und <i>ex vivo</i>	37
4	Ergebnisse	40
4.1	Klonierung und rekombinante Produktion von <i>biparatopischen</i> und <i>bivalenten</i> HLE Nanobody-Dimeren	40
4.2	Antikörperabhängige Zytotoxizität an Lymphomzellen.....	45
4.2.1	Charakterisierung der Lymphom-Zelllinien.....	46
4.2.2	Komplementvermittelte Zytotoxizität	54
4.2.3	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	66
4.3	Komplementvermittelte Zytotoxizität an primären Knochenmarkzellen.....	67
4.4	Fluorochrom-Konjugation von Nanobodies und <i>in vivo</i> Targeting-Experimente.....	70
5	Diskussion	77
5.1	Die Zelloberflächenexpression von CD38, CD55 und CD59 beeinflusst die CDC-Sensitivität von Tumorzelllinien	77
5.2	HLE Nb-Dimere steigern den Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber Lymphomzelllinien, nicht aber gegenüber primären Myelomzellen.....	78
5.3	HLE Nb-Dimere erreichen solide, subkutane CD38+ Tumore im Mausmodell.....	82
6	Zusammenfassung	85
7	Abkürzungsverzeichnis	87
8	Literaturverzeichnis	91
9	Appendix	I
10	Danksagung	VI
11	Tabellarischer Lebenslauf	VII
12	Eidesstattliche Versicherung	VIII

1 Einleitung

Die folgende Einleitung gibt einen Überblick über Antikörper und Fc-abhängige Effektorfunktionen, den Einsatz von Antikörpern in der Therapie des Multiplen Myeloms am Beispiel des CD38-spezifischen monoklonalen IgG1-Antikörpers Daratumumab, über den Stand der Forschung zum Oberflächenprotein CD38 sowie über Nanobodies und Nanobody-basierte Schwereketten-Antikörper.

1.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Teil der erworbenen Immunantwort. Es handelt sich um Glykoproteine, die membranständig auf B-Lymphozyten oder als lösliche Antikörper im Serum vorkommen. Die Bindung eines Antigens über den B-Zell-Rezeptor führt zur Aktivierung des B-Lymphozyten und bewirkt seine Differenzierung zur Plasmazelle. Plasmazellen produzieren und sezernieren den in ihrer DNA kodierten Antikörper (*Rink et al. 2015, Murphy and Weaver 2018*). Zu den wichtigsten Aufgaben sezernierter Antikörper zählen die Neutralisierung von Pathogenen und deren Opsonierung (Markierung) für die körpereigene zelluläre Immunabwehr durch z.B. NK-Zellen (siehe 1.2.1 ADCC) sowie für die Aktivierung des Komplementsystems (siehe 1.2.2 CDC) (*Forthal 2014, Murphy and Weaver 2018*). Hierbei kommt Antikörpern eine Doppelfunktion zu – die Bindung an ein Antigen über die variablen Domänen sowie die Bindung an ein Effektormolekül bzw. eine Effektorzelle über die konstante Fc-Domäne (*Padlan 1994*).

Es gibt verschiedene Isotypen von Antikörpern, die sich in Vorkommen, Funktion und Aufbau unterscheiden – IgM, IgG, IgA, IgD und IgE. Der mit einem Anteil von 75 % häufigste Isotyp im Serum, IgG, ist ein Monomer mit hoher Affinität und niedriger Avidität (*Rink et al. 2015*). Seine vier Subklassen werden entsprechend ihrer Häufigkeit im Serum als IgG1-4 bezeichnet (*Murphy and Weaver 2018*). Zur Aktivierung des Komplementsystems kommt es nur durch IgG1 und IgG3, geringfügig auch IgG2 (*Yu et al. 2020*) sowie durch IgM (*Murphy and Weaver 2018*). Hierzu muss das Komplement-Erkennungsmolekül C1q ein IgM- oder mindestens zwei IgG-Moleküle binden (*Murphy and Weaver 2018*). Neuere Forschungsergebnisse zeigten, dass eine adäquate C1q-Bindung, d.h. eine Bindung mit ausreichender Avidität, erst durch Hexamerisierung der Fc-Fragmente von IgG ermöglicht wird (*Diebolder et al. 2014*). IgG4, IgA, IgD und IgE vermitteln keine oder nur eine sehr schwache Komplementaktivierung (*Rink et al. 2015, Yu et al. 2020*). Ursächlich sind hier vermutlich strukturelle Divergenzen (Aminosäuresubstitutionen, Glykosylierungen und Disulfidbrücken) im Bereich der Komplementbindungsstelle unterhalb der Gelenk-Region (*Rink et al. 2015*).

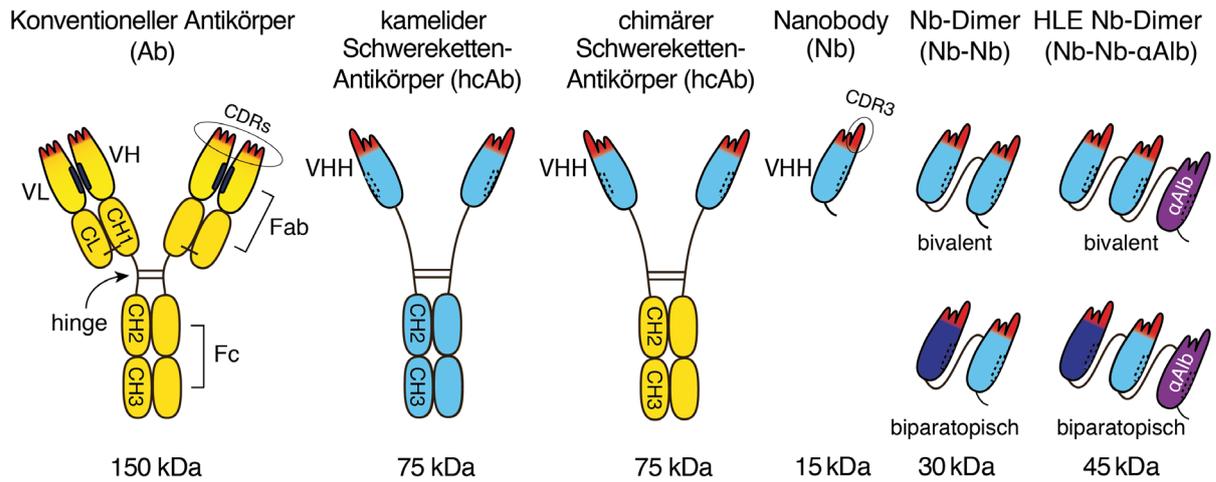


Abbildung 1 | Schematische Darstellung konventioneller Antikörper, Schwereketten-Antikörper sowie Nanobody-basierter Fusionsproteine.

Ein konventioneller Antikörper (gelb, *engl.* Antibody, Ab, 150 kDa) vom Typ Immunglobulin G (IgG) besteht aus zwei schweren (*engl.* heavy, H) und zwei leichten (*engl.* light, L) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die variablen Domänen beider Ketten (VL, VH) vermitteln die Erkennung des Antigens. Die Spezifität wird durch je drei Peptidschleifen auf jeder Kette determiniert, die hypervariablen Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 (*engl.* complementarity-determining region, CDR). Zusammen bilden diese sechs Peptidschleifen die Antigenbindungsstelle; das sogenannte Paratop. Oberhalb der Gelenkregion (*engl.* hinge region) sind die variablen Domänen jeweils mit einer konstanten Domäne verbunden (CL, CH1), die untereinander durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Zusammen bilden diese vier Immuglobulin-Domänen das sogenannte Antigen-bindende Fragment (*engl.* Fragment antigen binding, Fab). Das kristallisierbare Fragment (*engl.* Fragment crystallizable, Fc) unterhalb der hinge-Region besteht aus zwei weiteren konstanten Domänen der schweren Ketten (CH2, CH3) und kann immunologische Effektorfunktionen vermitteln. Ein kamelider Schwereketten-Antikörper (blau, *engl.* heavy chain Antibody, hcAb) besteht aus zwei schweren Ketten und besitzt im Vergleich zu konventionellen Antikörpern keine leichte Kette oder CH1-Domäne, was sich in der kleineren Molekülgröße von 75 kDa widerspiegelt. Hier wird die Spezifität lediglich durch die variable Domäne der schweren Kette (VHH) vermittelt. Die Kombination aus kamelider variabler Domäne und humanem Fc ergibt einen chimären Schwereketten-Antikörper (blau-gelb) und wird auch als hcAb bezeichnet. Die variable Domäne, auch VHH oder Nanobody (Nb) genannt, hat eine geringe Molekülgröße (15 kDa), hohe Stabilität und hohe Löslichkeit. Infolgedessen können Nbs wesentlich einfacher mit weiteren Nbs und anderen Proteinen rekombinant zu Nanobody-Dimeren (30 kDa) oder mit einem Albumin-spezifischen Nb zu Halbwertszeit-verlängerten HLE Nanobody-Dimeren (*engl.* half-life extended, HLE, 45 kDa) verknüpft werden. Ihre lange CDR3 ermöglicht Nanobodies verglichen mit konventionellen Antikörpern einen besseren Zugang zu schlecht erreichbaren Epitopen. *Abbildung modifiziert nach Bannas et al. 2017.*

Strukturell besteht ein konventioneller IgG-Antikörper aus zwei identischen schweren (*engl.* Heavy, H) und zwei identischen leichten (*engl.* Light, L) Ketten (**Abb. 1**). Die schweren Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander und jeweils auch mit einer leichten Kette verbunden. Dies verleiht dem Antikörper in Kombination mit nichtkovalenten Bindungen seine typische Ypsilon-förmige Struktur (*Davies et al. 1975, Murphy and Weaver 2018*).

Die schwere Kette bestimmt den Isotyp des Antikörpers und besteht aus einer variablen und je nach Isotyp aus drei (IgG, IgA, IgD) oder vier (IgM, IgE) konstanten Domänen: VH sowie CH1, CH2, CH3 (und CH4). Die leichte Kette setzt sich aus nur einer variablen (VL) und einer konstanten Domäne (CL) zusammen. Beim Menschen kommen zwei verschiedene Typen der leichten Kette vor, Lambda (λ) und Kappa (κ) (*Rink et al. 2015*).

Funktional besteht ein IgG-Antikörper aus zwei identischen Antigen-bindenden Fragmenten (*engl. Fragment antigen binding, Fab*) und dem Effektorfunktion-vermittelnden kristallisierbaren Fragment (*engl. Fragment crystallizable, Fc*). Das Fab-Fragment setzt sich aus den beiden leichten Ketten sowie VH und CH1 der schweren Ketten zusammen; im Fc-Teil sind die Regionen CH2 und CH3 der beiden schweren Ketten vereint. Fab und Fc sind über die sogenannte Hinge-Region miteinander verknüpft, die je nach Antikörper-Klasse bzw. Isotyp in Flexibilität und Länge variiert, oder im Fall von IgM und IgE durch die zusätzliche konstante Domäne der schweren Kette ersetzt ist (*Padlan 1994*).

Die variablen Domänen beider Ketten (VL, VH) vermitteln die Erkennung des Antigens. Sie setzen sich aus so genannten hypervariablen (*engl. complementarity determining regions, CDR*) und konservierten Regionen (*engl. framework regions, FR*) zusammen. Die Spezifität eines Antikörpers wird determiniert durch Länge und Sequenz der drei Peptidschleifen auf jeder variablen Domäne, die als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet werden. Der für die CDR3 kodierende einzigartige DNA-Abschnitt wird während der B-Zell-Entwicklung durch DNA-Rekombination und Nukleotidinsertionen festgelegt. Zusammen bilden diese sechs Peptidschleifen die Antigenbindungsstelle, das sogenannte Paratop. Den Abschnitt auf dem Antigen, an den das Paratop nicht-kovalent bindet, bezeichnet man als Epitop (*Murphy and Weaver 2018*).

1.2 Fc-Effektorfunktionen eines Antikörpers

Die antitumorale Wirkung von Antikörpern kommt auf verschiedenen Wegen zustande. Hierzu zählen Fc-abhängige immunologische Effektorfunktionen, immunregulatorische und direkte antitumorale Effekte. Zu den Fc-abhängigen Effektorfunktionen gehören die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und –Phagozytose (ADCP) sowie die komplementvermittelte zelluläre Zytotoxizität (CDC). Immunregulatorische Effekte beinhalten die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Immunzellen und die Blockade von Tumor-Wachstumssignalen. Unter direkte antitumorale Effekte fallen z.B. die Inhibition der Angiogenese sowie die Auslösung der Apoptose (*Yu et al. 2020*).

1.2.1 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Die Zerstörung der antikörperbedeckten Zielzelle durch Fc-Rezeptor-tragende Effektorzellen bezeichnet man als ADCC (**Abb. 2**). Zu diesen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems zählen NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten.

Insbesondere die Rezeptorklasse Fc γ RIIIa (CD16) vermittelt ADCC und wird im Wesentlichen von NK-Zellen exprimiert (*Gurjar et al. 2017*).

Die Erkennung auf der Tumorzelle gebundener Antikörper über die Fc γ -Rezeptoren der NK-Zelle führt zur Quervernetzung von Ziel- und Effektorzelle. Dies hat die Aktivierung der NK-Zelle zur Folge, welche nun durch Ausschüttung zytotoxischer Substanzen wie Perforine und Granzyme die Apoptose der Zielzelle induziert (*Seidel et al. 2013, Murphy and Weaver 2018*).

1.2.2 Komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC)

Das Komplementsystem zählt zum angeborenen Immunsystem. Es besteht aus 30 löslichen Plasmaproteinen, den sogenannten Komplementfaktoren und kann nach Bindung an zellgebundene Antikörper (Immunkomplexe) kaskadenartig aktiviert werden (*Murphy and Weaver 2018*). Läuft die Kaskade vollständig ab, mündet sie in die Ausbildung des sogenannten Membran-Angriffs-Komplex (kurz MAC), der durch Porenbildung in der Zellmembran die Lyse der Zielzelle und damit den Zelltod bewirkt. Diesen Vorgang bezeichnet man als komplementvermittelte Zytotoxizität (*engl. Complement-Dependent Cytotoxicity*), kurz CDC (*Esser 1994*). Die Komplementfaktoren wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt. Die Reihenfolge der Aktivierung ist jedoch C1 – C4 – C2 – C3 – C5 – C6 – C7 – C8 – C9. Die Buchstaben a und b bezeichnen die durch Proteolyse entstandenen aktivierten Spaltprodukte. Hier steht a für das kleinere Fragment, b für das größere. Eine Ausnahme bildet C2, hier sind die Begrifflichkeiten umgekehrt (*Walport 2001, Murphy and Weaver 2018*). Die Nomenklatur q-r-s bei C1 bezeichnet hingegen keine Spaltprodukte eines Zymogens, sondern den Zusammenschluss aus dem Erkennungsmolekül C1q und den beiden Serinproteasen C1r und C1s.

Die Komplementkaskade (**Abb. 2**) beginnt mit der Bindung des ca. 460 kDa großen hexameren Erkennungsmoleküls C1q über mindestens zwei periphere globuläre Domänen an einen Immunkomplex auf der Zellmembran (*Gaboriaud et al. 2003, Frank and Sullivan 2014*). Dabei kommt es zur Konformationsänderung der doppelt anliegenden Proteasen C1r und C1s und infolgedessen zur Aktivierung der autokatalytischen enzymatischen Aktivität von C1r. C1r aktiviert die Serinprotease C1s. C1s aktiviert dann C4 und C2. Die Spaltprodukte fügen sich zur sogenannten C3-Konvertase (C4b2a) zusammen und spalten C3 in C3a und C3b, wobei C3b über eine nach Spaltung freigelegte Thioestergruppe kovalent an membranständige

Proteine bindet. Durch Bindung von C3b an seine Konvertase entsteht die C5-Konvertase (C4b2a3b), welche C5 in C5a und C5b spaltet. Während die Anaphylatoxine C3a und C5a die Chemotaxis von Immunzellen triggern, ermöglicht die Opsonierung des Pathogens bzw. der Zielzelle durch C3b die Bindung von Phagozyten über die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 und infolgedessen die Induktion der Phagozytose (Komplementvermittelte zelluläre Phagozytose, CDCP) (Janeway Jr et al. 2001).

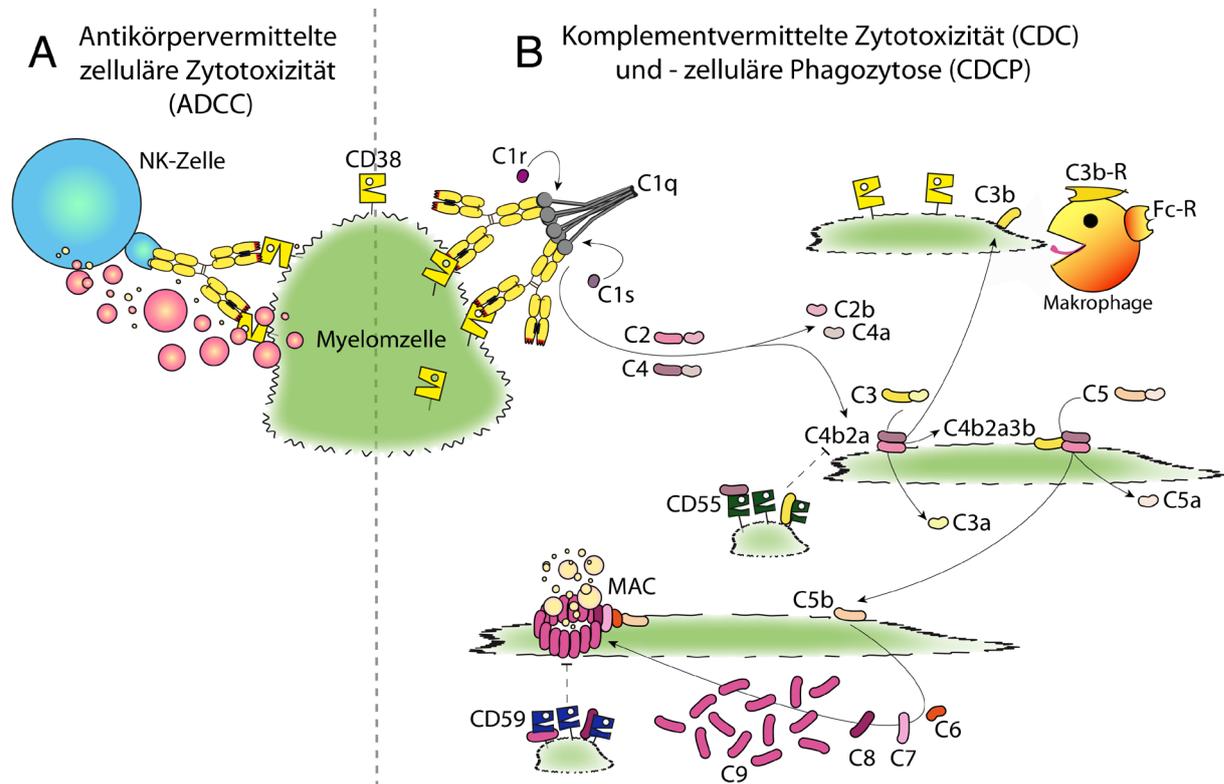


Abbildung 2 | Schematische Darstellung der Fc-Effektorfunktionen eines Antikörpers
(A) Beim ADCC kommt es nach Immunkomplexbildung über den Fc-Teil des Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen, wie z.B. NK-Zellen. Die Effektorzelle schüttet nach Bindung über den Fc γ -Rezeptor zytotoxische Mediatoren wie Perforine und Granzyme aus, die die Apoptose der Zielzelle auslösen (Seidel et al. 2013). **(B)** Beim CDC kommt es nach Antikörperbindung zur Aktivierung der Komplementkaskade und infolgedessen zur Ausbildung einer Pore in der Membran der Zielzelle. Zunächst wird dabei C1q durch Bindung an mindestens zwei Fc-Teile Oberflächenantigen-gebundener Antikörper (in diesem Fall CD38) aktiviert. C1q rekrutiert C1r und C1s, letzteres spaltet C2 sowie C4 in jeweils zwei Teile, C4a und C4b. Die kleineren Spaltprodukte (C2b, C4a, ff.) wirken chemotaktisch, sie locken Immunzellen an. Die größeren Spaltprodukte (C2a und C4b) lagern sich zur sogenannten C3-Konvertase (C4b2a) zusammen und spalten C3 in C3a und C3b. C3b fungiert einerseits als Opsonin für eine Phagozytose (CDCP) und andererseits als Bestandteil der C5-Konvertase (C4b2a3b). Diese spaltet nun C5 in C5a und C5b. Das Spaltprodukt C5b lagert sich an der Zelloberfläche an und führt über Rekrutierung von C6, C7, C8 und mehreren C9 zur Ausbildung des sogenannten Membran-Angriffs-Komplexes (MAC), einer Pore in der Zellmembran, die zum Tod der Zelle führt. Die Kaskade kann durch verschiedene Faktoren inhibiert werden; CD55 beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase, CD59 verhindert die Ausbildung des MAC (Murphy and Weaver 2018). Diese Abbildung wurde nach einer Vorlage von Julia Hambach, Institut für Immunologie, UKE, mit ihrer Erlaubnis modifiziert und erweitert.

Das Spaltprodukt C5b führt an der Zelloberfläche zur Rekrutierung von C6 und C7. Eine anschließende Konformationsänderung von C5b67 ermöglicht die Einlagerung in die Zellmembran. Die Anlagerung von C8 an C5b67 ermöglicht die Fertigstellung des MAC durch Polymerisierung von 10-16 C9-Proteinen. Dies führt zur Ausbildung einer ca. 10 nm großen Pore, die die Integrität der Zellmembran zerstört und den Tod der Zielzelle auslöst (*Murphy and Weaver 2018*). Neben der Infektabwehr kommt dem Komplementsystem auch eine Rolle in der Beseitigung von Antikörper-beschichteten Tumorzellen zu (*Walport 2001*).

Die GPI-verankerten Membranproteine CD55 und CD59, die den Ablauf der Komplementkaskade stören, werden von gesunden Zellen zum Schutz vor der komplementvermittelten Lyse exprimiert (*Murphy and Weaver 2018*). Auch Tumorzellen wie das Multiple Myelom (MM) machen sich die Expression dieser sogenannten Komplement-Inhibitoren auf ihrer Oberfläche zunutze, um dem körpereigenen Immunsystem zu entkommen. So geht eine CDC-Resistenz von CD38-positiven MM- oder Non-Hodgkin Lymphom (NHL)-Zellkulturzellen *in vitro* mit einer signifikant erhöhten Rate von CD59 und einer Tendenz zu erhöhtem CD55 einher (*Nijhof et al. 2016*). CD55 und CD59 führen auf zwei unterschiedlichen Wegen zur Unterbrechung der Komplementkaskade: CD55 (auch DAF, *engl.* Decay Acceleration Factor) bewirkt die Verdrängung von C2a aus dem C4b2a-Komplex und beschleunigt so den Zerfall der C3-Konvertasen. CD59 (auch Protectin) verhindert die Bindung von C9 an den Komplex und hemmt somit die Ausbildung des MAC (*Murphy and Weaver 2018*). Die Entfernung der beiden Faktoren von der Zelloberfläche mittels Phospholipase C führte *in vitro* bei der Hälfte der eingesetzten Zelllinien zur Überwindung der initial beobachteten CDC-Resistenz.

Beim Multiplen Myelom wird zum Zeitpunkt des Tumorprogresses unter Antikörpertherapie oft eine signifikante Erhöhung von CD55 und CD59 verglichen mit Therapiebeginn beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Expression der Komplement-Inhibitoren beim Multiplen Myelom einen wichtigen Resistenzmechanismus für die Immunevasion darstellt (*Nijhof et al. 2016*).

1.3 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung Immunglobulin-produzierender Plasmazellen. Mit einer Inzidenz von ca. 5-8/100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland handelt es sich um den häufigsten Tumor von Knochenmark und Knochen. Das mittlere Diagnosealter liegt bei ca. 70 Jahren, Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Aufgrund der charakteristischen monoklonalen Vermehrung von CD38-positiven Plasmazellen wird das Multiple Myelom zu den niedrig-malignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt (*Herold 2022, Onkologie 2022*).

Diagnostisch spricht man von einem Multiplen Myelom, wenn histologisch oder zytologisch eine Infiltration von $> 10\%$ Plasmazellen im Knochenmark vorliegt oder histologisch ein extramedullärer Plasmaherd nachgewiesen wird (Plasmozytom). Zusätzlich müssen ein Myelom-definierendes CRAB-Kriterium (*engl.* für hyper-calcemia (C), renal insufficiency (R), anemia (A) und bone lesions (B)), oder Progressions-sensitive Biomarker (abnorme freie Leichtketten im Serum, eine klonale Infiltration des Knochenmarks von $\geq 60\%$, mehr als eine sichtbare fokale Knochenläsion im low-dose Ganzkörper CT) vorliegen. Biomarker erlauben eine frühe Diagnostik des Multiplen Myeloms und indizieren eine Therapie bereits vor dem Eintreten von Endorganschäden. Liegen bei einer Plasmazellinfiltration $> 10\%$ keine Myelom-definierenden Kriterien vor, spricht man von einem schwelenden Multiplen Myelom (SMM, *engl.* smouldering multiple myeloma), bei einer Infiltration $< 10\%$ mit abnormen Leichtketten im Serum von MGUS, einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz. In beiden Fällen besteht das Risiko des Übergangs in ein behandlungsbedürftiges Multiples Myelom. Dieses Progressionsrisiko beträgt im Falle von MGUS 1% pro Jahr, im Falle des SMM je nach Dauer des Bestehens $1-10\%$ pro Jahr (*Ho et al. 2020, Rajkumar 2022*).

1.4 Daratumumab, ein Antikörper für die Therapie des Multiplen Myeloms

Die Lebenserwartung von Patienten mit Multiplem Myelom hat sich im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben in den letzten Jahrzehnten dank neuartiger Medikamente wie den Proteasominhibitoren (PI) Bortezomib oder Carfilzomib und Immunmodulatoren (IMiDs) wie Thalidomid, Lenalidomid oder Pomalidomid verbessert. Trotzdem kommt es nach anfänglicher Remission häufig zu einem Rezidiv mit schlechter Prognose. Das verbesserte Verständnis der Erkrankung und die Entdeckung von CD38 als hoch exprimiertes Oberflächenprotein führte zur Entwicklung zielgerichteter Immuntherapien gegen CD38-exprimierende Myelomzellen. So wurde Daratumumab (Darzalex®) als erster monoklonaler, humaner IgG1 κ Antikörper gegen CD38 im Jahr 2015 zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen (*Cho et al. 2017*). In präklinischen Studien induzierte Daratumumab Zellzytotoxizität durch verschiedene Wirkmechanismen (MOA, *engl.* mechanisms of action). Zu diesen zählt die Tötung CD38-positiver Zellen durch Kreuzvernetzung, CDC, ADCC oder ADCP (*van de Donk et al. 2016*). Bei vielfach vorbehandelten Patienten konnte darüber hinaus ein immunmodulatorischer Einfluss von Daratumumab auf das Mikromilieu nachgewiesen werden: So kommt es im Verlauf der Therapie mit Daratumumab auch zur Verminderung CD38-positiver Immunsuppressor-Zellen wie regulatorischer T- und B- sowie myeloider Suppressor-Zellen. Dies führt zu einer signifikant erhöhten Anzahl von zytotoxischen T- und T-Helfer-Zellen und infolgedessen zu einer Stimulation ihrer Effektorfunktion (*Krejci et al. 2016*).

Darüber hinaus wurde auch eine Verminderung CD38-exprimierender NK-Zellen beobachtet, was unter Umständen einen initialen Resistenzmechanismus gegen Daratumumab darstellt (*Krejci et al. 2016, Nagai et al. 2019*). Inzwischen gibt es sieben Indikationen für den Einsatz von Daratumumab, die sich in Behandlungsoption (Erst- bis Viertlinie) und Therapieschema (Kombination mit IMiD oder PI bzw. Monotherapie) unterscheiden (*Janssen Biotech 2022*). Grund hierfür ist die in zahlreichen Studien beobachtete signifikante Steigerung des Gesamtansprechens und höhere Rate an Negativität für minimale Resterkrankung (MRD, engl. Minimal Residual Disease). Nach Hinzugabe von Daratumumab zur bestehenden Grundtherapie ergab sich daraus eine Risikoreduktion für Krankheitsprogress bzw. Tod durch Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFS, engl. Progression Free Survival) (*Dimopoulos et al. 2016, Palumbo et al. 2016, Usmani et al. 2016, Chari et al. 2017, Mateos et al. 2017, Spencer et al. 2018, Facon et al. 2019, Moreau et al. 2019, Dimopoulos et al. 2020*). Die erteilte Zulassung der subkutanen Verabreichung von Daratumumab könnte die Therapie zudem künftig erleichtern (*Mateos et al. 2020*).

1.5 CD38

CD38 ist ein enzymatisch aktives, multifunktionelles Typ II-Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa (*Malavasi et al. 1992, Liu et al. 2005*). CD38 besteht aus 300 Aminosäuren (AS), welche die kurze intrazelluläre Domäne (21 AS), die Transmembranregion (21 AS) sowie die große extrazelluläre Domäne (258 AS) bilden (*van de Donk et al. 2016*). Das Protein kann je nach Stimulus membrangebunden, internalisiert oder in löslicher Form vorliegen (*Deaglio et al. 2001, Lee 2006*). CD38 wird in geringem Maße auf Vorläuferzellen und frühen hämatopoetischen Zellen exprimiert, die Expression verliert sich während des Reifungsprozesses und erst während der Zell-Aktivierung auf T-, B- und NK-Zellen sowie Zellen der myeloiden Reihe wird CD38 wieder exprimiert (*van de Donk et al. 2016*). Darüber hinaus kommt es auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Prostataepithelzellen, den Beta-Zellen des Pankreas, Osteoklasten, Zellen der Retina oder dem Sarkolemm von glatter und quergestreifter Muskulatur vor (*Deaglio et al. 2001*). Während es auf diesen Zellen in eher geringem Maße exprimiert wird, zeigt sich auf Plasmazellen eine hohe und gleichförmige Expression von CD38 (*Morandi et al. 2018*).

Als Enzym katalysiert CD38 aus NAD⁺ pH-abhängig die Synthese und Hydrolyse von sekundären Messengern, wie der zyklischen ADP-Ribose (cADPR) und Nicotinsäureadenin-dinukleotidphosphat (NAADP). Diese induzieren über eine Mobilisierung intrazellulärer Calcium-Speicher Prozesse wie Chemotaxis, T-Zell-Aktivierung, Zell-Proliferation, Zytokinproduktion und Insulinsekretion (*Deaglio et al. 2001, Liu et al. 2005, Lee 2006*).

Als Rezeptor bindet CD38 an den Liganden CD31, der auf Endothelzellen, Plasmazellen und Mantelzellen sowie in Lunge und Niere vorkommt. Diese Interaktion löst beispielsweise die Aktivierung und Proliferation von Leukozyten sowie deren Adhäsion an das Endothel aus (*van de Donk et al. 2016*).

CD38 wird von den entarteten Plasmazellen des Multiplen Myeloms überexprimiert. Hier scheint CD38 eine wichtige Rolle für das Überleben der Tumorzellen und den Erhalt des protektiven Mikromilieus zu spielen. Somit stellt CD38 ein attraktives Zielprotein für die Behandlung mit therapeutischen Antikörpern dar (*van de Donk et al. 2016*).

1.6 Schwereketten-Antikörper

Belgische Forscher entdeckten Anfang der 90er Jahre, dass Dromedare und andere Mitglieder aus der Familie der Kameliden zusätzlich zu konventionellen Antikörpern eine zweite Form von funktionsfähigen Antikörpern produzieren können, so genannte IgG Schwereketten-Antikörper (hcAb, *engl.* heavy chain Antibody) (*Hamers-Casterman et al. 1993*). Aufgrund ihrer guten Löslichkeit und einfachen Produktion als rekombinante Proteine haben sich hcAb der Kamelidae bzw. deren variable Domäne (VHH) in der Forschung bewährt (*Harmsen and De Haard 2007*).

HcAb bestehen nur aus zwei schweren IgG-Ketten und formen somit Homodimere. Anders als bei konventionellen Antikörpern bildet hier folglich eine singuläre Domäne die Antigenbindungsstelle. Diese variable Domäne wird analog zur VH des konventionellen Antikörpers auch als VHH (*engl.* variable heavy chain of heavy chain antibodies) oder Einzeldomänen-Antikörper bezeichnet. Funktional entspricht sie dem Fab-Fragment. Aufgrund ihrer kleinen Größe im Nanometer-Bereich nennt man sie auch Nanobody. Mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa stellen Nanobodies das kleinste bekannte physiologische antigenbindende Fragment dar (*Vincke and Muyldermans 2012, Muyldermans 2013*).

Jede Kette eines Schwereketten-Antikörpers setzt sich aus der VHH, einer Gelenkregion, die die beiden schweren Ketten verknüpft, sowie einer CH2- und CH3-Domäne zusammen (**Abb. 1**). Strukturell betrachtet fehlen dem Schwereketten-Antikörper im Fab-Fragment damit zwei wesentliche Bestandteile des konventionellen Antikörpers: die leichten Ketten sowie die CH1-Domäne (*Hamers-Casterman et al. 1993*). Letztere wird zwar in der Erbinformation kodiert, Punktmutationen führen jedoch zum Splicing dieser Region aus dem RNA-Transkript und damit zum Verlust der CH1-Domäne (*Nguyen et al. 1999, Muyldermans 2013*). Die VHH eines Schwereketten-Antikörpers setzt sich analog zur VH aus drei hypervariablen Regionen und vier Gerüstregionen, auch FR (*engl.* framework regions), zusammen.

Die FR2 konventioneller Antikörper enthält hochkonservierte hydrophobe Aminosäuren, die für die Interaktion mit der leichten Kette von Bedeutung sind. Diese sind in der VHH eines Schwereketten-Antikörpers durch hydrophile Aminosäuren ersetzt (*Harmsen and De Haard 2007, Wesolowski et al. 2009*). Zusammengenommen erklärt dies, warum bei Schwereketten-Antikörpern die Paarung mit leichten Ketten ausbleibt (*Muyldermans 2013*).

Auch die drei hypervariablen Regionen, kurz CDR (*engl. complementarity determining regions*), die die Spezifität eines Antikörpers definieren, sind bei VHHs auffällig verändert. So findet man eine nach N-terminal erweiterte CDR1, die eine höhere Diversität im Repertoire der Antigen-Bindung suggeriert (*Vincke and Muyldermans 2012, Muyldermans 2013*). Darüber hinaus zeigt sich die CDR3 der VHH mit einer Länge von 3-28 AS deutlich variabler als die CDR3 der VH (8-15 AS). Bei vielen VHHs bildet die verlängerte CDR3 eine fingerförmige Struktur und ermöglicht so den Zugang zu versteckten Epitopen wie z.B. einem katalytischen Enzymzentrum, das für konventionelle Antikörper aufgrund ihres flachen Paratops schlecht oder gar nicht erreichbar ist (*Wesolowski et al. 2009, Bannas et al. 2017*).

Verglichen mit einem konventionellen Antikörper mit einem molekularen Gewicht von ca. 150 kDa sind hcAb (ca. 75 kDa) und Nanobodies (ca. 15 kDa) wesentlich kleiner (**Abb. 1**). Die geringe Molekülgröße ermöglicht dem Nanobody ein tieferes Eindringen in Gewebe und eine schnellere Ausscheidung über die Nieren (*Bannas et al. 2017, Yang and Shah 2020*). Nanobodies sind aufgrund ihrer kleinen Größe und hohen Ähnlichkeit zu menschlichen VH-Domänen dabei kaum immunogen (*Cortez-Retamozo et al. 2002*).

Da Nanobodies nur aus einer einzelnen, gut löslichen und stabilen variablen Domäne bestehen, lassen sie sich durch Klonierungstechniken leicht mit weiteren Nanobodies und anderen Proteinen rekombinant verknüpfen. So ermöglicht die Umklonierung eines VHH-kodierenden Inserts in einen Vektor mit beliebigem Fc (z.B. humanem IgG1) die Herstellung chimärer Nb-Fusionsproteine, die die Vorteile von Nanobodies mit denen humaner Fc-Domänen vereinen (*Wesolowski et al. 2009, Bannas et al. 2017, Schriewer et al. 2020*). Die Verknüpfung zweier identischer Nanobodies oder zweier Nanobodies, die verschiedene Epitope auf demselben Antigen erkennen, erhöht die Avidität für das Antigen (*Muyldermans 2013*).

Die gesteigerte Avidität könnte auch die hohe Effektivität von Caplacizumab (Cablivi®) bei der erworbenen thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura und Cilta-Cel (Carvykti®) beim Multiplen Myelom erklären. Caplacizumab und Cilta-Cel sind Nb-Fusionsproteine, die ein *bivalentes* (Caplacizumab) bzw. *biparatopisches* (Cilta-Cel) Nb-Dimer enthalten und von EMA und FDA als erste Nanobody-basierte Arzneimittel zugelassen wurden (*Scully et al. 2019, Berdeja et al. 2021, Mazinani and Rahbarizadeh 2022*).

Die Verknüpfung mit einem Nanobody mit einer Spezifität für Serum-Albumin vermittelt eine Erhöhung der *in vivo* Halbwertszeit des Fusionsproteins (Tijink *et al.* 2008). Darüber hinaus lassen sich solche Fusionsprodukte mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugieren, was ihre bessere Nachverfolgung *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* ermöglicht (Bannas *et al.* 2017, Pape *et al.* 2022).

1.7 CD38-spezifische Nanobodies

Unsere Arbeitsgruppe hat durch Immunisierung von Lamas mit rekombinantem CD38 bereits 22 CD38-spezifische Nanobody-Familien gefunden, die drei unterschiedliche Epitope auf CD38 erkennen. Nach Kopplung an Nah-Infrarot-Fluorochrome (NIRF) sind diese Nanobodies für die molekulare Bildgebung CD38-exprimierender Tumore *in vivo* geeignet (Bannas *et al.* 2015, Fumey *et al.* 2017, Pape *et al.* 2022). Darüber hinaus stellen Nanobodies, die ein anderes Epitop als Daratumumab auf CD38 binden, ein wichtiges diagnostisches Werkzeug für die zuverlässige Detektion CD38-exprimierender Myelomzellen auch bei Daratumumab-behandelten Patienten dar (Oberle *et al.* 2017, Pape *et al.* 2022): Für therapeutische Anwendungen wurden ausgewählte Nanobodies genetisch an die Hinge-, CH2- und CH3-Domänen von humanem IgG1 fusioniert. Diese chimären Nanobody-basierten Schwereketten-Antikörper induzieren an Zellkulturzellen *in vitro* und Myelomzellen *ex vivo* einen mit Daratumumab vergleichbaren, effektiven ADCC (Schriewer *et al.* 2020).

In einem Maus-Xenograft-Modell an CD38-positiven Tumoren *in vivo* bewirken alle hcAb eine effektive Hemmung des Tumorwachstums. Darüber hinaus überleben mit CD38-spezifischen hcAb behandelte Mäuse signifikant länger als mit einem Isotyp behandelte Mäuse. Die Überlebenszeit ist dabei ähnlich oder sogar länger als bei mit Daratumumab behandelten Mäusen (Schriewer *et al.* 2020).

Während einzelne Schwereketten-Antikörper *in vitro* keinen CDC an CD38-exprimierenden Tumorzelllinien auslösen, induziert die Kombination aus zwei CD38-spezifischen hcAb, die an zwei verschiedene Epitope auf CD38 binden, einen effektiven CDC. Analog lässt sich auch der Daratumumab-abhängige CDC durch Kombination mit einem unabhängig bindenden hcAb deutlich steigern (**Abb. 3**). Kombinationen aus zwei Konstrukten, die dasselbe Epitop erkennen, bewirken indes keine Steigerung des CDC (Schütze *et al.* 2018). Wie im Abschnitt 1.1 bereits thematisiert, lassen Modellierungsstudien über die Aktivierung der Komplementkaskade vermuten, dass bei IgG-Antikörpern die Ausbildung von Hexameren für eine effiziente Bindung von C1q erforderlich ist (Diebolder *et al.* 2014). Analog zu konventionellen Antikörpern führt auch bei CD38-spezifischen hcAb die zielgerichtete Hexabody-Mutation einer Aminosäure (E345R) in der CH2-Region zu einer effektiven Induktion des CDC (Diebolder *et al.* 2014, Schütze *et al.* 2018, Fumey 2021).

Biparatopische Schwereketten-Antikörper sind Fusionsproteine, in denen zwei Nanobodies gegen unterschiedliche Epitope von CD38 über einen GS-Linker verknüpft und durch genetische Fusion an Gelenkregion, CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG in einem tetravalenten Schwereketten-Antikörper vereint sind. Diese induzieren einen CDC, der stärker als Daratumumab, jedoch weniger effizient als die Kombination der beiden Schwereketten-Antikörper ist (Schütze *et al.* 2018, Schütze 2020). Dies deutet an, dass *biparatopische* hcAb ähnlich den Hexabody-Schwereketten-Antikörpern eine Clusterbildung induzieren und hierüber die Avidität für die C1q-Bindung erhöhen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Idee entwickelt, dass auch CD38-spezifische Nanobody-Dimere, die unabhängig von einem hcAb oder Daratumumab binden, eine Clusterbildung von membranständigem CD38 induzieren und somit den antikörperabhängigen CDC verstärken können.

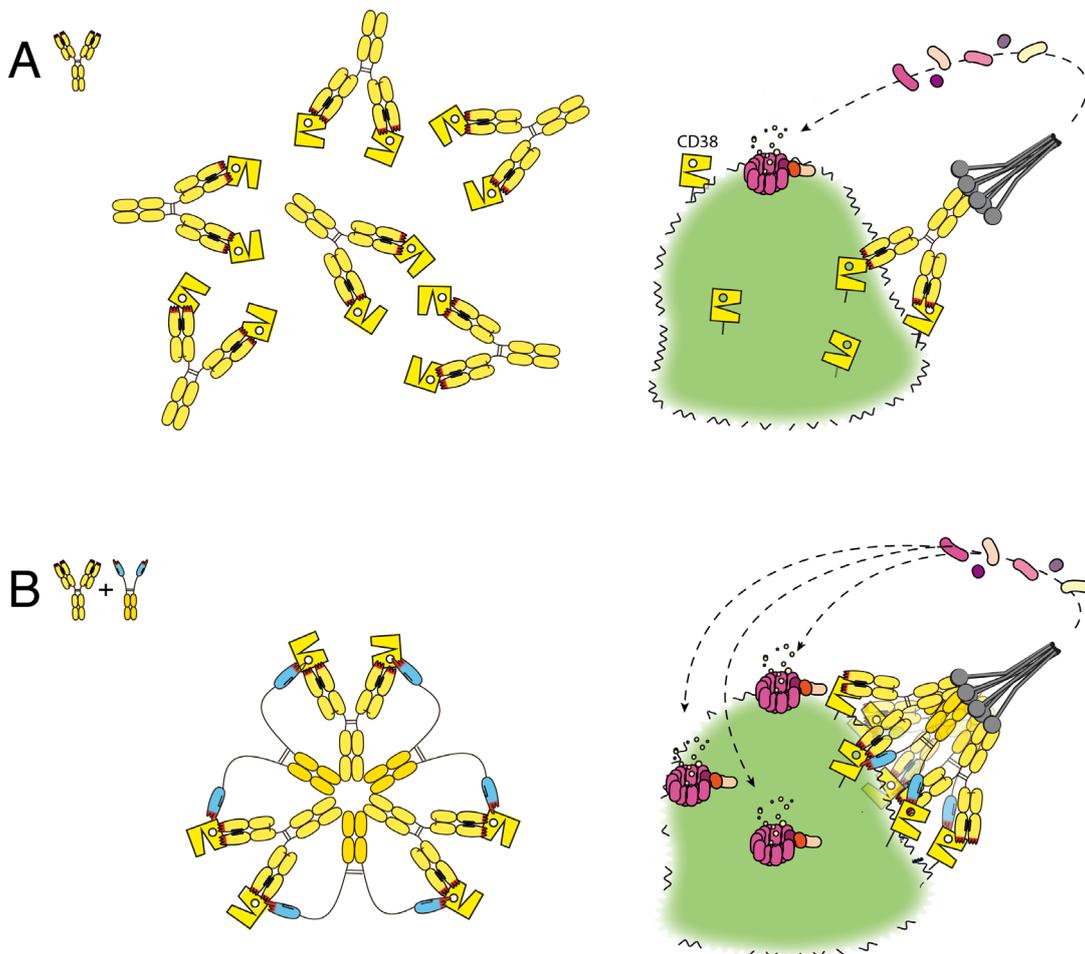


Abbildung 3 | Hypothetische Kreuzvernetzung von CD38 durch Schwereketten-Antikörper
 Während Daratumumab an maximal zwei verschiedene CD38-Oberflächenproteine binden kann (A), induzieren CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper, die unabhängig von Daratumumab binden, die Clusterbildung von CD38-hcAb-Daratumumab-Komplexen auf der Zelloberfläche (B). Die Hexamerisierung der Fc-Teile erhöht die Avidität von C1q und steigert damit die Zytolyse durch Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC, pink).

2 Zielsetzung und Fragestellung

Zentrale Hypothese des Projekts ist, dass CD38-spezifische HLE Nanobody-Dimere sowohl für die *in vivo* Bildgebung von CD38-exprimierenden Tumoren als auch für die Verstärkung des von Daratumumab induzierten CDC gegenüber Tumorzellen geeignet sind. So könnten *bivalente* oder *biparatopische* Nanobody-Dimere, die zwei unabhängig voneinander und unabhängig von Daratumumab bindende Nanobodies (JK2 und JK36) enthalten, CD38-Daratumumab-Komplexe an der Zelloberfläche kreuzvernetzen und damit auch ohne eigene Effektorfunktion die Zytotoxizität von Daratumumab steigern (**Abb. 4**).

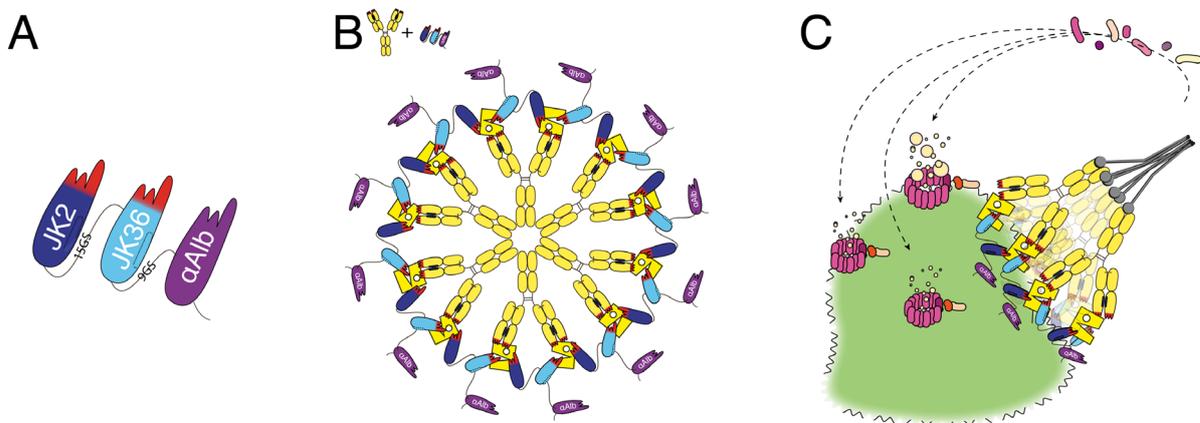


Abbildung 4 | HLE Nanobody-Dimere und hypothetische Kreuzvernetzung

(A) Ein HLE Nanobody-Dimer wie z.B. JK2-JK36- α Alb besteht aus zwei CD38-spezifischen Nanobodies, die über einen 15GS-Linker miteinander verknüpft sind. Der zweite Nanobody ist zudem über einen 9GS-Linker mit einem Albumin-spezifischen Nanobody verknüpft. (B) CD38-spezifische HLE Nanobody-Dimere, die unabhängig von Daratumumab binden, könnten die Clusterbildung von CD38-Daratumumab-Komplexen auf der Zelloberfläche verstärken und die Avidität von C1q an Daratumumab erhöhen. (C) Hierüber könnte die Daratumumab-induzierte Zytolyse durch den Membran-Angriffs-Komplex (MAC) des Komplementsystems gesteigert werden.

Nanobodies, die unabhängig von Daratumumab binden, könnten somit sowohl für die Überwachung als auch für die Verstärkung der therapeutischen Wirkung von Daratumumab eingesetzt werden. Die genetische Fusion von CD38-spezifischen Nanobody-Dimeren an einen Albumin-spezifischen Nanobody könnte die *in vivo*-Halbwertszeit durch eine verzögerte renale Filtration verlängern.

Diese Hypothesen sollen im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* an Tumorzelllinien, *ex vivo* an primären Tumorzellen sowie *in vivo* in einem Allograft-Mausmodell überprüft werden. Ziel dabei ist, neue Erkenntnisse für die Erkennung und Behandlung von Tumoren mit Hilfe von Nanobodies zu erlangen und damit die Diagnostik und Therapie von CD38-überexprimierenden Neoplasien wie dem Multiplen Myelom zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Artikel-Nr.	Hersteller
Alb8	-	mAb77	-	Ablynx
CD19	PE-Cy5	HIB19	555414	BD Pharmigen
CD38	APC	JK36, WF211, MU523	-	AG Nolte
CD38	AF680	JK36, JK2-JK36(- α Alb), JK36-JK36(- α Alb)	-	AG Nolte
CD45	BV785	HI30	BLD- 304048	BioLegend
CD55	FITC	IA10	555693	BD Pharmigen
CD56	PE/Cy7	MEM-188	BLD- 304628	BioLegend
CD59	FITC	p282 (H19)	555763	BD Pharmigen
CD138	FITC	MI15	561703	BD Pharmigen
CD138	BV421	MI15	BLD- 356516	BioLegend
CD229	FITC	HLy-9.1.25	BLD- 326108	BioLegend
CD269	PE/Cy7	19F2	BLD- 357508	BioLegend
CD319	PE/Cy7	162.1	BLD- 331816	BioLegend
C1q	FITC	Polyclonal	F025402-2	Agilent Tech.
C3/C3b/iC3b	PE	7C12	CL7636PE	Cedarlane
C3/C3b/iC3b/C3dg	PE	1H8	CL7637PE	Cedarlane
mouse IgG1	BV421	RMG1-1	406615	BioLegend

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Artikel-Nr.	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	03710653	B.Braun Melsungen
Bovine Serum Albumine	A70906	Sigma-Aldrich Chemie
Collagenase D, 100mg	11088858001	Sigma-Aldrich Chemie
CountBright™ absolute counting beads	C36950	Invitrogen/Life Tech.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Sigma-Aldrich Chemie
DNA Loading Dye 6x	R0611	Thermo Fisher Scientific
dNTP Mix	R0241	Thermo Fisher Scientific
EDTA	8043.1	Roth
eFluor 450 Cell Proliferation Dye	65-0842-85	InvitrogenLife Technologies
Ethanol vergällt	K928.3	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	10270-106	gibco/Life Technologies
Fetal Bovine Serum Advanced (FBS-A)	FBS-11A	Capricorn Scientific
Ficoll-Paque™Plus	17-1440-02	GE-Healthcare Bio-Sciences
Freestyle™ F17	A138502	gibco/Life Technologies
Freestyle™ 293 Expression Medium	12338-018	gibco/Life Technologies
Glutamin, (L-Glutamine, 100x)	25030-024	gibco/Life Technologies
Horse serum, heat-inactivated	16050-122	gibco/Life Technologies
InstantBlue™ Protein Stain	EXP-ISB1L	expedon
Interleukin-2 (IL-2, Proleukin)	1-22475	Novartis Pharma
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	03563318	DELTAMEDICA
KHCO ₃	104854	Merck
LB Agar (Luria/Miller)	X969.3	Carl Roth
LB Medium (Luria/Miller)	6673.4	Carl Roth
LiChrosolv® Water for Chromatography	1.15333.1000	Merck
Luciferin (D-Luciferin Firefly, potassium salt)	L-8220	Biosynth
MEM Alpha Medium	12571-063	gibco/Life Technologies
Natriumpyruvat, 10x	11360-039	gibco/Life Technologies
NH ₄ Cl	101145	Merck
Ni-NTA (HIS-Select® Nickel Affinity Gel)	P6611	Sigma-Aldrich Chemie

Material und Methoden

NuPage Sample Reducing Agent (10x)	NP0009	Invitrogen/Life Technologies
Pacific Orange succinimidyl ester (PacO)	P30253	Invitrogen/Life Technologies
Polyethylenimine (PEI), Linear	2366-2	Polysciences
Propidiumiodid (PI)	P3566	Invitrogen/Life Technologies
Protein A Sepharose™ CL-4B	17-0963-03	GE-Healthcare Bio-Sciences
Roti®-GelStain	3865.1	Carl Roth
RPMI Medium 1640 (1x)	11875-093	gibco/Life Technologies
Tryptone	19533	Organotechnie SAS
UltraComp eBeads (Compensation)	1-2222-42	Invitrogen/Life Technologies
2xYT Medium	11231811	AppliChem

3.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Laufkammer	40-0708	PEQLAB Biotechnologie
Bakterieninkubator	Biotherm 37	JULABO
Brutschrank	MCO-20AIC	Sanyo Denki
Durchflusszytometer	FACSCantoII, FACSCelesta	BD Biosciences
Fluorometer	Victor2 D	PerkinElmer
Geldokumentationssystem	Biovision 3026MX	VWR Life Science
Gewebe-Homogenisator	gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters	Miltenyi Biotec
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubationsschüttler	Ecotron, Multitron Pro, Unitron	Infors
<i>in vivo</i> Imaging-System	IVIS Spectrum	PerkinElmer
Mikroskope	Axiovert 25 ApoTome EVOS FL Cell Imaging System	Zeiss Zeiss Thermo Fisher Sc.
Mikrowelle	M 637 EC	Miele
PCR-Maschine	T3 Thermocycler	Biometra
Pipetten	Research-Line	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipettboy	Integra Biosciences
Scanner	CanonScan 9800F	Canon

Material und Methoden

SDS-PAGE-Kammer	XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen
Spannungsgerät	BIO105 LVD Power Pac 200	Biometra Bio-Rad Lab.
Spektralphotometer	NanoDrop™2000c	Thermo Fisher Sc.
UV-Transilluminator	Biometra TI1	Biometra
Waage	Analytical Plus Scout Pro SP202	OHAUS Europe
Wasserbad	Assistent WTE var 3185	LAUDA Dr.Wobser
Zählkammer	Neubauer Improved	Paul Marienfeld
Zentrifuge	Centrifuge 5424 Heraeus Pico Biofuge Rotanta 460 R	Thermo Fisher Sc. Eppendorf Hettich

3.1.4 Größenstandards

Typ	Name	Art.-Nr. / Komposition	Hersteller
DNA	GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use	SM0314	Thermo Fisher Sc.
Protein	Bovine Gamma Globulin (BGG) Standard 2 mg/mL	10760815	Thermo Fisher Sc.
	Supermarker 1x SM (analog 4x SM) (SDS-Gele)	5 µL BSA 2 mg/mL 8,2 µL NIKA 1 mg/mL 1 µL Lysozym 1 mg/mL PBS -/- 85,5 µL	AG Bannas/Nolte

3.1.5 Kulturmedien

Typ	Zusammensetzung
Einfrüermedium	50 % FCS, 40 % Medium komplett, 10 % DMSO
Feedingmedium	250 mL Transfektionsmedium, 20 % Tryptone
Freestyle Medium komplett	Freestyle™293 Medium
F17 Medium komplett	500 mL, 2 % L-Glutamin (4 mM), 0,1 % Pluronic 10 %, 5 % G418 (Geneticin), 1 % FCS
F17 Medium used	benutztes F-17 Medium aus Transfektionen, steril filtriert

Material und Methoden

F17 Transfektionsmedium	500 mL, 2 % L-Glutamin (4 mM), 0,1 % Pluronic 10 %
LB Agar	40 g auf 1L Milli-Q®-Wasser
LB Medium	25 g auf 1L Milli-Q®-Wasser
MEM Alpha Medium komplett	400 mL, 10 % FBS-A, 10 % horse serum, 1 % L-Glutamin 2 mM, 5 ng/mL IL-2
MEM Alpha Medium used	benutztes MEM Alpha Medium komplett, aus Zellkultur, steril filtriert
RPMI Medium komplett	500 mL, 5 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Na-Pyruvat
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ – pH 7.0, 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glc
2xYT Medium	31 g auf 1 L Milli-Q®-Wasser

3.1.6 Medikamente

Wirkstoff / Konzentration	Art.-Nr.	Hersteller
Carbenicillin 100 mg/mL	15875	SERVA Elektrophoresis
Puromycin 10 mg/mL	ant-pr-1	Invivogen Europe

3.1.7 Plasmide

Plasmid	Hersteller
FS#717 s+16dimAlb pCSE2.5	pCSE2.5-Vektor zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Schirrmann, Braunschweig
NiS #1-4 pCSE 2.5	Niklas Schuster, AG Nolte/Bannas

3.1.8 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller; Design
BGH rvs	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	Sigma-Aldrich Chemie
CMV fwd	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	Sigma-Aldrich Chemie
KP_mut_stop**_fwd	GTC TCC TCA GCG GCG TAA TAA AAA CTC ATC TCA GAA G	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte
KP_mut_stop**_rvs	T GTG ACC AGG GTA CCC TGT GAA GAA CGG CTT AAC GAG	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte

Material und Methoden

NiS_mut_stop**_fwd	CCA CAA CCA GCG GCC GCA TAA TAG CAT CAC CAT CAC GG	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte
NiS_mut_stop**_rvs	CC GTG ATG GTG ATG CTA TTA TGC GGC CGC TGG TTG TGG	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte
NotIALB11 pCSE2.5 for	TGC AGC GGC CGC CCG GTG GAG GCA GCG GTG	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte
36PciI pCSE2.5 for	TCG GAC ATG TCC CAG GTG CAA CTG	Eurofins Genomics; AG Bannas/Nolte

3.1.9 Proteine

Enzymname	Artikelnummer	Hersteller
DpnI	R0176S	New England Biolabs
NcoI	R0193S	New England Biolabs
NotI	R0189S	New England Biolabs
PciI	R0655S	New England Biolabs
PfuUltra™ Hotstart DNA Polymerase	600390	Agilent Technologies
Q5® Hot Start High Fidelity Polymerase	M0493S	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	M0202S	New England Biolabs

3.1.10 Puffer

Name	Art.-Nr. / Komposition	Hersteller
DPBS -/- (1x)	13190-094	gibco/Life Technologies
DPBS +/+ (1x)	14040-133	gibco/Life Technologies
Elution Buffer HIS	T-901-100, 250 nM Imidazol, PBS-/- (1x)	novex Life Technologies
Erythrozyten-Lyse Puffer pH=7,2	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 100 µM EDTA in Aqua deion.	AG Bannas/Nolte
IgG Elution Buffer, Pierce™	21004	Thermo Fisher Scientific
Kidney Digest RPMI-Puffer	5 % FCS, 0,25 mg/mL Kollagenase D, 10 u/mL DNaseI	Marten Junge, AG Nolte

Material und Methoden

NaCl 300 mM	17,53 g NaCl, 1 L Milli-Q®-Wasser	AG Bannas/Nolte
NEBuffer3.1 (10x)	B7203S	New England Biolabs
NuPAGE™ LDS Sample Buffer	NP0007	Invitrogen Life Technologies
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20x)	NP000202	Invitrogen Life Technologies
PBS pH 7.4 (10x)	70011-036	gibco/ Life Technologies
PfuUltra™ HF Reaction Buffer (10x)	600390	Agilent Technologies
Q5® Reaction Buffer	B9027S	New England Biolabs
Tris-Acetate-EDTA (TAE)-Buffer 50x	A1691,1000	PanReac AppliChem
Tris Buffer (1 M, pH 9.0) (IgG Neutralization Buffer)	G-786476	G-Biosciences
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	B0202S	New England Biolabs

3.1.11 Reagenzsysteme (Kits)

Name	Art.-Nr.	Hersteller
Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (AF647 NHS Ester)	A20173 (A20006)	Invitrogen Life Technologies
Alexa Fluor 680 Protein Labeling Kit	A20172	Invitrogen Life Technologies
BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific
Endofree Plasmid Maxi Prep	9237940	QUIAGEN
Mix2Seq Kit	-	Eurofins Genomics
Mix2Seq Kit Overnight	-	Eurofins Genomics
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.50	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	QUIAGEN

3.1.12 Versuchstiere

Mauslinie	Hersteller
NMRI nu/nu	Janvier Labs

3.1.13 Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Artikel-Nr.	Hersteller
96-well Mikrotiterplatten	Nunc™ MicroWell™ 96-	167008 (flat)	Thermo Fisher Scientific
	Well Mikrotiterplatten	163320 (u)	
	OptiPlate-96, White Opaque 96-well Microplate	6005299	PerkinElmer
Aktivkohlebeutel	AMRESCO Destaining bags	E732	AMRESCO
Chromatografie- Säulen	EconoPac® Disposable Chromatography Columns, 10 mL	7321010	Bio-Rad Laboratories
	gentleMACS C Tube, steril	130-096-334	
Einwegpipetten steril	Serologische Pipette (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	86.1252.025/	Sarstedt
		86.1253.025/	
		86.1254.025/	
		86.1685.020	
FACS-Röhrchen	Falcon 5 mL Rundbodenröhrchen	352052	BD Falcon
Filtereinheiten	SteriCup®	S2GPU05RE	Merck
		C3238	
Gel- Filtrationssäulen	PD-10 Columns Sephadex™ G-25M	11004179	GE Healthcare
Handschuhe	Dermagrip Nitril Blau Handschuhe Größe S/M/L	D1501-17/ D1502-17/ D1503-17	WRP, REMESCO
Petryschalen	Petri Dishes 94x16 / 125x20 mm, with vents	633180/ 639102	Greiner BioOne
Pipettenspitzen	Pipet tip stack pack (10 µL / 200 µL / 1000 µL)	70.1130.460/	Sarstedt
		70.760.502/	
		70.762.100	
Pipettenspitzen autoclav	epT.I.P.:S. Set (10 µL / 200 µL / 1000 µL)	003007629000 30076320 0030076346	Eppendorf
Protein-Konzen- trierungsfilter	Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters Ultracel 3 K / 10 K	UFC800324/ UFC801024	Merck Millipore

Material und Methoden

Reagiergefäße	Reagiergefäß 0,5 mL/1,5 mL/2 mL	72.699/72.690. 001/72.691	Sarstedt
SDS-Gele	NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel 10well	NP0301BOX	Invitrogen/novex Life Technologies
	NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel 12well	NP0302BOX	Invitrogen/novex Life Technologies
Serumröhrchen	S-Monovette	04.1954	Sarstedt
Verschlussfilm	Parafilm M	PM992	Bemis
Zellkultur- Flaschen	Nunc EasYFlask 225 cm ²	159934	Thermo Fisher Scientific
	T-175 Gewebekultur- Flaschen, Suspension	83.3912.502	Sarstedt
Zellsieb	Falcon Cell Strainer 70 µm	352350	BD Falcon
Zentrifugations- Röhrchen	15 mL/50 mL CELLSTAR® Polypropylene Tube	188261/ 227270	Greiner BioOne

3.1.14 Zellen

Ursprung	Name	Firma
Prokaryotisch	XL-1 blue (<i>E.coli</i>)	Stratagene, AG Bannas/Nolte
Eukaryotisch	CA-46	AG Nolte
	CA-46 luc	AG Nolte
	CA-46 luc CD38KO	AG Nolte
	CHO	AG Mittrücker
	HEK293-6E	Thomas Schirrmann, BS
	KMS-12-BM	AG Nolte
	NK-92 hCD16 CD38KO	AG Nolte
	LP-1	AG Nolte
	LP-1 luc	AG Nolte
	LP-1 luc CD38KO	AG Nolte
	RPMI-8226	AG Nolte
	YAC-1 luc HH (murin)	AG Nolte
	YAC-1 luc HH hCD38 (murin)	AG Nolte
	HOPA-Patientenproben	Hämatologisch-Onkologische Praxis Altona (HOPA), HH

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden jeweils 15 μL der aufgereinigten Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50-100 ng/ μL mit 2 μL des Sequenzierungs-Primers in einer Konzentration von 10 pmol/ μL (CMV fwd, BGH rvs, NotI ALB11 pCSE2.5for) gemischt und in ein entsprechendes Sequenzierungs-Röhrchen überführt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma eurofins, die Analyse erfolgte mithilfe des Programms 4Peaks.

3.2.1.2 Klonierung von HLE Nanobody-Dimeren

Die Klonierung der HLE Nb-Dimere JK2-JK2- αAlb , JK2-JK36- αAlb , JK36-JK2- αAlb und JK36-JK36- αAlb erfolgte im Wesentlichen wie folgt: PCR – Gel-Elektrophorese – Restriktionsverdau – Gelelektrophorese – Ligation – Transformation – Selektion – Mini-Prep – Retransformation – Selektion – Maxi-Prep. Als Vektor wurde das Plasmid FS #717 verwendet, als Insert diente die DNA der vier Plasmide NiS #1-4. NiS #1-4 enthält entsprechend der Reihenfolge die DNA der Nanobody-Dimere mit 15GS-Linker: JK2-JK2, JK2-JK36, JK36-JK2, JK36-JK36. FS #717 enthält die DNA für ein HLE Nb-Dimer bestehend aus s+16 dim und dem Nanobody Alb8. Die Restriktionsstellen sind wie folgt angeordnet: *NcoI* – s+16dim – *NotI* – 9GS – Alb8 – myc – his₆ – *XbaI*. Der Verdau mit *NcoI* und *NotI* führte zur Entfernung von s+16dim aus dem Zielvektor und ermöglichte die anschließende Insertion der Dimer-DNA aus NiS#1-4. Da die Restriktionsstellen in NiS#1-4 durch die von NiS angewandte Klonierungstechnik nicht für einen Verdau zugänglich waren (*Nco/PciI*), mussten die Inserts zunächst mithilfe der nachfolgend beschriebenen PCR aus den Plasmiden isoliert werden. Anschließend konnten die Inserts wie angegeben verdaut und in den Vektor-Backbone ligiert werden. Auch in den neu geschaffenen Plasmiden KP#1-4 ist die vordere Restriktionsstelle durch Kombination von *Nco/PciI* nicht mehr für einen Verdau zugänglich.

3.2.1.2.1 PCR

Die verwendeten Primer waren 36PciI pCSE2.5 for (fwd. Primer) und BGH rvs (rvs. Primer). Da der verwendete forward-Primer zwar optimal an JK36, aber nur mäßig gut an JK2 bindet, erwies sich zur Herstellung der HLE Nb-Dimere eine Touch-up-PCR in zwei Schritten als erfolgreiche Methode.

Hier wurde zunächst bei einer niedrigen Annealing-Temperatur genügend Template generiert und dieses anschließend bei einer höheren Temperatur spezifisch vermehrt. Verwendet wurden PCR-Ansätze von 50 μL mit folgender Zusammensetzung und Konzentration:

Komponente	Konzentration	Volumen
5x Q5-Buffer	(1x)	10 μ L
dNTPs (2mM each)	0,2 mM each	5 μ L
fwd. Primer (10 mM)	0,5 μ M	2,5 μ L
rvs. Primer (10 mM)	0,5 μ M	2,5 μ L
DNA-Template	10 ng	1 μ L
Q5-Polymerase	0,02 U/ μ L	0,5 μ L
Water for Chromatography	ad 50 μ L	28,5 μ L

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Info
1. Initialisierung	98 °C	30 sec	
2. Denaturierung	98 °C	10 sec	
3. Annealing	55 °C	30 sec	
4. Elongation	72 °C	30 sec	4x zurück zu 2.
5. Denaturierung	98 °C	10 sec	
6. Annealing	69 °C	30 sec	
7. Elongation	72 °C	30 sec	29x zurück zu 5.
8. Finalisierung	72 °C	10 min	

3.2.1.2.2 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ist eine Methode zur größenspezifischen Auftrennung des DNA-Strang-Gemischs. Zur Herstellung eines 1 % Agarose-Gels mit 150 nm Porengröße wurden 0,77 g Agarose in 77mL Elektrophoresepuffer (Tris-Acetate-EDTA-Puffer) gelöst, kurz aufgeköcht und nach kurzem Abkühlen auf ca. 60 °C zusammen mit 3 μ L Roti®-GelStain in eine Gelkammer gegossen. Ein Kamm zur Herstellung von Taschen wurde ca. 1 cm vom oberen Rand entfernt in das Gel gesteckt, bis sich die Matrix verfestigte. Das Gel wurde anschließend in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die zu untersuchenden Proben wurden nun mit 6x Loading Dye (LD) versehen. Der Mix aus 50 μ L Probe und 10 μ L 6xLD wurde in die vorgesehenen Taschen geben. Die Elektrophorese erfolgte 60 Minuten bei einer Spannung von 100 V. Als Comigrations-Standard war zuvor zudem eine 1 kb DNA-Leiter in eine der Taschen gegeben worden. Dies erlaubte die Identifikation des gewünschten DNA-Fragments, dessen Lage und anschließende korrekte Extraktion mithilfe eines Geldokumentations-Systems (ein mit einem Video-Image-System verbundener UV-Transilluminator) festgehalten wurde.

3.2.1.2.3 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA erfolgte mithilfe des Kits NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up entsprechend der Herstellerangaben. Hierbei konnte die bei 50 °C in Guanidiumthiocyanat gelöste DNA an eine Silica-Membran binden. Die aufgereinigte DNA wurde nach mehreren Wasch- und Trockenschritten in Wasser eluiert.

3.2.1.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mithilfe eines Mikrovolumen-Spektralphotometers (NanoDrop™) wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA quantifiziert. Bei einem Wellenlängenquotient (A260/280) zwischen 1,8 und 2 wurde hierbei von einer ausreichend reinen Probe ausgegangen.

3.2.1.2.5 Restriktionsverdau der aufgereinigten DNA

Als Vorbereitung auf die Ligation wurden im Restriktionsverdau Insert- und Vektor-DNA von Restriktionsendonukleasen an den für diese charakteristischen palindromischen Erkennungssequenzen geschnitten. Verwendet wurden Ansätze von 30 µL mit folgender Zusammensetzung und Konzentration:

Komponente	Konzentration	Volumen
Insert bzw.	Variabel	25 µL
Vektor	2 µg/25 µL + Aqua ad iniectionabilia ad 25 µL	25 µL
PciI bzw. NcoI	10.000 U/mL	1 µL
NotI	10.000 U/mL	1 µL
Puffer NEB3.1	(1x)	3 µL

Der Verdau wurde im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Verdau	36 °C	120 min
2. Enzyminaktivierung	65 °C	20 min

Die Ansätze wurden anschließend wie bereits beschrieben in ein zweites Agarose-Gel gegeben, die benötigten Banden wurden ausgeschnitten und ebenfalls aufgereinigt.

3.2.1.2.6 Ligation

Die nun linearisierte, aufgereinigte DNA von Vektor und Insert wurde im molaren Verhältnis von 1:3 gemischt und von einer Ligase unter optimalen Pufferbedingungen durch Verknüpfung des 3'-Hydroxy- mit dem 5'-Phosphat-Ende zu einem neuen Plasmidvektor verbunden. Verwendet wurden Ansätze von 20 µL mit folgender Zusammensetzung und Konzentration:

Komponente	Konzentration	Volumen
Ligasepuffer	(10x), Stock enthält 10 mM ATP	2 μ L
T4 DNA Ligase	400.000 U/mL	1 μ L
Vektor	150 ng (5000 bp)	x μ L
Insert	Molares Verhältnis zu Vektor = 3:1	x μ L
Aqua ad iniectabilia		ad 20 μ L

Für die Religationskontrolle wurde ein weiterer Ansatz ohne Insert hergestellt, es wurde entsprechend Aqua ad 20 μ L hinzugegeben. Die Ligation wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Verdau	16 °C	14 h
2. Enzyminaktivierung	65 °C	20 min

3.2.1.2.7 Transformation und Retransformation

Die chemisch kompetenten E. coli XL-1 blue Zellen wurden bei -80 °C gelagert und am Tag der (Re-)Transformation auf Eis aufgetaut. Als Transformationsansatz wurden 2 μ L des Ligationsansatzes, als Retransformationsansatz 1 μ L der Mini-Prep-Elution zu 40-50 μ L kompetenten XL-1 blue gegeben und > 20 min auf Eis inkubiert, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die kompetenten Zellen zu ermöglichen. Ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 Sekunden gefolgt von einer erneuten, zweiminütigen Inkubation auf Eis diente der Maximierung der Transformationseffizienz. Anschließend wurden die Ansätze in jeweils 450 μ L SOC Medium (42 °C warm) gegeben und für 60 min bei 800 rpm in den Heizblock gestellt. Die Hälfte des Ansatzes wurde auf jeweils einer LB-Carb-Agarplatte (100 μ g/mL Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht invertiert im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2.8 Selektion und Animpfen von Medium

Einzelne Klone wurden am Folgetag mit einer Impföse von der Platte gepickt und in einzelne Falcons à 5 mL Carb Medium (2xYT oder LB mit 100 μ g/mL Carbenicillin) gegeben. Die Falcons wurden nicht vollständig zugekehrt und in leichter Schräglage über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert. Bei der Retransformation wurde nur ein Klon in 100 mL Carb Medium (2xYT oder LB mit 100 μ g/mL Carbenicillin) gegeben, die Öffnung des Kolbens wurde mit Alufolie abgedeckt und der Kolben über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert. Die Agar-Platten mit den verbleibenden Klonen wurden mit Parafilm verschlossen und bis zur Fertigstellung der Maxi-Prep bei 4 °C gelagert.

3.2.1.2.9 Isolation von Plasmid-DNA über Mini- und Maxi-Prep

Die Isolation der Plasmid-DNA aus (re-)transformierten Bakterien erfolgte durch alkalische Lyse sowie anschließende Reinigung mithilfe des QIAprep Spin Miniprep bzw. Endofree Plasmid Maxi Kits entsprechend den Herstellerangaben. Die Klone wurden anschließend wie in 3.2.1.1 beschrieben sequenziert und die Klone mit richtiger Sequenz ermittelt. Diese wurden dann über Retransformation und Maxi-Prep vervielfältigt und wie in 3.2.2.3 beschrieben mithilfe der transienten Transfektion in HEK-Zellen produziert.

3.2.1.3 Klonierung von taglosen HLE Nb-Dimeren mittels Mutagenese-PCR

Ortsspezifische Mutagenese (*engl.* site-directed mutagenesis) dient der schnellen und zielgerichteten Modifikation, Insertion oder Deletion von DNA-Sequenzabschnitten innerhalb der Plasmid-DNA. Ziel meiner Mutagenese-PCRs war die Entfernung des Polyhistidin-(N-HHHHHH-C, kurz „his₆-“) sowie myc-Tags (N-EQKLISEEDL-C, N-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-C). Zu diesem Zweck wurden spezielle Primer entworfen, die durch punktuelle Veränderung auf Basenebene zu einer Umwandlung zweier Aminosäuren des Tags (Glu-Gln bzw. respektive His-His) in je ein Stop-Codon führten. Die Tags wurden somit aus dem Leserahmen für die codierte Aminosäuresequenz entfernt. Im Falle der ersten Mutagenese-PCR (für HLE Nb-Dimere) enthielt nur der forward-Primer, im Falle der zweiten Mutagenese-PCR (für „nackte“ Nb-Monomere und -Dimere) enthielten beide Primer die gewünschte Mutation. Letzteres erwies sich als die Methode der Wahl aufgrund einer größeren Ausbeute positiver Klone. Anschließend wurde das Original-Template durch Verdau mit *DpnI* entfernt. Verwendet wurden Ansätze von 50 µL mit folgender Zusammensetzung und Konzentration:

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Reaction buffer PFU Ultra HF (10x)	(1x)	5 µL
fwd. Primer_mut_stop**	125 ng	1,1 µL
rvs. Primer_mut_stop**	125 ng	1,1 µL
dNTPs (2 mM)	10 mM	5 µL
PFU UltraPolymerase	2,5 U/mL	1 µL
Water for Chromatography	ad 50 µL	35,8 µL

Die Mutagenese-PCR wurde im Thermocycler (TC) wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Info
1. Initialisierung	95 °C	30 sec	
2. Denaturierung	95 °C	30 sec	
3. Annealing	55 °C	1 min	
4. Elongation	68 °C	6 min	17x zurück zu 2.
5. Finalisierung	68 °C	7 min	
6. Pause	4 °C	∞	

Der anschließende Verdau mit DpnI wurde ohne Aufreinigung im TC wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Verdau	37 °C	60 min
2. Enzyminaktivierung	65 °C	20 min

Die Transformation erfolgte analog der zuvor beschriebenen Transformation in XL-1 blue. Auch hier wurde der gesamte Ansatz ausplattiert. Retransformation und Isolation der Plasmid-DNA wurde ebenfalls wie bereits beschrieben durchgeführt.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Die Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien wurden in RPMI Kompletmedium, die NK92 hCD16 CD38KO Zellen in α MEM Kompletmedium, und die HEK293-6E Zellen je nach Zelltyp in Freestyle- (Suspensionszellen) oder 70 % F17 Medium komplett und 30 % F17 Medium used (adhärente Zellen) kultiviert. Die Zellkulturen wurden alle zwei bis drei Tage bedarfsabhängig so passagiert (zwischen 1:2 und 1:10), dass die Myelom- und NK-Zellen in den Petryschalen für den Tag des Assays konfluent vorlagen; dies entsprach einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen /mL. Die HEK-Zellen sollten am Tag der Transfektion in den T75-Gewebekulturflaschen möglichst semi-konfluent vorliegen. Den Luciferase-transduzierten Zellen wurde zusätzlich bei jeder Teilung 0,1 mg/10mL Puromycin zugesetzt, um die Zellkultur reinzuhalten. Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II. Ein Mykoplasmentest erfolgte alle zwei Monate, Zellkulturen wurden regelmäßig auf ihre Markerexpression überprüft und wenn nötig frisch aufgetaut.

3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Zur Sicherung der Kultur wurden mindestens zwei Aliquots der Zellkultur in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurde bei Erreichen der exponentiellen Phase der Zellteilung etwa 1×10^7 Zellen aus der Zellkultur steril entnommen, bei 1600 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstands in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Ganze wurde in einen auf 4 °C vorgekühlten Cooler gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und im Stickstofftank gelagert. Alle sechs Monate erfolgte die Entnahme eines frischen Aliquots auf Trockeneis aus dem Stickstofftank. Die Zellkultur-Aliquots wurden im passenden vorgewärmten Komplett-Medium aufgetaut. Bei Erreichen der exponentiellen Phase wurde ein neues Aliquot entnommen, wie zuvor beschrieben eingefroren und die alte Kultur verworfen.

3.2.2.3 Transiente Transfektion von HEK293-6E Zellen

Zur Produktion meiner HLE Nb-Dimere wurde die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293-6E (DSMZ-Nr: ACC-305) herangezogen. Diese Zelllinie wurde mit einer verkürzten Version des Epstein-Barr-Kernantigens 1 (EBNA1, Klon 6E) transduziert, was ihnen zu einer erhöhten Produktionseffizienz verhilft. Die transiente Transfektion bewirkt eine Expression der gewünschten Proteine in den Zellen mit anschließender Abgabe in den Überstand (*Jäger et al. 2013*). Zur Vorbereitung wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion je nach Aussehen 1:7-1:10 geteilt. Am Tag der Transfektion wurden 20 µg der Plasmid-DNA im Expressionsvektor pCSE2.5 mithilfe von Polyethylenimin (PEI) unter optimalen Transfektionsbedingungen in die Zellen eingebracht. PEI ist ein stabiles kationisches Polymer, das über Komplexbildung mit der DNA zusammen mit hochmolarem NaCl eine Anlagerung an die negativ geladene Zellmembran der HEK-Zellen ermöglicht. Über Endozytose gelangt der Komplex dann ins Zytosol und nach Freisetzung in den Zellkern (*Elouahabi and Ruyschaert 2005*). Anschließend erfolgt die Proteinbiosynthese mit nachfolgender Abgabe der Proteine in den Überstand.

Für die Transfektion wurde ein PEI-Mix, bestehend aus 7,5 mM PEI, Aqua und 300 mM NaCl, sowie ein DNA-Mix, bestehend aus 20 µg DNA mit Aqua und 300 mM NaCl erstellt. Anschließend wurde der PEI-Mix vorsichtig in gleichen Teilen auf den DNA-Mix getropft und nach 30 Minuten Inkubation auf die Zellen gegeben. Im Falle der Transfektion von adhärenenten HEK-Zellen war das Kulturmedium bereits eine Stunde zuvor durch Transfektionsmedium ohne FCS und Geneticin ersetzt worden. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte in TC-Flaschen T75 die Zugabe von 500 µL Feeding Medium, je nach Zelltyp F17- oder Freestyle Feeding Medium mit 20 % Trypton. Sechs Tage nach Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert und steril filtriert.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 SDS-Page

Mittels SDS-PAGE wurde der Erfolg der Produktion vor entsprechender Aufreinigung überprüft. Hierzu wurde zunächst der Überstand der Produktion neben einem Standardmarker mit bekannter Molekülgröße (Albumin 1 µg–65 kDa, IgH 0,5 µg–50 kDa, IgL 0,25 µg–25 kDa, Lysozym 0,1 µg–14 kDa) aufgetragen. Durch Anfärbung mit Coomassie konnte das Vorhandensein einer breiten Bande mit erwarteter Molekülgröße bestätigt werden. Zur Separation des Nanobody-Fusionsproteins von anderen Zellbestandteilen aus dem Überstand folgte anschließend die Aufreinigung über Nickel-NTA- oder Protein A-Säulen.

3.2.3.2 Protein-Aufreinigung von Zellüberständen über Ni-NTA-Säulen

Histidin bindet spezifisch an Nickel-Ionen. (HLE) Nanobody-Dimere mit myc-his₆-Tag konnten aufgrund ihrer Histidin-Markierung folglich über Nickel-NTA-Säulen aus dem Überstand aufgereinigt werden. Die Säulen wurden mit 2 mL Ni-NTA gefüllt und mit einem Filter versehen. Anschließend wurde mit 10 mL PBS -/- gewaschen. Die HEK293-6E Zellüberstände wurden auf die Säule gegeben; dann wurde die Säule erneut mit 10 mL PBS -/- gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein in drei Fraktionen à 1 mL, 2,5 mL und 2,5 mL mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert. Die Säule wurde nach weiteren Waschschritten in PBS -/- mit 20 % vergälltem Ethanol gelagert. Die beiden Eluate à 2,5 mL (E2 und E3) wurden über PD-10-Säulen umpuffert. Hierzu wurden die Säulen zunächst mit dem gewünschten Puffer (PBS ++ oder PBS -/- mit 5 % Glycerol) equilibriert und nach Zugabe von E2 bzw. E3 in 3,5 mL des gewünschten Puffers eluiert. Zuletzt wurde das aufgereinigte Protein über Amicon Ultra Zentrifugalfilter 10.000 NMWL aufkonzentriert.

3.2.3.3 Protein-Aufreinigung von Zellüberständen über Protein-A-Säulen

Protein A ist ein Protein aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* mit der Fähigkeit, die Fc-Region der Immunglobuline, vor allem von IgG, zu binden. Mithilfe von Protein-A wurden alle Nanobody-Fusionsproteine mit humanem IgG1 aufgereinigt.

Da bei den (HLE) Nanobody-Dimeren im Zuge dieser Arbeit der his₆-Tag bei der Mutagenese-PCR entfernt wurde, konnten die Nanobody-Fusionsproteine infolgedessen nicht mehr über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt werden. Das Alignment mit der Protein-A-bindenden VH 5I1D (früher: 3qos) zeigt, dass in JK36 ebenfalls die an der Kontaktfläche mit Protein A liegenden Aminosäuren konserviert sind. JK2 hat die Substitution S82bN, die die Aufreinigung über Protein A jedoch nicht zu behindern scheint. Die Nanobody-Konstrukte ohne myc-his₆-Tag konnten folglich genau wie unsere Fc-Konstrukte über Affinitätschromatographie an Protein-A-Säulen aufgereinigt werden. Die Säulen wurden mit 2 mL Protein A gefüllt und mit einem

Filter versehen. Anschließend wurde mit 10 mL PBS +/- gewaschen. Die HEK-Zellüberstände wurden auf die Säule gegeben; anschließend wurde die Säule erneut mit 10 mL PBS +/- gewaschen. Vor Elution des Proteins in drei Fraktionen à 1,2 mL, 2,5 mL und 2,5 mL mit Elutionspuffer (IgG Elution Buffer, pH 2,8) wurden die Auffangfalcons mit Neutralisationspuffer versehen (Tris-Puffer 1 M pH 9, Verhältnis 1:10). Die Säule wurde nach weiteren Waschschrinen in PBS +/- mit 20 % vergälltem Ethanol gelagert. Die beiden Eluate à 2,5 mL (E2 und E3) wurden über PD-10-Säulen umgepuffert. Hierzu wurden die Säulen zunächst mit dem gewünschten Puffer (PBS ++ oder PBS +/- mit 5 % Glycerol) equilibriert und nach Zugabe von E2 bzw. E3 in 3,5 mL des gewünschten Puffers eluiert. Zuletzt wurde das aufgereinigte Protein über Amicon Ultra Zentrifugalfilter 10.000 NMWL aufkonzentriert.

3.2.3.4 Quantifizierung von Proteinen mittels BCA-Tests

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Aufreinigung erfolgte in 1:5- und 1:10-Verdünnung kolorimetrisch mithilfe eines BCA-Kits. Hierbei wurde bei jeder Messung eine Eichgerade aus einer bekannten Verdünnungsreihe von BGG (bovinem Gammaglobulin) erstellt, indem die Konzentration photometrisch mitbestimmt wurde. Anhand der Eichgeraden ließ sich dann die Konzentration der aufgereinigten Nb-Fusionsproteine bestimmen.

3.2.4 Immunologische Methoden *in vitro*

3.2.4.1 Bindungsversuch

Zum Nachweis der HLE Nb-Dimer-Bindung an LP-1 luc Zellen wurden je 1×10^5 LP-1 luc bzw. LP-1 luc CD38KO Zellen mit den HLE Nb-Dimeren JK2-JK2- α Alb, JK2-JK36- α Alb, JK36-JK2- α Alb und JK36-JK36- α Alb für 10 min bei 4 °C inkubiert. Zudem wurden je 1×10^5 LP-1 luc Zellen vor Zugabe der HLE Nb-Dimere 10 min mit Daratumumab^{AF647} inkubiert. Die Proben wurden zweimal zentrifugiert (1600 rpm, 4 °C, 5 min), in PBS + 0,2 % BSA resuspendiert und für weitere 20 min bei 4 °C mit mAb77 (anti-Alb8) inkubiert. Nach erneuter zweimaliger Waschung erfolgte die Anfärbung des murinen Fc durch einen Maus IgG1-spezifischen, BV421-konjugierten Sekundärantikörper. Die Intensität der Bindung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Detektionssystem diente die Antikörperkette α Alb > mAb 77 > α mIgG1-BV421. In diesem Versuch fehlt die Positivkontrolle, die die Hemmung der Bindung eines HLE Nb-Dimers nach Vorinkubation mit Daratumumab belegt. Diese Kontrolle konnte in Ermangelung eines HLE Nb-Dimers, welches analog zu Daratumumab Epitop 1 bindet (z.B. WF211-WF211- α Alb) leider nicht durchgeführt werden.

3.2.4.2 Markerexpression

Für die Analyse der Markerexpression wurden je 1×10^5 CD38⁺ Zellen für 20 min bei 4 °C mit im Überschuss hinzugegebenem CD38-spezifischen Nanobody JK36-AF647, α CD55-PE oder α CD59-PE sowie Pacific Orange (PacO) inkubiert. Als Hintergrundkontrolle dienten ungefärbte CD38⁺ Zellen. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch (n=3).

Nach Gating auf lebende Zellen wurde die MFI der angefärbten Zellen quantifiziert.

3.2.4.3 Zytotoxizitätsassays

3.2.4.3.1 CDC

Für die CDC-Assays wurden, sofern nicht anders angegeben, in 96-well Platten Triplikate von 100 nM Antikörper/hcAb/HLE Nb-Dimer oder einer Kombination aus Antikörper + hcAb (50 nM + 50 nM) bzw. Antikörper + HLE Nb-Dimer (100 nM + 100 nM) vorinkubiert. Die molaren Angaben beziehen sich hierbei auf 200 μ L Endvolumen. Die unterschiedlichen Stoffmengenkonzentrationen ergaben sich aus der Zielsetzung, eine vergleichbare Menge an Effektorfunktion-vermittelndem Fc-Fragment einzusetzen. Der Mix wurde mit 50 μ L 3×10^6 Zellen /mL vermischt und nach zehnminütiger Inkubation auf Eis mit 12,5 % nativem oder hitzeinaktiviertem Serum (56 °C, 30 min) versehen. Im Titrationsassay (**Abb. 19**) wurde die molare Masse wie angegeben alterniert.

Die Assays wurden 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 90 min wurden die Proben zweimal zentrifugiert (1600 rpm, 4 °C, 5 min) und in PBS + 0,2 % BSA resuspendiert. Dieser Vorgang der Zentrifugation und anschließenden Resuspension wird im Folgenden als Waschen bezeichnet. Anschließend wurden die Zellen je nach Fragestellung entweder mit Propidiumiodid (PI, 1:300) gefärbt und für 15 min auf Eis im Dunkeln gelagert oder mit Pacific Orange (PacO) als Lebend-Tot-Farbstoff und weiteren Färbeantikörpern (meist CD38) für 30 min dunkel bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mittels FACS Celesta. Durch Komplementfaktoren lysierte Zellen sind durch ihre geringere Größe (niedrigerer FSC-A, niedrigerer SSC-A), den Verlust von GFP, sowie eine stärkere DNA-Färbung gut von vitalen Zellen zu unterscheiden. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit FlowJo und GraphPad Prism.

3.2.4.3.2 ADCC

Für die ADCC-Assays wurden Triplikate mit 100 nM Antikörper-Mix (bezogen auf 200 μ L Endvolumen) in 100 μ L α MEM vorgelegt und mit 50 μ L 3×10^6 Zellen /mL in 96-well Platten vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Ansätze mit 50 μ L NK92 hCD16 hCD38KO Zellen (9×10^6 Zellen /mL) mit einer Effektor-zu-Target-Ratio von 3:1 vermischt. Die Assays wurden 150 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 90 min wurden die Proben zweimal zentrifugiert (1600 rpm, 4 °C, 5 min) und in PBS + 0,2 % BSA resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Luciferin Working Solution (150 µg/ml Luciferin in PBS -/-) versehen und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Nach anschließender zweimaliger Waschung wurden die Proben am VIKTOR3 Multilabel Reader gemessen. Die verwendeten LP-1 luc Zellen waren in Vorarbeiten mit Luciferase und GFP cotransduziert worden. Die Luciferaseaktivität in den Zellen ermöglicht eine Viabilitätsanalyse der Zellen via Biolumineszenzmessung. Ursächlich hierfür ist die ATP-abhängige Umwandlung von D-Luciferin in Oxiluciferin, bei der ein Photon emittiert wird. Im Rahmen des einsetzenden Zelltods führt die zunehmende Permeabilisierung der Zellmembran zu einem ATP-Ausstrom. Tote Zellen haben keinen Stoffwechsel mehr, produzieren folglich auch kein ATP und weisen somit keine Luciferaseaktivität auf. Die Verringerung der emittierten Photonen in der Luciferasemessung ist folglich proportional zum Zelltod. Der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle wurde mit der folgenden Formel berechnet:
$$\text{Vitale Zellen [\%]} = \frac{BLL_{Probe}}{\Delta BLL_{L-15hcAb}} * 100$$
.

3.2.4.4 Komplementbindungs-Assays

C1q ist der erste Faktor in der Komplementkaskade. Da C1q auch in hitzeinaktiviertem Serum vorhanden ist, können C1q-Bindungs-Assays mit hitzeinaktiviertem Serum erfolgen. Aufgrund der hitzebedingten Proteindenaturierung der übrigen Komplementfaktoren bricht die Komplementkaskade nach C1q-Bindung ab; diese kann also isoliert betrachtet werden.

3.2.4.4.1 C1q-Bindungs-Assay

Für die C1q-Bindungs-Assays wurden in 200 µL Endvolumen ähnlich des CDC-Assays 100 nM Antikörper und/oder hcAb oder eine Kombination aus Antikörper + HLE Nb-Dimer (100 nM + 100 nM) in 125 µL PBS + 0,2 % BSA in 96-well Platten vorgelegt, mit 50 µL 3×10^6 Zellen /mL vermischt und für 10 min vorinkubiert. Je nach Versuchsaufbau wurde danach 12,5 % natives oder hitzeinaktiviertes Serum (56 °C, 30 min) hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 60 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Im Anschluss wurden die Proben gewaschen, mit anti-C1q FITC (1 µL in 200 µL PBS + 0,2 % BSA) sowie PacO angefärbt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und zweimal gewaschen. Die Intensität der Bindung (FI) wurde nach Ausschluss von Debris (Zelltrümmern) durchflusszytometrisch über den Nachweis von C1q am FACS Celesta quantifiziert.

3.2.4.4.2 C3-Bindungs-Assay

Der Nachweis des Komplementfaktors C3 kann nur in nativem Serum erfolgen. Für die C3-Bindungs-Assays wurden analog der C1q-Assays in 200 µL Endvolumen 100 nM Antikörper-Mix in 125 µL PBS + 0,2 % BSA in 96-well Platten vorgelegt, mit 3×10^6 Zellen /mL (50 µL) vermischt und für 10 min vorinkubiert. Je nach Versuchsaufbau wurde anschließend 12,5 % natives oder hitzeinaktiviertes Serum (56 °C, 30 min) hinzugegeben.

Anschließend erfolgte die Inkubation für 20 bzw. 60 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 90 min wurden die Proben gewaschen, mit anti-C3 PE (1 µL in 200 µL PBS + 0,2 % BSA) sowie PacO angefärbt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die Intensität der Bindung (FI) wurde nach Ausschluss von Debris durchflusszytometrisch über den Nachweis von C3 am FACS Celesta quantifiziert.

3.2.4.5 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz vereinzelter CDC-Ergebnisse wurde mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben mit gleicher Varianz überprüft. Die eingesetzten Kombinationen aus Antikörper und HLE Nb-Dimer wurden paarweise innerhalb des CDC-Assays verglichen. Zunächst wurden die Stichproben mithilfe des F-Tests auf Varianzgleichheit überprüft. Bei einem p-Wert > 0,05 wurde von Varianzgleichheit ausgegangen und im Anschluss der zweiseitige t-Test angewandt. Ergab sich hier eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$), d.h. war der errechnete T-Wert größer als der kritische T-Wert, wurde die Nullhypothese H_0 „Es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen“ verworfen.

Die statistische Analyse wurde mit Graph Pad Prism (Version 9.5.1) durchgeführt.

3.2.5 Kopplung von Nanobody-Fusionsproteinen an den Nah-Infrarot-Farbstoff Alexa Fluor 680 und Präanalytik für *in vivo*-Bildgebungsversuche

3.2.5.1 Kopplung

Für die *in vivo* Bildgebungsversuche wurden taglose (*engl.* tagless) Nb-Fusionsproteine an den Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 konjugiert. Den Herstellerangaben zufolge reagieren die Fluorochromfarbstoffe über einen Succinimidylester-Rest mit primären Aminengruppen auf Histidin und Glycin des Antikörpers bzw. Nanobody-Fusionsproteins. Endprodukte der Reaktion sind stabile Farbstoff-Protein-Konjugate. Die Kopplung wurde gemäß Protokoll von Invitrogen durchgeführt. Wie im Kapitel 3.2.2.3 „Transiente Transfektion von HEK293-6E Zellen“ beschrieben, wurde auch hier die Reinheit der Fluorochromkopplung durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

Zusätzlich wurde eine NIRF-Aufnahme desselben Gels mithilfe des IVIS200 angefertigt, um über ein AF680-positives Signal den Konjugationserfolg nachzuweisen.

Zur Quantifizierung des Konjugationserfolgs ermittelt man zudem den Degree of Labeling (DOL), welches die Fluorochromkonzentration pro Antikörper angibt.

Hierzu wurde zunächst die Absorption nach der Kopplung bei 280 und 680 nm (Cy5.5) photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für AF680 und der Korrekturfaktor für AF680 auf die photometrische Messung bei 280 nm entstammen dem Kit-Protokoll.

Der Extinktionskoeffizient für das HLE Nb-Dimer JK2-JK36- α Alb** wurde auf der Website <http://web.expasy.org/protparam> anhand der Aminosäuresequenz berechnet.

Anschließend wurde der Degree of Labeling (DOL) mit der im Protokoll des Kits angegebenen Formel mit den angegebenen Werten wie folgt bestimmt:

Absorption HLE Nb-Dimer bei 280 nm: 0,432 cm⁻¹, bei 680 nm: 0,507 cm⁻¹

Korrekturfaktor für AF680: 0,05

Verdünnungsfaktor: 1

Extinktionskoeffizient AF 680: 184000 cm⁻¹M⁻¹

Extinktionskoeffizient HLE Nb-Dimer (expasy): 68675 cm⁻¹M⁻¹

$$c_{\text{Protein}} = \frac{A_{280} - (A_{\text{AF680}} * \text{Korrekturfaktor})}{\text{Extinktionskoeffizient}_{\text{HLE-Dimer}}} = \frac{0,432 \text{ cm}^{-1} - (0,507 \text{ cm}^{-1} * 0,05)}{68675 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}} = 5,9 * 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{DOL} = \frac{A_{\text{AF680}}}{\text{Extinktionskoeffizient}_{\text{AF680}} * c_{\text{Protein}}} = \frac{0,507 \text{ cm}^{-1}}{184000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} * 5,9 * 10^{-6} \text{ M}} = 0,47$$

Ein DOL von 0,47 entspricht folglich in etwa einer Kopplung von 50 % der HLE Nb-Dimere.

3.2.5.2 Immunhistologischer Nachweis der CD38-spezifischen Anfärbung

Im Rahmen eines Second Track-Praktikums wurden CHO-Zellen von Birte Albrecht und Gudrun Dubberke mit hCD38 und GFP kotransfiziert. Der Nachweis des an CD38-bindenden HLE Nb-Dimers JK2-JK36- α Alb erfolgte mittels Immunfluoreszenzanalyse im AF680-Kanal mittels EVOS FL Cell Imaging System.

3.2.5.3 Spezifische Zellanfärbung mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Vorbereitend für die *in vitro* Experimente wurden 100 μ L YAC-1 luc und YAC-1 luc hCD38 Zellen in ein gemeinsames Röhrchen gegeben und mit 1 μ L JK2-JK36- α Alb**-AF680 bei 4 °C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal gewaschen und die Intensität der Färbung wurde durchflusszytometrisch am FACS Canto II gemessen. Vor der Messung wurden gegenüber der Grundeinstellung zwei Filter (660/20 blauer Laser mit 670LP roter Laser) sowie zwei Spiegel (685LP blauer Laser mit 735LP roter Laser) ausgetauscht.

3.2.5.4 Antigenbindung bei Raumtemperatur

5×10^4 Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit einem Überschuss des AlexaFluor⁶⁸⁰-konjugierten Monomers, HLE Nb-Dimers oder Daratumumab (je 1 µL) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Verlust der zellassozierten Fluoreszenz nach 240 min bei Raumtemperatur durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ ein Aliquot CD38-exprimierender YAC-1 luc Zellen (eFluor450-markiert) als Bindungspartner für die dissoziierten Konstrukte in die Mischung gegeben. Die Proben wurden im direkten Anschluss ohne weiteren Waschvorgang durchflusszytometrisch am FACS Canto II analysiert.

3.2.6 Immunologische Methoden *ex vivo*

3.2.6.1 Patientenproben

Die verwendeten Knochenmarkaspirate stammten von Patienten, bei denen bei Verdacht auf eine vorliegende Myelomkrankung eine Knochenmarkpunktion zu diagnostischen Zwecken durchgeführt wurde. Nach Zustimmung der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg sowie informierter Einwilligung des Patienten wurden für unsere Versuche zusätzlich 10 mL Knochenmark in eine Spritze mit vorgelegten 2 mL EDTA (1,107 % Dinatrium-EDTA-Lösung) aspiriert. Die Knochenmarkpunktionen wurden von Ärzten der Hämatologisch-Onkologischen Praxis Altona (HOPA) durchgeführt.

Für die *ex vivo* CDC-Assays wurden mononukleäre Zellen mittels Dichtegradient aus dem Knochenmarkaspirat gewonnen und auf ihre Expressionsmarker untersucht. Hierzu wurden die Proben in unserem Labor 1:1 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und vorsichtig auf 15 mL Ficoll pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 40 min bei 4000 rpm und 4 °C (vordere Bremse 4, hintere Bremse aus) zentrifugiert.

Nach Zentrifugation wurde die Interphase mit mononukleären Zellen isoliert, erneut im Verhältnis 1:1 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Die Erythrozyten-Lyse wurde nach 5 min durch Hinzugabe von 15 mL PBS + 0,2 % BSA abgebrochen, das Zellgemisch erneut für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 mL resuspendiert und die Zellkonzentration in einer Zählkammer bestimmt. Die Zellkonzentration wurde auf 5×10^6 /mL eingestellt, je 50 µL Zellen wurden anschließend auf vorgelegte Panel gegeben. Diese setzten sich wie folgt zusammen: CD38 [R670-30 (APC)], CD45 [V780-60 (BV785)], CD138 V780-60 [B530-30 (FITC)], CD56/CD269/CD319 [B780-60 (PE-Cy7)], CD19 [B695-40 (PE-Cy5)] sowie Pacific Orange [V525-50 (PacO)].

Nachfolgend wurde das Zellgemisch für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Enthielt das Panel über 2 % CD38+/CD138+ Myelomzellen, erfolgte der CDC wie oben beschrieben mit der hier im Vergleich zu den Zellkulturversuchen aufgrund des Zellgemischs höher eingestellten Zellzahl von 5×10^6 /mL. Nach 90 min Inkubation und zweimaligem Waschen erfolgte die Anfärbung für 30 min bei 4 °C mit dem geeignetsten Panel. Die anschließende Analyse erfolgte durchflusszytometrisch mit Detektion der CD38+/CD138+ Zellpopulation, die Auswertung mittels FlowJo.

3.2.7 Targeting-Versuch *in* und *ex vivo*

3.2.7.1 YAC-1 Tumorwachstum in NMRI^{nu/nu} Mäusen

Für die Targeting-Experimente wurden NMRI^{nu/nu}-Mäusen in CO₂/O₂-Narkose murine YAC-1 luc Tumorzellen subkutan injiziert. Hierzu wurden $1,5 \times 10^6$ YAC-1 luc hCD38 (CD38+, GFP+, Positivtumor) bzw. $1,75 \times 10^6$ YAC-1 luc Zellen (CD38-, GFP+, Negativtumor) in einer Suspension aus 100 µL RPMI pur Medium mit 100 µL Matrigel (Aliquots LeS aus Gottliebsohn) aufgenommen und den Mäusen im Bereich der linken (-) bzw. rechten (+) Schulter injiziert. Die höher gewählte Konzentration der Zellen des Negativtumors basierte auf der Grundidee, die geringere Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auszugleichen. Das Allograft-Modell war in Vorarbeiten für die *in vivo* Bildgebung etabliert worden. Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurden die Tiere eine Woche vor geplanter *in vivo* Bildgebung (am Vortag der Tumor-Injektion) auf eine Alfalfa-freie Diät umgesetzt.

3.2.7.2 *In vivo* Bildgebung

Sieben Tage nach der Tumor-Inokulation wurde zwei Mäusen je eine Dosis von 15 µg JK2-JK36- α Alb^{**}-AF680 i.v. in die Schwanzvene injiziert, zwei Mäusen wurde je eine Dosis von 5 µg JK36^{**}-AF680 injiziert und einer fünften Maus wurde nichts injiziert (Kontrolle). Das NIRF-Imaging wurde vor, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 h nach Injektion durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse zunächst über einen Vernebler mit Isofluran sediert, das NIRF-Imaging wurde anschließend mit Hilfe von Michael Horn-Glander im IVIS 200 durchgeführt. Die Filtereinstellungen entsprachen dem Cy5.5-Setting analog zu Vorarbeiten der AG Nolte (Lenz 2016): 615-665 nm zur Exzitation, 695-770 nm zur Emission und 580-610 nm für die Hintergrundkorrektur der Emission. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Living Image 4.5.2. Hiermit wurden neben der Anfertigung der Overlays (Original- und Hintergrundaufnahme) auch ROIs (region of interest) auf den Bereich des CD38-positiven und CD38-negativen Tumors gelegt und so quantitativ die totale Fluoreszenzintensität bestimmt.

3.2.7.3 Ex vivo Bildgebung

Während des Versuchs erhielten die Mäuse zwei Mal eine i.p. Injektion von 6 mg Luciferin in 200 µl PBS. Die erste Injektion erfolgte 48 h vor Beginn des Experiments, das anschließende BLI diente der Verifizierung des gleichmäßigen Tumorwachstums. Die zweite Injektion erfolgte im Anschluss an die letzte Messung, die *ex vivo* angefertigten Biolumineszenz-Bilder dienten durch Nachweis der injizierten Tumorzellen der Korrelation mit der Fluoreszenzbildgebung. Im Anschluss wurden die Tiere in Sedierung durch Genickbruch getötet. Über Punktion der linken Herzkammer wurde Blut entnommen. Danach wurden die Tumoren aus dem Bereich der linken sowie rechten Schulter exzidiert und folgende Organe entnommen: Herz, Leber, Milz, Nieren, Magen und Darm sowie ein Stück Muskel (linker Hinterlauf). Diese wurden auf einer schwarzen Unterlage angeordnet und erneut mit den Einstellungen des *in vivo* Versuchs im IVIS200 gemessen.

3.2.7.4 Ex vivo Tumoranalyse

Nach der Bildgebung wurde jeder Tumor mit einem Skalpell halbiert, die eine Hälfte wurde für die FACS-Messung in gekühltes PBS -/- gegeben, die andere Hälfte wurde in gekühlte 4 % PFA-Lösung gegeben.

3.2.7.4.1 FACS

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die soliden Tumore separat in eine Zellsuspension gebracht. Dafür wurde jeder Tumor in 1 mL PBS -/- gegeben und mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurden 5 mL Kidney Digest hinzugegeben und die Lösung in ein gentleMACS c-Tube überführt. Das Gewebe wurde mithilfe des gentleMACS™ Octo Dissociator in den Tubes über mechanischen und enzymatischen Verdau homogenisiert. Hierfür wurde das Sample für je 15 min zunächst auf mittlerer Stufe (mSpleen1.01), anschließend auf hoher Stufe (mLung2.01) für 15 min bearbeitet.

Dann wurde die Suspension in ein Falcon-Tube gegeben, mit 9 mL PBS -/- (4 °C) auf 15 mL aufgefüllt, durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 5 mL Percoll (40 % in PBS) resuspendiert und über einen Dichtegradienten 20 min bei 1400 rpm und 14 °C (vordere und hintere Bremse aus) zentrifugiert. Die Percoll-Phase wurde abgetragen und die Zellen in 3 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach drei Minuten wurde die Lyse-Reaktion mit 10 mL PBS + 0,2 % BSA gestoppt, die Samples wurden erneut zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, 4 °C) und in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert.

Die Zellen wurden im Anschluss für 30 min bei 4 °C mit PacO („*in vivo*“) oder PacO und einem Überschuss des im *in vivo* Versuch verwendeten HLE Nb-Dimers („*ex vivo*“) im Dunkeln nachgefärbt. Die Ergebnisse wurden am FACS Canto II mit angepassten Filtereinstellungen für Cy5.5 analysiert. Die Tumorzellen waren durch ihre GFP-Positivität gut von anderen Mauszellen zu unterscheiden.

3.2.7.4.2 Mikroskopie

Die verbleibende Hälfte der Tumoren wurde in PFA fixiert und anschließend durch Susanne Krasemann (Mauspathologie Facility) in Paraffin eingebettet, geschnitten und die 2 µm dicken Schnitte mit DAPI angefärbt. Die Schnitte wurden anschließend unter dem ApoTome der UMIF des UKE in verschiedenen Vergrößerungen (5x/0.16, 20x/0.8) untersucht. Die Bildakquise erfolgte via AxioCAM HR3 mit der folgenden Belichtungszeit in den entsprechenden Kanälen: DAPI 800 ms, Cy5.5 (JK2-JK36-αAlb) 40.000 ms.

3.2.7.4.3 Mauserum

1×10^5 CA-46 Zellen wurden mit 9 % Mauserum (vol/vol) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden CA-46 Zellen ohne Serum mit 9 % PBS + 0,2 % BSA eingesetzt. Im Anschluss wurden die Samples am FACS Canto II durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit der Software Flow Jo.

Sämtliche Abbildungen dieser Doktorarbeit wurden in Adobe Illustrator erstellt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in vier Teilen vorgestellt.

Der erste Teil behandelt die Klonierung, Produktion und Aufreinigung von rekombinanten CD38-*biparatopischen* (JK2-JK36- α Alb, JK36-JK2- α Alb) und CD38-*bivalenten* HLE Nanobody-Dimeren (JK2-JK2- α Alb, JK36-JK36- α Alb). Diese Konstrukte werden mit etablierten Methoden rekombinant in HEK-6E Zellen produziert, aufgereinigt und an Fluorochrome (Alexa Fluor 680) konjugiert.

Der zweite Teil beschreibt CD38-exprimierende Tumorzelllinien und die Ergebnisse von Untersuchungen über ihre Sensitivität gegenüber der komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC). Dabei wird *in vitro* die Hypothese geprüft, dass HLE Nanobody-Dimere die Effektivität des CDC durch Kreuzvernetzung Antikörper-beladener CD38 Moleküle auf der Zelloberfläche verstärken können.

Im dritten Teil wird die zytotoxische Wirkung ausgewählter Nanobody-Fusionsproteine in Kombination mit Daratumumab mit den etablierten CDC-Assays *ex vivo* an primären Knochenmarkzellen von Patienten mit Multiplem Myelom überprüft.

Im vierten und letzten Teil wird die Fähigkeit der HLE Nanobody-Dimere, CD38⁺ Tumorzellen *in vivo* zu erreichen, in einem Allograft-Mausmodell (Luciferase-transfizierte YAC-1 Zellen) mittels eines *in vivo* Imaging-Systems (IVIS 200) überprüft. Die Opsonierung der Tumorzellen mit den injizierten HLE Nb-Dimeren wird *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie überprüft.

4.1 Klonierung und rekombinante Produktion von *biparatopischen* und *bivalenten* HLE Nanobody-Dimeren

Nanobodies können aufgrund ihrer hohen Stabilität und guten Löslichkeit über Linkerpeptide zu Dimeren verknüpft werden. Die Verknüpfung zweier identischer Nanobodies oder zweier Nanobodies, die an dasselbe Epitop binden, ergibt ein *bivalentes* Konstrukt. Die Verknüpfung zweier Nanobodies, die an unabhängige Epitope desselben Antigens binden, ergibt ein *biparatopisches* Konstrukt.

Eine solche Dimerisierung (**Abb. 1**) erhöht die Avidität (Bindungsstärke) an das Tumorantigen. Die zusätzliche Verknüpfung mit einem Albumin-spezifischen Nanobody vermittelt die Bindung an Albumin und führt durch Verzögerung der renalen Filtration zu einer Erhöhung der *in vivo* Halbwertszeit (HLE = half-life extended). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden CD38-spezifische Nanobodies aus immunisierten Lamas gewonnen, die an drei unterschiedliche Epitope auf CD38 binden (*Schriewer et al. 2020*) (**Abb. 6A+B**).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vier verschiedene CD38-spezifische HLE Nanobody-Dimere hergestellt (**Abb. 5**):

JK2-JK2- α Alb (*bivalent*), JK2-JK36- α Alb (*biparatopisch*), JK36-JK2- α Alb (*biparatopisch*), JK36-JK36- α Alb (*bivalent*).

Die beiden CD38-spezifischen Nanobodies sind über einen 15 Aminosäuren langen (G₄S)₃-Linker miteinander zu Dimeren verbunden (*Schuster 2021*). Diese Nanobody-Dimere wurden über einen zweiten flexiblen Aminosäurelinker (G₄SG₃S) mit dem Albumin-spezifischen Nanobody Alb8 fusioniert, da für therapeutische und bildgebende Anwendungen eine lange *in vivo*-Halbwertszeit vorteilhaft sein könnte.

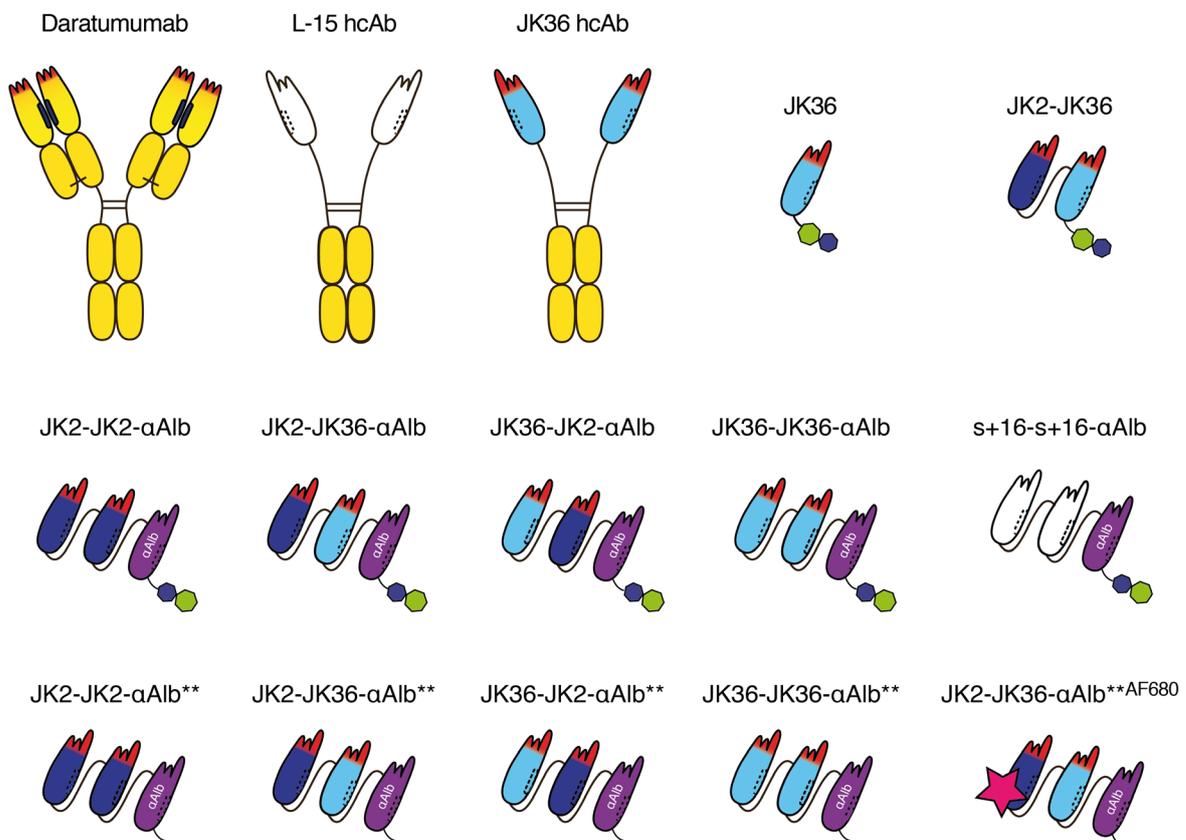


Abbildung 5 | Darstellung der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Antikörper, Nanobody-Fusionsproteine sowie der klonierten HLE Nb-Dimere und ihrer Varianten

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden vier verschiedene CD38-spezifische HLE Nanobody-Dimere durch Klonierung hergestellt: JK2-JK2- α Alb (*bivalent*), JK2-JK36- α Alb (*biparatopisch*), JK36-JK2- α Alb (*biparatopisch*), JK36-JK36- α Alb (*bivalent*). Mittels Mutagenese-PCR wurde der myc- sowie his₆-Tag entfernt, um taglose (*engl.* tagless) Nanobodies zu generieren (**). Für die bildgebenden Versuche wurden taglose Nanobody-Konstrukte über einen Succinimidylester an das Nah-Infrarot-Fluorochrom AF680 (roter Stern) gekoppelt. Die Abbildung zeigt zudem den monoklonalen Antikörper Daratumumab, die Negativkontrollen L-15 hcAb und s+16-s+16- α Alb sowie sämtliche in dieser Arbeit verwendete Varianten der Nb-Fusionsproteine wie Nanobody-Monomer (JK36), -Dimer (JK2-JK36) und Schwereketten-Antikörper (JK36 hcAb).

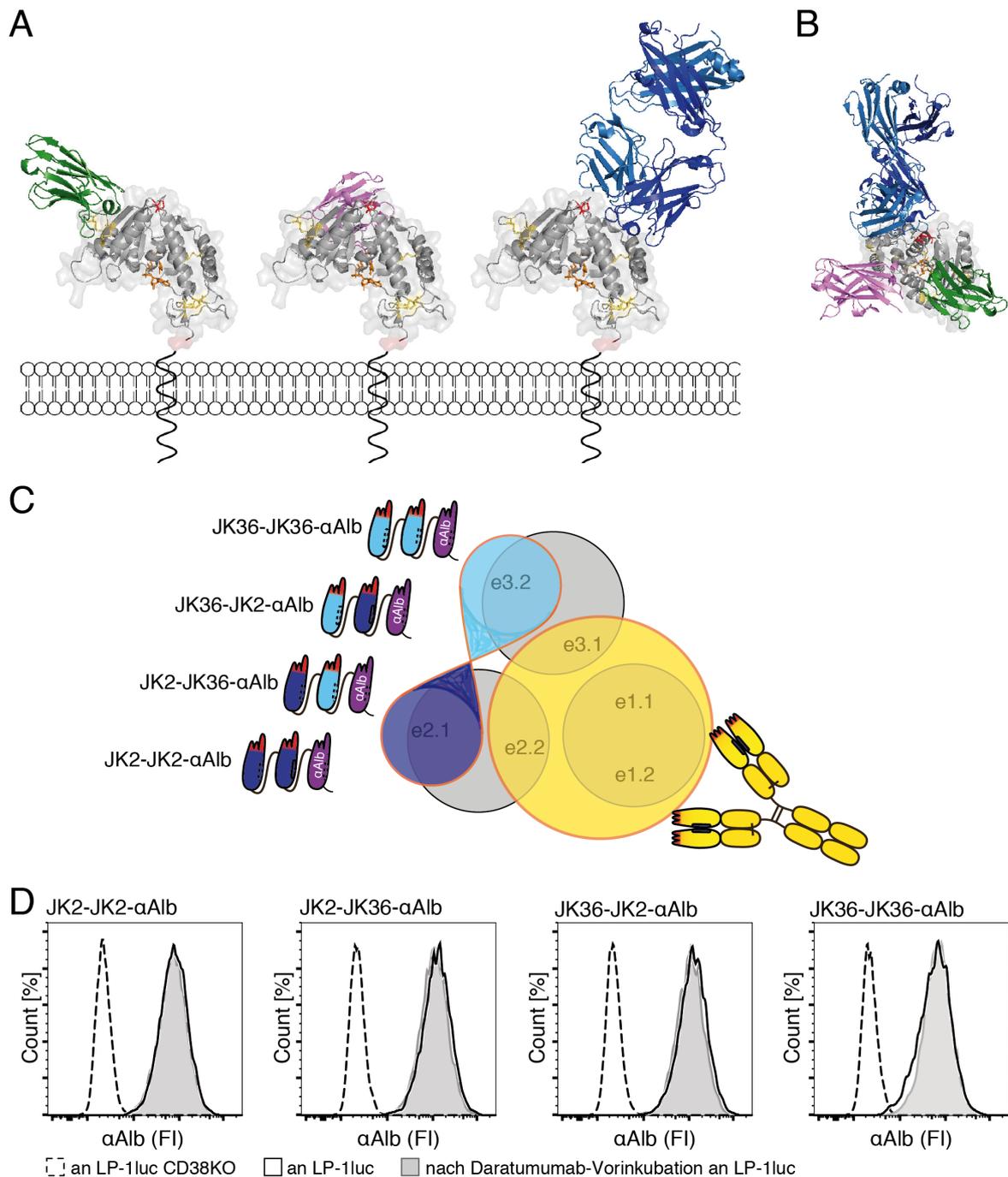


Abbildung 6 | Die spezifische CD38-Bindung der HLE Nanobody-Dimere an Myelomzellen erfolgt unabhängig von Daratumumab.

(A, B) 3D-Struktur von CD38. Seitliche Ansicht (A) und Aufsicht (B) der Bindung der beiden Schwereketten-Antikörper MU375 (grün, Epitop 1) und MU523 (magenta, Epitop 2) sowie einem Fab-Fragment von Isatuximab (blau, Epitop 3) an drei unabhängige Epitope auf CD38. *Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Nathalie Baum (Baum et al. 2020).* (C) Venn-Diagramm der Bindungsepitope von Daratumumab (gelb) und den HLE Nb-Dimeren (hellblau, dunkelblau) auf CD38, nach Fumey et al. 2017, zu eigenen Zwecken abgeändert. (D) Für die FACS-Analyse der HLE Nb-Dimer-Bindung wurden 1×10^6 Zellen LP-1 luc (schwarze/grau durchgezogene Linie) bzw. LP-1 luc CD38KO (offene Histogramme) mit AF647-konjugiertem Daratumumab oder PBS vorinkubiert. Anschließend wurden HLE Nb-Dimere hinzugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde deren Bindung anschließend mittels mAb77 (α Alb8) nachgewiesen. Die Intensität der Bindung (FI) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Detektionssystem α Alb > mAb 77 > α mIgG1-BV421, AF647.

Bei JK2 und JK36 handelt es sich um zwei unabhängig voneinander an humanes CD38 bindende Nanobodies. JK2 bindet an Epitop 2 (e2), JK36 an Epitop 3 (e3) (**Abb. 6C**). Epitop-Bindungsanalysen aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass diese beiden Nanobodies nicht nur unabhängig von Daratumumab binden, sondern auch nach Hinzugabe absättigender Dosen von Daratumumab in der Lage sind, CD38 auf der Zelloberfläche von Myelomzellen zu erkennen (*Fumey et al. 2017*). Daratumumab bindet nicht-reversibel an Epitop 1 (e1) und blockiert damit andere, ebenfalls an e1 bindende Nanobodies. Zudem überlappt die Bindung von Daratumumab teilweise auch die Epitope e2 und e3; somit blockiert Daratumumab auch Nanobodies, die an e2.2 und e3.1 binden (*Fumey et al. 2017*). Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten HLE Nb-Dimere binden je nach Zusammensetzung an die Epitope e2.1 (JK2) und/oder e3.2 (JK36) (**Abb. 6C**) und sollten folglich ebenfalls unabhängig von Daratumumab binden.

Zunächst sollte an CD38-exprimierenden LP-1 Myelomzellen die Bindung der rekombinanten HLE Nb-Dimere überprüft werden. Die Bindung der Konstrukte an LP-1 Zellen wurde über einen Alb8-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb77) nachgewiesen (**Abb. 6D**). Alle vier HLE Nb-Dimere JK2-JK2- α Alb, JK2-JK36- α Alb, JK36-JK2- α Alb sowie JK36-JK36- α Alb zeigten eine spezifische Bindung an CD38-positive LP-1 luc, nicht jedoch an CD38 negative LP-1 luc CD38KO Zellen. Die Vorinkubation der Zellen mit Daratumumab hatte keinen Einfluss auf die Intensität der Anfärbung der Zellen bei nachfolgender Inkubation mit den einzelnen HLE Nb-Dimeren. Die vier HLE Nb-Dimere binden folglich spezifisch und unabhängig von Daratumumab an humanes CD38 auf Myelomzellen (**Abb. 6D**).

Die klonierten CD38-spezifischen HLE Nanobody-Dimere enthalten C-terminal einen myc-Tag und einen his₆-Tag (-EQKLISEED, -HHHHHH-C) (**Abb. 7**). Diese Tags ermöglichen die Aufreinigung und Detektion der Konstrukte. Um eine Kreuzvernetzung durch Tag-spezifische Sekundärantikörper und eine daraus resultierende unspezifische Zytotoxizität auszuschließen, wurden zusätzlich taglose (*engl. tagless*) Nanobodies hergestellt. Hierzu wurden mittels Mutagenese-PCR die Codone für die ersten beiden Aminosäuren des myc-Tags (EQ) in zwei Stop-Codone (TAA) umgewandelt.

Die Modifikation führte zu einer Verkürzung des Leserahmens und infolgedessen zu einer Verkürzung des Proteins um 20 Aminosäuren (ca. 2,2 kDa). Der Erfolg der Mutation wurde mittels Sequenzierung überprüft (**Abb. 7**).

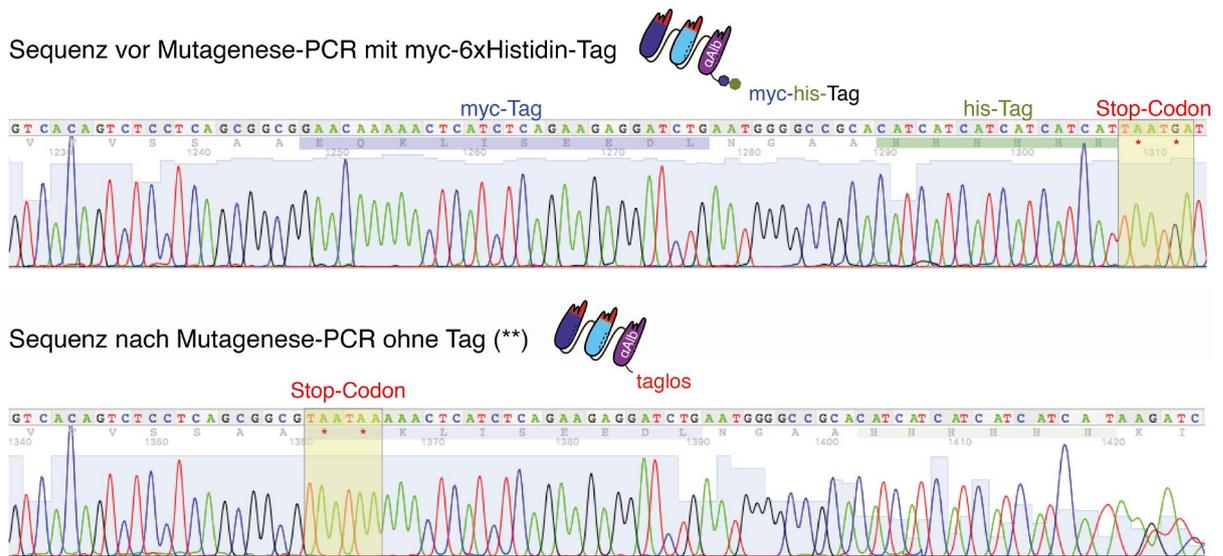


Abbildung 7 | Sequenz taghaltiger und tagloser (engl. tagless) Nanobodies nach Einführung eines Stop-Codons mittels Mutagenese-PCR

Zur Entfernung der Tags wurden mittels Mutagenese-PCR die ersten beiden Aminosäuren am Anfang des myc-Tags (C-EQKLISEEDL-N) in Stop-Codone (TAA TAA) umgewandelt. Dies führte zur Verkürzung des Leserahmens und infolgedessen zu einem um ca. 2,2 kDa (20 AS) kürzeren Protein.

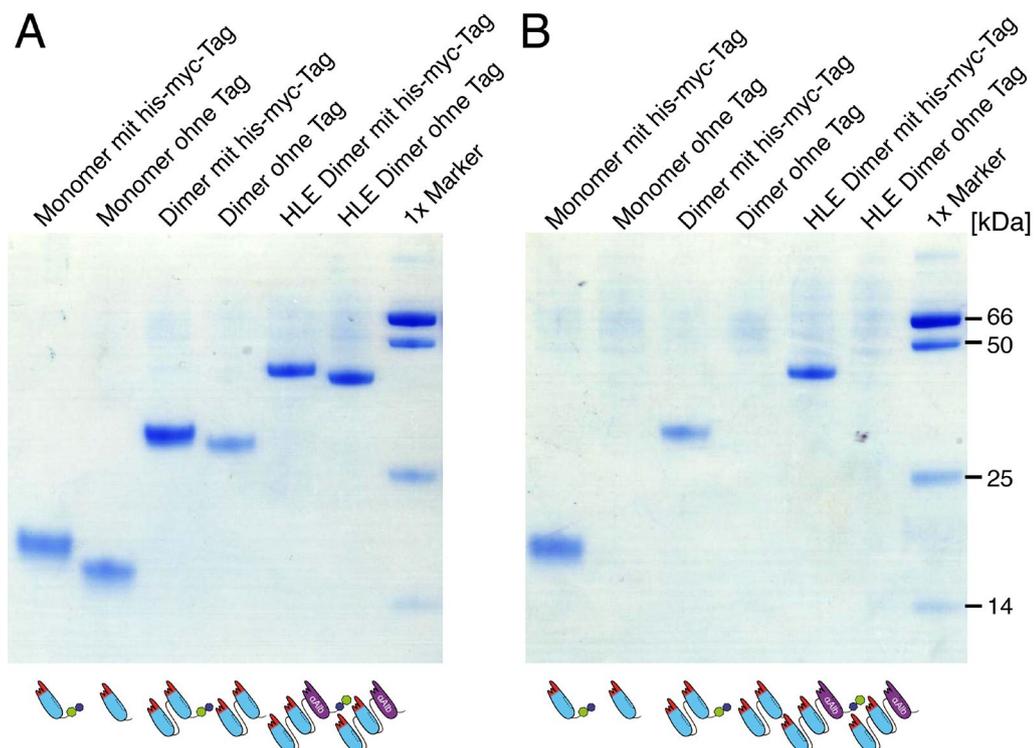


Abbildung 8 | Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Nanobodies

Rekombinante Nanobodies wurden aus dem Kulturüberstand transient transfizierter HEK-6E Zellen gewonnen und mittels Affinitätschromatographie an Protein A- (A) bzw. Nickel-NTA-Säulen (B) aufgereinigt. Die Reinheit und Integrität der rekombinanten Nanobodies wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. (A) Alle Konstrukte konnten über Protein A aufgereinigt werden. (B) Aufgrund des fehlenden Hexahistidin-Tags ließen sich die um 2,2 kDa kleineren, taglosen Nanobodies hingegen nicht über Nickel-NTA-Säulen aufreinigen.

Eine SDS-PAGE-Analyse mit folgender Coomassie-Färbung der rekombinanten Nanobodies bestätigte das um ca. 2,2 kDa geringere Molekulargewicht der Proteine ohne myc-his₆-Tag im Vergleich zu den jeweiligen taghaltigen Äquivalenten (**Abb. 8**). Die Aufreinigung der mit einem myc-his₆-Tag rekombinant in HEK293-6E Zellen produzierten Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatografie an Nickel-NTA-Matrix. Aufgrund des fehlenden Hexahistidin-Tags ließen sich die um 2,2 kDa kleineren, taglosen Nanobodies erwartungsgemäß nicht über Nickel-NTA-Matrix aufreinigen (**Abb. 8**). Über mit Protein-A-Matrix beladene Säulen konnten sowohl die taghaltigen als auch taglosen Konstrukte erfolgreich aufgereinigt werden.

Protein A ist ein Protein aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, das sowohl an die Fc-Region von IgG Immunglobulinen als auch an bestimmte VH-Domänen binden kann (*Graille et al. 2000*). Ein Alignment der VHH-Sequenzen mit der Protein A bindenden VH-Domäne 3qos zeigte, dass in JK36 ebenfalls die an der Kontaktfläche mit Protein A liegenden Aminosäuren konserviert sind (**Appendix 4**). JK2 hat zwar eine Substitution S82bN an dieser Kontaktfläche, diese behinderte die Aufreinigung über Protein A jedoch nicht. Nanobody-Konstrukte mit und ohne Tag konnten infolgedessen ebenso wie die Fc-haltigen Schwereketten-Antikörper über Affinitätschromatografie an Protein-A-Matrix aufgereinigt werden.

4.2 Antikörperabhängige Zytotoxizität an Lymphomzellen

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden zwei CD38-exprimierende humane Zelllinien gentechnisch mit Luziferase und GFP transduziert, um zytotoxische Effekte gegenüber diesen Zellen analysieren zu können (*Schriewer et al. 2020, Schütze 2020*).

Die Myelom-Zelllinie LP-1 und die Burkitt-Lymphomzelllinie CA-46 wurden hierzu mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP), Luziferase und Puromycin-Resistenz lentiviral stabil transduziert. Als Negativkontrolle wurde darüber hinaus mittels CRISPR/Cas-Technologie zusätzlich das CD38-Gen in diesen Zelllinien inaktiviert (*Schütze et al. 2018, Schriewer et al. 2020, Schütze 2020*). Die Zelllinien wurden entsprechend ihres Expressionsmusters benannt: LP-1 (CD38⁺, GFP⁻, Luziferase⁻), LP-1 luc (CD38⁺, GFP⁺, Luziferase⁺) und LP-1 luc CD38KO (CD38⁻, GFP⁺, Luziferase⁺), analog gilt dies für CA-46 Zellen. Für weitere in dieser Arbeit verwendete humane Myelom-Zelllinien (KMS-12-BM, RPMI-8226) wurden derartige Modifikationen nicht vorgenommen.

4.2.1 Charakterisierung der Lymphom-Zelllinien

Zunächst wurde die CD38-Expression dieser Zelllinien bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten CD38-spezifischen Nanobody inkubiert. Die unterschiedlichen Stoffmengenkonzentrationen ergaben sich aus der Zielsetzung, eine vergleichbare Menge an Effektorfunktion-vermittelndem Fc-Fragment einzusetzen. Die Zellen wurden dann gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Für LP-1 ergab sich mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 6400 die höchste CD38-Expression, die zweithöchste für CA-46 mit 4000, gefolgt von RPMI-8226 mit 3600 und die geringste CD38-Expression zeigte KMS-12-BM mit 900 (**Abb. 9A**).

CDC-Assays wurden an den Zelllinien durchgeführt, um die Sensibilität gegenüber dem Komplementsystem zu charakterisieren (**Abb. 9B**). Hierzu wurden die Zellen für 90 min bei 37 °C mit verschiedenen Antikörpern und humanem Serum als Komplementquelle inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei diente die Aufnahme und Anfärbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) als Maß für die Zellyse. Für diese Untersuchungen wurde Daratumumab allein sowie in Kombination mit dem unabhängig von Daratumumab bindenden HLE Nanobody-Dimer JK2-JK36- α Alb oder dem Schwereketten-Antikörper JK36 hcAb (Positivkontrolle) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der Schwereketten-Antikörper L-15 hcAb, der gegen die enzymatische Untereinheit CDTa von *Clostridioides difficile* gerichtet ist.

Die Ergebnisse zeigen eine starke PI-Anfärbung und damit eine komplementvermittelte Zytotoxizität gegen LP-1 sowie CA-46 Zellen nach Inkubation mit der Kombination aus Daratumumab und JK36 hcAb, jedoch nicht oder nur sehr schwach gegen Zellen, die mit dem Kontrollantikörper L-15 hcAb behandelt waren (**Abb. 9B, mittlere Spalte**). Eine Ko-Inkubation von Daratumumab und einem unabhängig bindenden HLE Nb-Dimer oder Schwereketten-Antikörper führte zu einer deutlichen Steigerung der komplementvermittelten Zytotoxizität gegenüber CD38-exprimierenden Zellen (**Abb. 9B, rechte Spalte**). Zellen, die mit nativem Serum und mit Daratumumab + JK36-hcAb behandelt worden waren, zeigten zudem eine deutliche Verminderung der Vorwärtsstreuung (FSC) (**Abb. 9B, linke Spalte**). Dieser stark verminderte FSC ist am ehesten durch ein Schrumpfen der Zellen infolge einer komplementvermittelten Lyse zu erklären. Nach Hinzugabe von hitzeinaktiviertem Serum, welches keine funktionalen Komplementproteine mehr enthält, zeigte sich analog zur Verwendung des Kontroll-Antikörpers L-15 hcAb keine signifikante PI-Anfärbung.

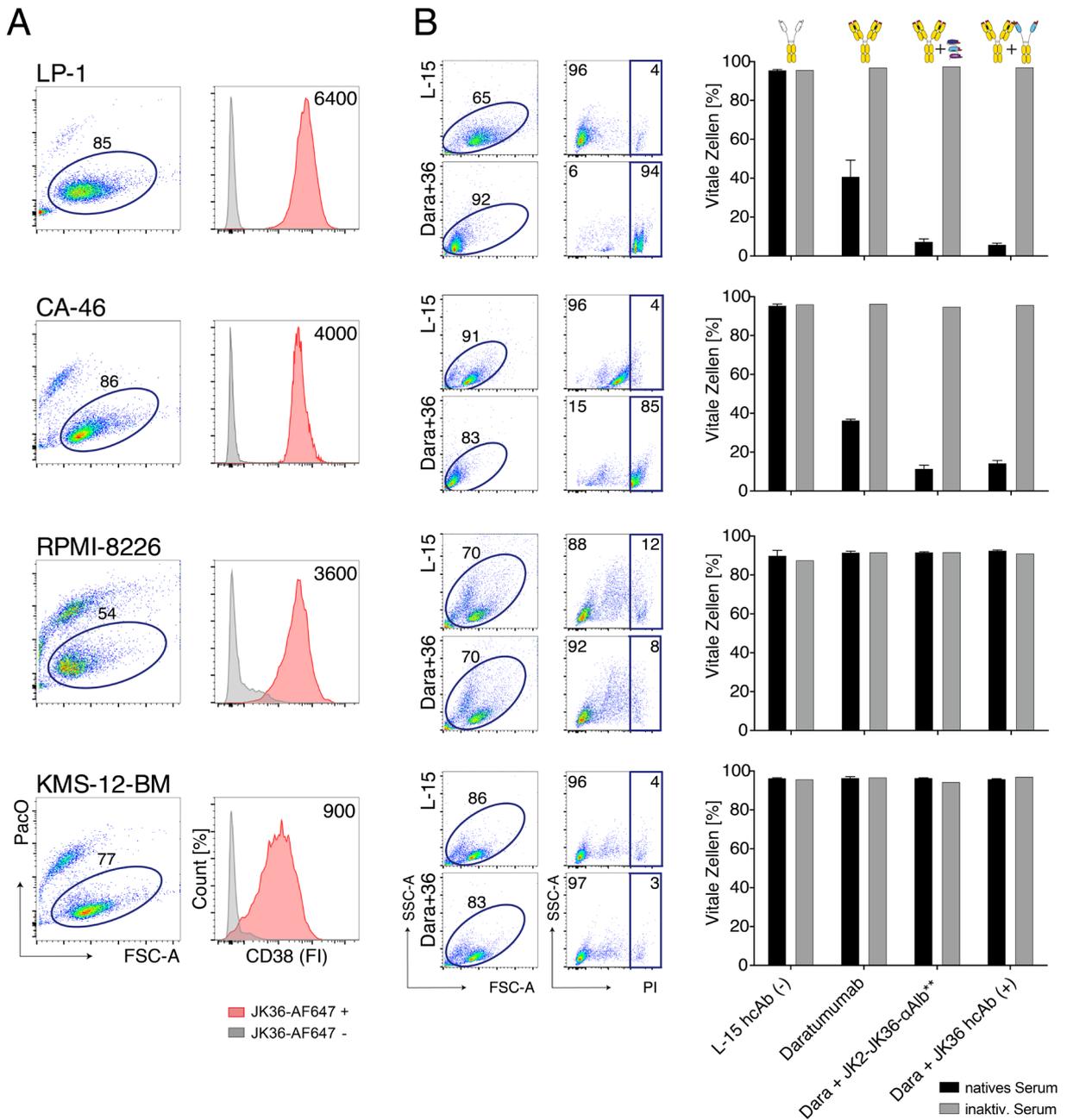


Abbildung 9 | CD38-positive LP-1 und CA-46 Zellen sind sensibel, RPMI-8226 und KMS-12-BM Zellen resistent gegenüber dem antikörperabhängigen CDC.

CD38-Expression und CDC-Assay an LP-1, CA-46, RPMI-8226 und KMS-12-BM Zellen. **(A)** Zur Analyse der Marker-Expression wurden je 1×10^5 CD38+ Zellen für 20 min bei 4 °C mit JK36-AF647 sowie PacO inkubiert. Als Kontrolle dienten ungefärbte CD38+ Zellen. Nach Gating auf lebende Zellen wurde die MFI der CD38-angefärbten Zellen im R670-Kanal quantifiziert (Zahl im ROQ: $\Delta MFI = MFI^{JK36-AF647+} - MFI^{JK36-AF647-}$). Im überlagerten Histogramm ist die Gesamtzahl der gemessenen Zellen als 100 % abgebildet (Count [%] = Normalized to Mode). **(B)** Für die CDC-Assays wurden $1,5 \times 10^5$ CD38+ Zellen für 10 min bei 4 °C mit 100 nM Antikörper/hcAb oder einer Kombination aus Antikörper + hcAb (50 nM+50 nM) bzw. Antikörper + HLE Nb-Dimer (100 nM+100 nM) vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für Komplementfaktoren 12,5 % (vol/vol) natives humanes Serum hinzugefügt. Als Kontrolle wurde inaktiviertes humanes Serum (56 °C, 30 min) hinzugefügt. Nach 90 min Inkubation bei 37 °C wurde die Vitalität der Zellen im FACS nach Zugabe des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid (PI) analysiert. Die lysierten Zellen waren durch eine stärkere DNA-Färbung (PI+) gut von den vitalen zu unterscheiden. Die höhere Fluoreszenz bei CA-46 ergab sich durch die Verwendung von CA-46 luc Zellen (n=2 (nativ), n=1 (inaktiviert)). Vitale Zellen [%] = PI-negativ [%].

Bei RPMI-8226 und KMS-12-BM Zellen hingegen ergab sich durchweg keine komplementvermittelte Lyse, unabhängig von gewähltem Serum und Antikörper-Kombination (**Abb. 9B**). Hieraus ergibt sich, dass LP-1 und CA-46 sensibel, RPMI-8226 und KMS-12-BM Zellen jedoch resistent gegenüber dem Daratumumab-abhängigen CDC sind (**Abb. 9B**). Diese Beobachtungen deuten an, dass verschiedene Faktoren die Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber dem CDC beeinflussen könnten, etwa die Höhe der CD38-Expression auf der Zelloberfläche oder das Vorhandensein von Komplement-Inhibitoren wie CD55 und CD59.

C1q- und C3-Bindungs-Assays wurden etabliert, um den Einfluss der HLE Nb-Dimere auf die Komplementbindung zu analysieren (**Abb. 10-12**). Hierzu wurden LP-1 Zellen mit einer Kombination von Daratumumab und JK36 hcAb bzw. L-15 hcAb als Negativkontrolle und mit nativem bzw. hitzeinaktiviertem Serum für 60 min bei 4 °C inkubiert. Die Bindung von C1q und C3 wurde dann durchflusszytometrisch mit Hilfe von C1q- bzw. C3-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine starke Anfärbung der mit Daratumumab + JK36 hcAb behandelten Zellen mit dem C1q-spezifischen Antikörper (**Abb. 10A, Histogramm 2+4**), jedoch nicht oder nur sehr schwach bei den Zellen, die mit dem Kontrollantikörper L-15 hcAb behandelt waren (**Abb. 10A, Histogramm 1+3**). Dabei war die C1q-Anfärbung der Zellen, die mit hitzeinaktiviertem Serum behandelt wurden (**Histogramm 2**), deutlich stärker als bei den Zellen, die mit nativem Serum behandelt wurden (**Abb. 10A, Histogramm 4**). Auch hier zeigte sich die bereits in **Abb. 9B** beobachtete Verminderung des FSC nach Behandlung mit Daratumumab + JK36 hcAb und nachfolgender Inkubation mit nativem Serum.

Eine genauere Analyse der C1q- sowie C3-Färbung der beiden Zell-Subpopulationen mit niedrigem und mäßigem FSC (starke, bzw. mäßige Schrumpfung / Lyse) der Zellen, die mit nativem Serum und Daratumumab + JK36-hcAb behandelt worden waren (**Abb. 10A, B, Histogramm 5+6**) zeigt eine deutlich stärkere C1q- sowie C3-Anfärbung der mäßig geschrumpften als der stark geschrumpften Zellpopulation. Dies deutet darauf hin, dass Zellen, die im Rahmen einer komplementvermittelten Lyse dem Zelltod unterliegen, die Komplementfaktoren auf ihrer Oberfläche verlieren.

Darüber hinaus zeigen die Assays, dass hitzeinaktiviertes humanes Serum zwar funktionelles C1q, nicht jedoch C3 enthält (**Abb. 10A, B, jeweils Histogramm 2**). Im Gegensatz dazu waren in nativem humanem Serum beide Komplementfaktoren nachweisbar.

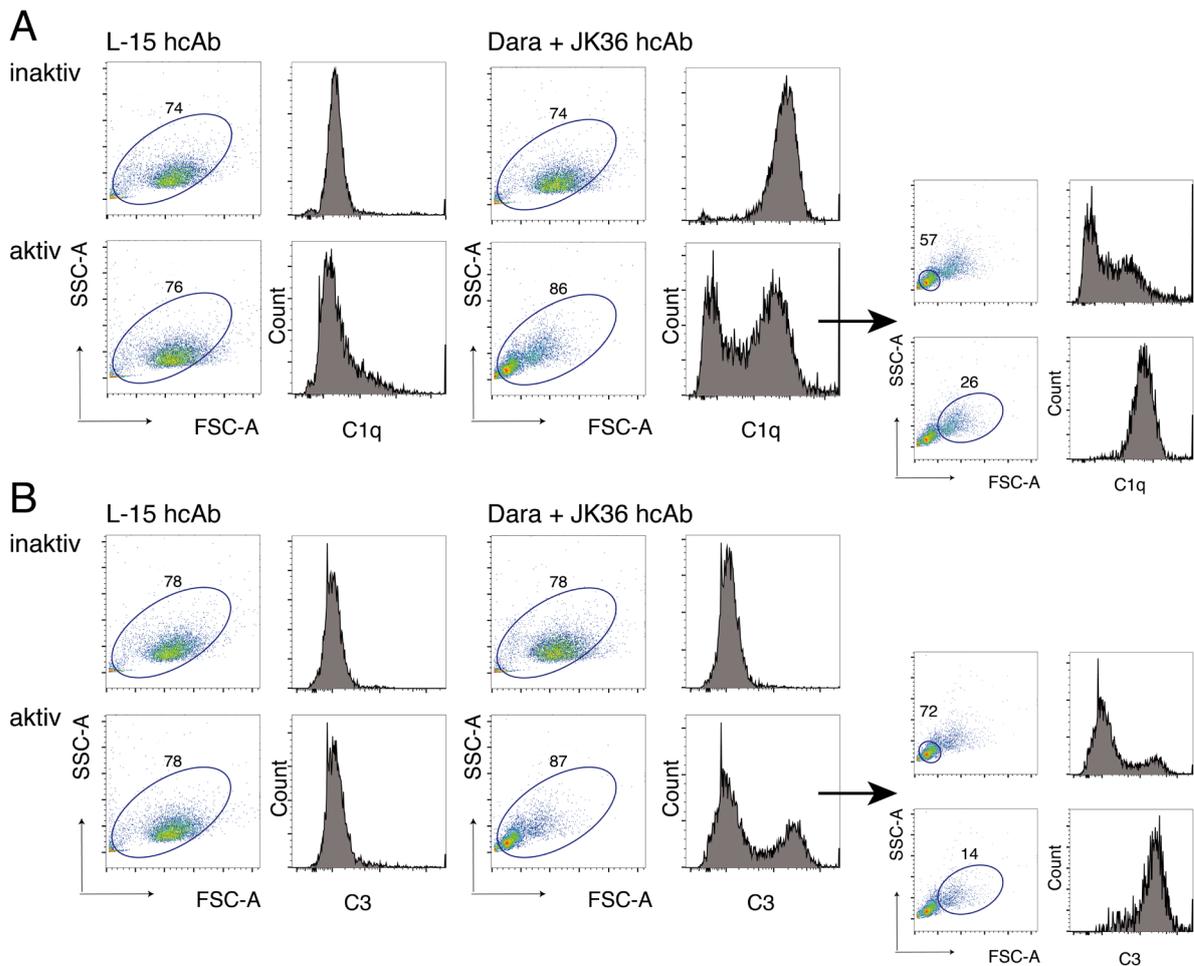


Abbildung 10 | Hitzeinaktiviertes humanes Serum enthält funktionelles C1q, nicht jedoch C3. Die Kombination von Daratumumab und JK36 hcAb induziert eine effektive, komplementvermittelte Lyse von LP-1 Zellen.

C1q- (A) und C3-Assays (B) mit nativem (aktivem) und hitzeinaktiviertem (inaktivem) humanem Serum. Je $1,5 \times 10^5$ LP-1 Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 100 nM L-15 hcAb oder einer Kombination aus Daratumumab + JK36 hcAb (je 50 nM) vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für Komplementfaktoren 12,5 % (vol/vol) natives oder hitzeinaktiviertes humanes Serum hinzugefügt und für 60 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem C1q- oder C3-spezifischen Antikörper angefärbt. Die Intensität der Bindung wurde nach Ausschluss von Debris durchflusszytometrisch über den Nachweis von C1q/C3 quantifiziert.

Hitzeinaktiviertes Serum eignet sich somit für die Durchführung von C1q-, nicht jedoch von C3-Assays. Die Kombination von Daratumumab und JK36 hcAb induzierte darüber hinaus nach 60 min eine effektive, komplementvermittelte Lyse von LP-1 Zellen sogar bei 4 °C, weshalb die nachfolgenden C3-Assays mit aktivem Serum von 60 min auf eine Inkubationszeit von maximal 20 min verkürzt wurden.

Auffällig war ferner die starke Reduktion der Färbung von C1q und C3b nach Zelllyse. Möglicherweise wurden die C1q- und C3b-tragenden Zellmembranteile bei der Lyse abgespalten oder internalisiert. In Einklang mit dieser Hypothese wiesen lysierte Zellen in **Abb. 10** konsekutiv eine verminderte Vorwärts-Lichtstreuung (FSC) als Zeichen einer erniedrigten Zellgröße auf.

Zum besseren Verständnis der CDC-Ergebnisse aus **Abb. 9** wurde nun das Komplement-Bindungsverhalten an den zuvor eingesetzten Zelllinien mittels C1q- und C3-Bindungsassays weiter untersucht (**Abb. 11**). Die C1q-Bindungsassays wurden mit hitzeinaktiviertem Serum durchgeführt. Daratumumab wurde allein sowie in Kombination mit dem HLE Nanobody-Dimer JK2-JK36- α Alb oder dem Schwereketten-Antikörper JK36 hcAb (Positivkontrolle) eingesetzt, als Negativkontrolle diente L-15 hcAb. Der Nachweis der Bindung erfolgte durchflusszytometrisch nach Hinzugabe eines C1q-spezifischen Antikörpers. An LP-1, CA-46 und RPMI-8226 Zellen konnte eine C1q-Bindung nachgewiesen werden, aber nicht bzw. nur in sehr geringem Maße an KMS-12-BM Zellen (**Abb. 11A**). An LP-1 und CA-46 Zellen bewirkte Daratumumab nur eine geringe C1q-Bindung. Durch Hinzugabe des HLE Nb-Heterodimers JK2-JK36- α Alb konnte diese auf ein Vielfaches gesteigert werden (**Abb. 11B**). Für KMS-12-BM Zellen ergab sich eine allenfalls minimale Steigerung. Die stärkste C1q-Bindung erzielte die Kombination aus Daratumumab und dem Schwereketten-Antikörper JK36 hcAb.

Um die Diskrepanz zwischen ausbleibendem Effekt im CDC-Assay bei nachweisbarer C1q-Bindung an RPMI-8226 Zellen erklären zu können, wurde als nächstes das C3-Bindungsverhalten untersucht (**Abb. 12**). Mit Hilfe eines C3-spezifischen Fluoreszenzmarkierten Antikörpers sowie PacO wurde parallel die durch Daratumumab + JK36 hcAb induzierte Bindung von C3b an LP-1 sowie RPMI-8226 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Ähnlich den Vorversuchen waren zuvor LP-1 bzw. RPMI-8226 Zellen mit Antikörper allein oder in Kombination mit aktivem humanem Serum inkubiert worden. Während bei LP-1 Zellen eine starke Bindung von C3 mit einem Anstieg des PacO-Signals einherging, wiesen RPMI-8226 Zellen nur ein schwaches C3-Signal ohne Anstieg des PacO-Signals auf (**Abb. 12 A+B**). Diese Beobachtungen legen nahe, dass an beiden Zelllinien die Komplementkaskade zwar initiiert wird, im Falle von RPMI-8226 aber nicht bis zum Ende abläuft, was die ausbleibende Zytotoxizität in **Abb. 11** erklären würde. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Folgenden die Expression von Komplement-inhibierenden Membranproteinen auf den Zellen genauer untersucht.

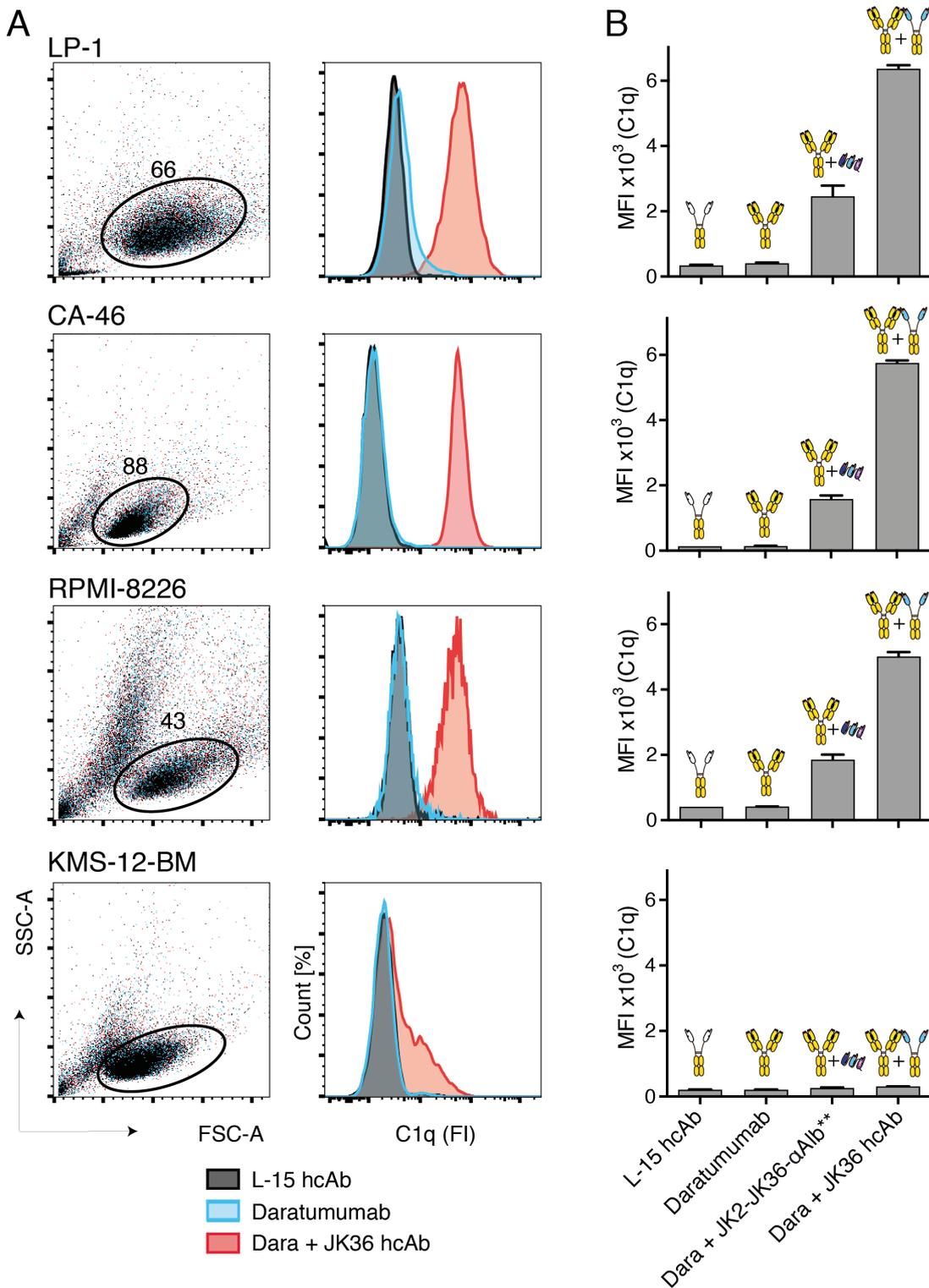


Abbildung 11 | HLE Nanobody-Dimere verstärken die Bindung von C1q an Daratumumab-sensible LP-1 und CA-46 Zellen sowie Daratumumab-resistente RPMI-8226 Zellen, nicht jedoch an Daratumumab-resistente KMS-12-BM Zellen.

C1q-Assay an LP-1, CA-46, RPMI-8226 und KMS-12-BM Zellen. Je $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit Antikörper allein (100 nM) oder in Kombination mit HLE Nb-Dimeren (100 nM+100 nM) bzw. hcAb (50 nM+50 nM) vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für den Komplementfaktor C1q 12,5 % (vol/vol) hitzeinaktiviertes humanes Serum hinzugefügt und für 60 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem C1q-spezifischen Antikörper angefärbt. **(A)** Gating. Die Intensität der Bindung (FI) wurde nach Ausschluss von Debris durchflusszytometrisch über den Nachweis von C1q quantifiziert (Count [%] = Normalized to Mode). **(B)** Graphische Darstellung der C1q-Assay-Ergebnisse (n=3).

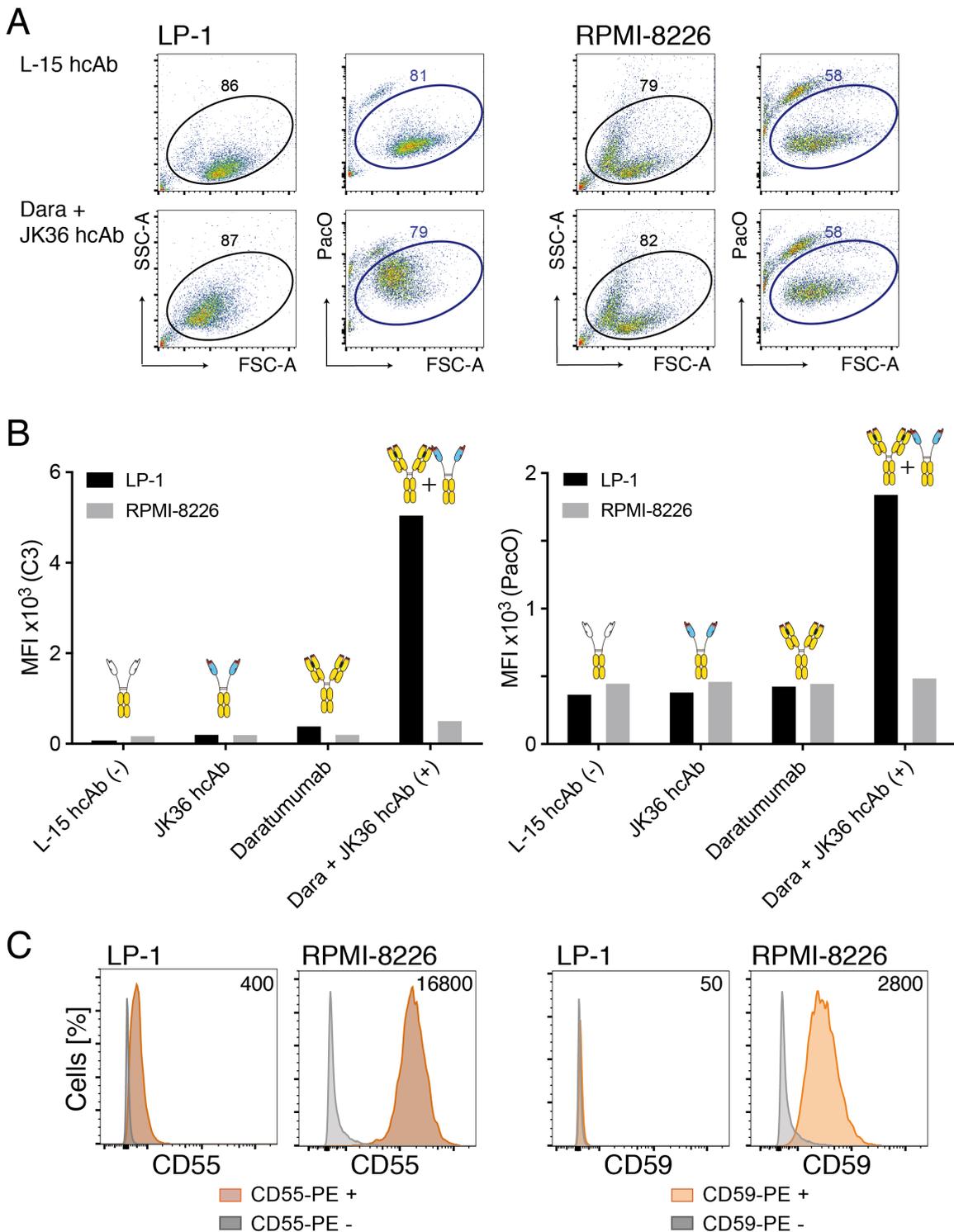


Abbildung 12 | Daratumumab-resistente RPMI-8226 Zellen zeigen anders als die Daratumumab-sensiblen LP-1 Zellen eine vermehrte Expression der Komplement-inhibierenden Faktoren CD55 und CD59 bei schwacher Bindung des Komplementfaktors C3.

C3-Bindungsassay an LP-1 und RPMI-8226 Zellen sowie CD55- und CD59-Expression. Zu $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden insgesamt 100 nM Antikörper alleine oder in Kombination hinzugegeben, nach 10 min Inkubation auf Eis wurde 12,5 % aktives humanes Serum hinzugefügt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem C3-spezifischen Antikörper sowie PacO angefärbt. **(A)** Gating. Die Intensität der Bindung wurde durchflusszytometrisch nach Gating auf lebendige Zellen (PacO -) über den Nachweis von C3 (MFI) quantifiziert. **(B)** Graphische Darstellung der C3-Assay-Ergebnisse. **(C)** Expressionsanalyse von CD55 und CD59 an LP-1 und RPMI-8226 Zellen. Die Versuchsdurchführung mit einem spezifischen CD55- bzw. CD59-PE-Antikörper sowie Gating und Auswertung (Δ MFI) erfolgten analog Abb. 9A (Count [%] = Normalized to Mode).

Es sind zwei wesentliche membranständige Negativregulatoren des Komplementsystems bekannt: CD55 und CD59. CD55 inhibiert die frühe Komplementaktivierung durch Degradierung der C3-Konvertase des klassischen und alternativen Weges des Komplementsystems. CD59 verhindert durch Bindung an C8 und C9 die Polymerisierung und infolgedessen Ausbildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC). Ähnlich der Verwendung von inaktivem Serum kommt es also bei Vorhandensein von Komplement-Inhibitoren zu einem unvollständigen Ablauf der Komplementkaskade. Zum besseren Verständnis der unterschiedlichen CDC-Sensitivitäten wurde deshalb die Expression von CD55 und CD59 auf der Zelloberfläche der genannten Zelllinien bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten CD55- bzw. CD59-spezifischen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Analog zu **Abb. 11A** galt auch für diese Markeranalyse die MFI als Maß für die Menge an gebundenen Antikörpern. Während der Nachweis von CD55 und CD59 bei LP-1 Zellen eher gering ausfiel (MFI 400 bzw. 50), ergab sich bei den Darareisistenten RPMI-8226 Zellen in **Abb. 12C** eine hohe Expression der Komplementinhibitoren CD55 (MFI 16800) und CD59 (MFI 2800). Auch KMS-12-BM Zellen zeigten eine hohe Expression von CD55 und CD59 (*Ergebnisse nicht gezeigt*).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass an LP-1 und CA-46 Zellen die Bindung von C1q sowie der Ablauf der Komplementkaskade bis hin zur Ausbildung des MAC mit nachfolgendem Zelltod erfolgt. Sowohl KMS-12-BM als auch RPMI-8226 Zellen zeigten sich resistent gegenüber einer komplementvermittelten Zytotoxizität. An KMS-12-BM Zellen konnte keine nennenswerte Bindung von C1q nachgewiesen werden. An RPMI-8226 Zellen erfolgte die Initiierung der Komplementkaskade mit Nachweis einer C1q-Bindung und ausbleibender C3-Bindung. Zusammengenommen erwiesen sich somit LP-1 und CA-46 als gut geeignete Zelllinien für *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays.

Während die Zelllinie LP-1 von einem Individuum mit Multiplem Myelom vom Typ IgG lambda (λ) stammt, handelt es sich bei CA-46 jedoch um eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, sodass für die nachfolgenden Versuche die Myelom-Zelllinie LP-1 eingesetzt wurde.

4.2.2 Komplementvermittelte Zytotoxizität

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass individuelle Schwereketten-Antikörper *in vitro* keine bzw. eine nur sehr schwache Komplement-Aktivierung induzieren (Schriewer *et al.* 2020). Kombinationen von Schwereketten-Antikörpern, die unabhängig voneinander an CD38 binden, induzieren hingegen sehr effizient eine komplementvermittelte Lyse. Auch der *in vitro* schwache CDC von Daratumumab konnte durch Zugabe eines unabhängig bindenden Schwereketten-Antikörpers gesteigert werden (Schütze *et al.* 2018). Es blieb jedoch ungeklärt, ob für die Verstärkung des CDC die höhere Menge der verfügbaren Fc-Fragmente ursächlich war oder ob die Hinzugabe eines weiteren hcAb eine bessere Bindung des hexameren C1q an kreuzvernetzte CD38-Moleküle auf der Zelloberfläche ermöglichte.

Anhand der Daten aus **Abb. 9B** wird bereits deutlich, dass HLE Nb-Dimere einen wirkungsverstärkenden Effekt auf den Daratumumab-abhängigen CDC haben. Aus diesem Grund wurden alle vier HLE Nanobody-Dimere auf ihr Verstärkungspotenzial der Komplementaktivierung sowie der komplementvermittelten Zytotoxizität durch Daratumumab untersucht. Dazu wurden CDC-Assays *in vitro* an LP-1 luc Zellen durchgeführt (**Abb. 13-20**). Als Negativkontrolle diente L-15 hcAb und als Positivkontrolle die in Vorversuchen als potent getestete Kombination von Daratumumab und dem Schwereketten-Antikörper JK36 hcAb.

Zunächst wurden LP-1 luc Zellen mit Daratumumab und/oder HLE Nb-Dimeren und humanem Serum als Komplementquelle inkubiert, und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Aufnahme und Anfärbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) bei gleichzeitigem Fehlen von GFP diente als Maß für die Zelllyse. Als Kontrolle wurde eine identische Probe mit hitzeinaktiviertem Serum analysiert. Daratumumab allein bewirkte gegenüber der Zelllinie LP-1 luc eine komplementvermittelte Lyse von etwa 15-20 % der Zellen (**Abb. 13**). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Steigerung des CDC von Daratumumab bei Hinzugabe der HLE Nb-Dimere auf 60-90 %. Hier ergab sich ein sichtbarer Unterschied in der Verstärkung durch *biparatopische* und *bivalente* Konstrukte. Dieser war im zweiseitigen t-Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ für alle verglichenen HLE Nb-Dimere signifikant. Die *biparatopischen* Konstrukte JK2-JK36- α Alb und JK36-JK2- α Alb erwiesen sich in Kombination mit Daratumumab potenter als die *bivalenten* Konstrukte JK2-JK2- α Alb und JK36-JK36- α Alb. Ohne Hinzugabe von Daratumumab induzierte keines der Konstrukte einen messbaren CDC. Nach Zugabe von inaktiviertem Serum ergab sich Konstrukt-unabhängig keine Zelllyse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *biparatopische* Nb-Konstrukte in Kombination mit Daratumumab eine bessere Kreuzvernetzung von CD38 an LP-1 luc Zellen induzieren als *bivalente* Nb-Konstrukte.

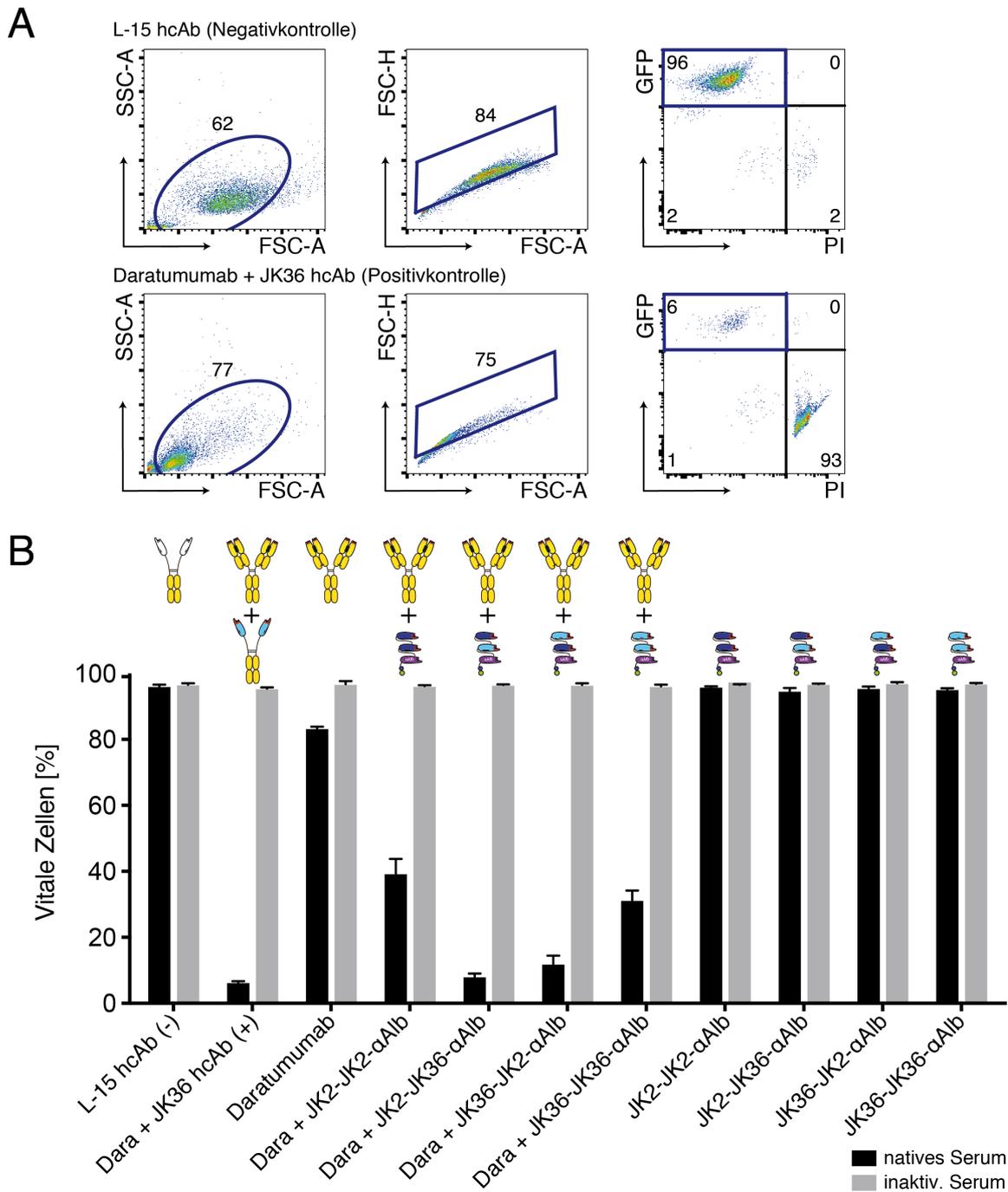


Abbildung 13 | HLE Nanobody-Dimere verstärken den Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber CD38+ LP-1 Myelomzellen *in vitro*.

Je $1,5 \times 10^5$ LP-1 luc Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 100 nM Antikörpern und/oder HLE Nb-Dimeren vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für Komplementfaktoren 12,5 % (vol/vol) natives humanes Serum hinzugefügt. Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen humanes Serum hinzugefügt, bei dem die Komplementfaktoren zuvor durch 30-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert worden waren. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in einer Lösung aus PBS und dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) resuspendiert und für 15 min auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** Gating. Durch Komplementfaktoren lysierte Zellen sind durch ihre geringere Größe (niedrigerer FSC-A, niedrigerer SSC-A), den Verlust von GFP, sowie eine stärkere DNA-Färbung gut von vitalen Zellen zu unterscheiden. **(B)** Graphische Darstellung der CDC-Ergebnisse (n=3). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

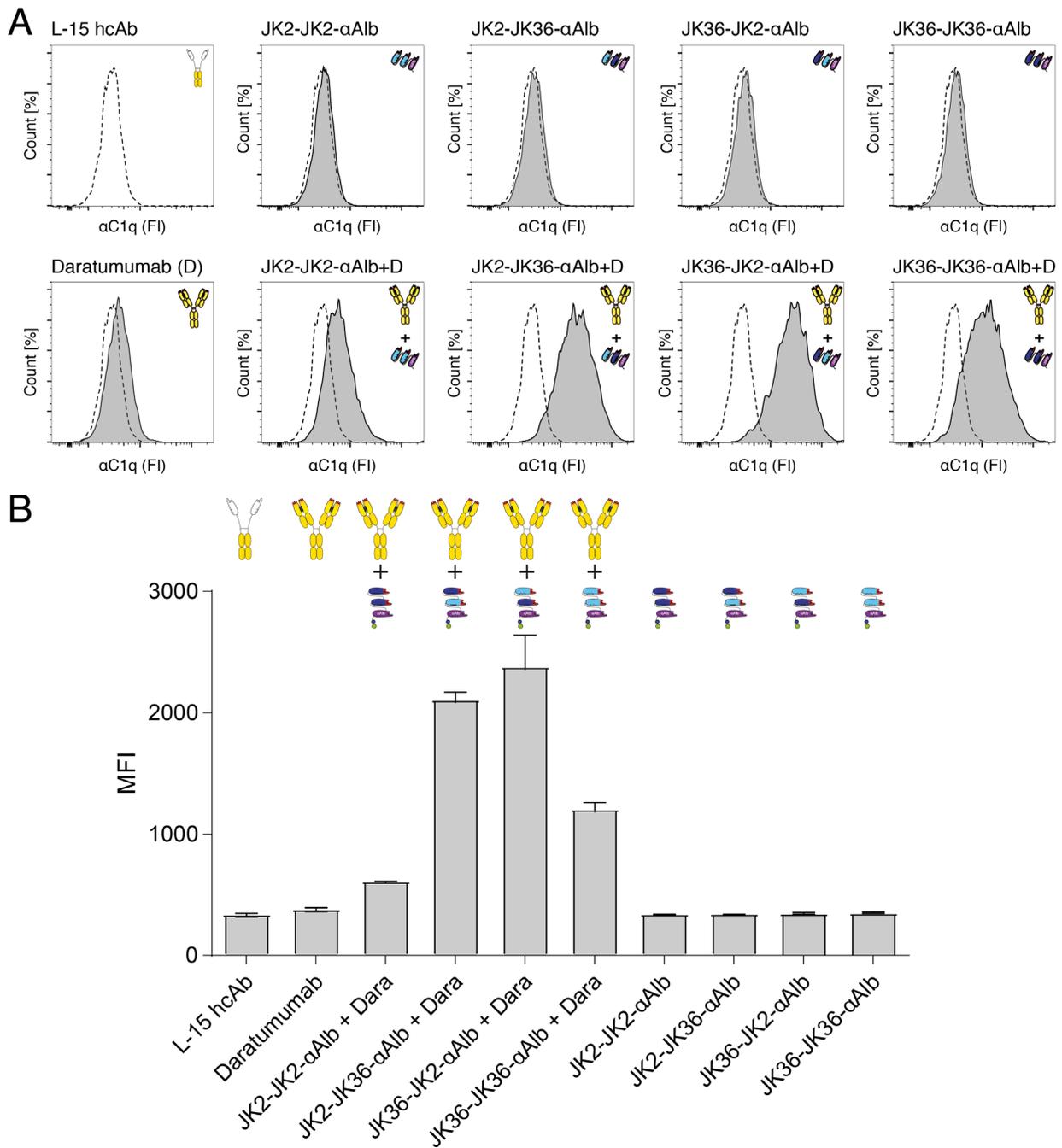


Abbildung 14 | HLE Nanobody-Dimere verstärken die Daratumumab-abhängige C1q-Bindung an CD38+ LP-1 Myelomzellen *in vitro*.

Je $1,5 \times 10^5$ LP-1 Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 100 nM Antikörpern und/oder HLE Nb-Dimeren vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für C1q 12,5 % (vol/vol) hitzeinaktiviertes humanes Serum hinzugefügt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit einem C1q-spezifischen Antikörper angefärbt. **(A)** FACS-Plots der einzelnen Konstrukte. Die Intensität der Bindung (FI) wurde nach Ausschluss von Debris durchflusszytometrisch über den Nachweis von C1q quantifiziert. Gestrichelt ist jeweils L-15 hcAb als Negativkontrolle hinterlegt. (Count [%] = Normalized to Mode). **(B)** Graphische Darstellung der Assay-Ergebnisse (n=3).

Zur Beurteilung der durch HLE Nb-Dimere bedingten Steigerung der Komplementaktivierung erfolgte ein C1q-Bindungsversuch (**Abb. 14**). Hierzu wurden die LP-1 Zellen für 10 min bei 4 °C mit Daratumumab und/oder HLE Nb-Dimeren und humanem, hitzeinaktivem Serum, welches C1q enthält, inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem C1q-spezifischen Antikörper angefärbt und die Stärke der Bindung wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Analog zu den beobachteten Tendenzen der CDC-Intensität ergab sich hier für die Kombination aus Daratumumab und den *biparatopischen* Nb-Konstrukten die stärkste C1q-Bindung (MFI >2000). Während sich die Intensität der C1q-Bindung nach Inkubation der Zellen mit Daratumumab nur geringfügig von der Negativkontrolle abhob (MFI_{Dara} ~370 vs. MFI_{L-15} ~330), verdoppelte sich die MFI nach zusätzlicher Inkubation mit *bivalenten* HLE Nb-Dimeren; nach zusätzlicher Inkubation mit *biparatopischen* Konstrukten stieg sie sogar auf das Fünf- bis Zehnfache. HLE Nb-Dimere allein induzierten analog zur Negativkontrolle L-15 hcAb keine C1q-Bindung (MFI_{HLE} ~340). Die Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte komplementvermittelte Lyse durch Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren bereits durch eine initial stärkere C1q-Bindung verursacht wird. *Biparatopische* Nb-Konstrukte zeigen auch hier ein größeres Potenzial als *bivalente* Nb-Konstrukte.

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Verstärkung des Daratumumab-induzierten CDC nur durch (HLE) Nanobody-Dimere erfolgt und nicht bereits durch Hinzugabe einfacher Nanobody-Monomere erzielt werden kann, wurden im nachfolgenden CDC-Assay JK2 his und JK36 his mit Daratumumab kombiniert (**Abb. 15**). Analog zu den Vorversuchen wurden die LP-1 luc Zellen mit Daratumumab und/oder Nanobodies bzw. ihren analogen *bivalenten* HLE Nb-Dimeren und humanem Serum als Komplementquelle inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Erneut wurde der Nachweis von PI bei gleichzeitig fehlendem Signal für GFP als Maß für die Zelllyse quantifiziert. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu den HLE Nb-Dimeren keine Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber LP-1 luc Zellen. Vielmehr verminderte die Hinzugabe eines Nanobody-Monomers durch Belegung eines weiteren Epitops die Effektivität des Daratumumab-abhängigen CDC.

Nach CDC durch Daratumumab verblieben ca. 60 % vitale Zellen, durch Hinzugabe des Monomers erhöhte sich der Anteil vitaler Zellen auf ca. 85 % (JK2 his) bzw. 70 % (JK36 his). Die Hinzugabe des *bivalenten* HLE Nb-Dimers bewirkte analog **Abb. 13** eine verstärkte Lyse und verminderte den Anteil vitaler Zellen auf 15-25 %. Für das HLE JK36-Dimer waren die Effekte etwas stärker als für das HLE JK2-Dimer. In der Negativkontrolle zeigte sich keine Zelllyse. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Dimerisierung eines CD38-spezifischen Nanobodies essenziell für eine Verstärkung des Daratumumab-induzierten CDC ist.

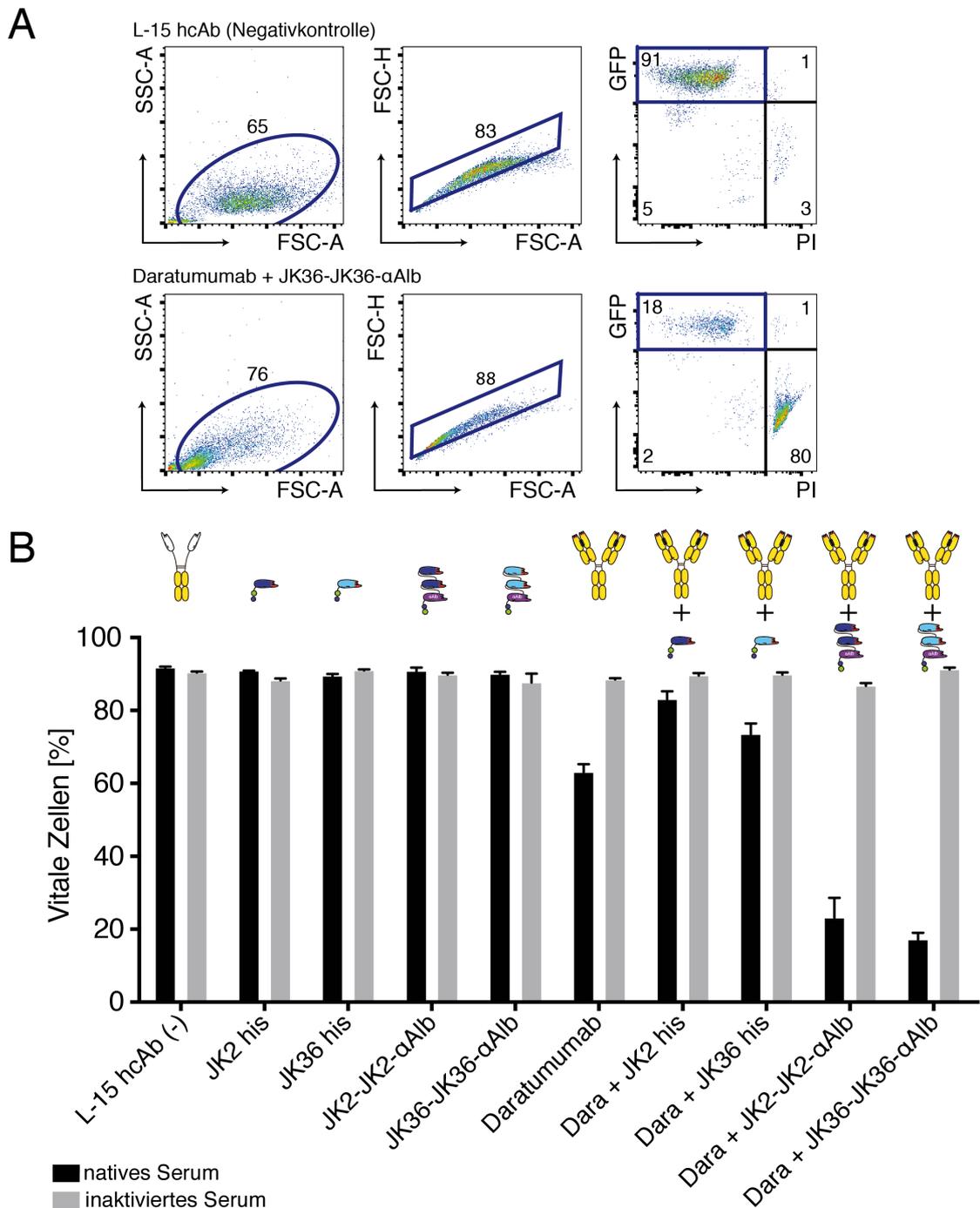


Abbildung 15 | Nanobody-Monomere bewirken im Gegensatz zu HLE Nanobody-Dimeren keine Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC an CD38+ LP-1 Myelomzellen *in vitro*.

Je $1,5 \times 10^5$ LP-1 luc Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 100 nM Antikörpern und/oder Nb bzw. HLE Nb-Dimeren vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für Komplementfaktoren 12,5 % (vol/vol) natives humanes Serum hinzugefügt. Als Kontrolle wurde 12,5 % (vol/vol) inaktiviertes humanes Serum (56 °C, 30 min) hinzugefügt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde PI hinzugegeben und die Vitalität der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Gating. Lysierte Zellen waren durch ihre geringere Größe, den Verlust von GFP, sowie eine stärkere DNA-Färbung gut von vitalen Zellen zu unterscheiden. **(B)** Graphische Darstellung der CDC-Ergebnisse (n=3). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-.

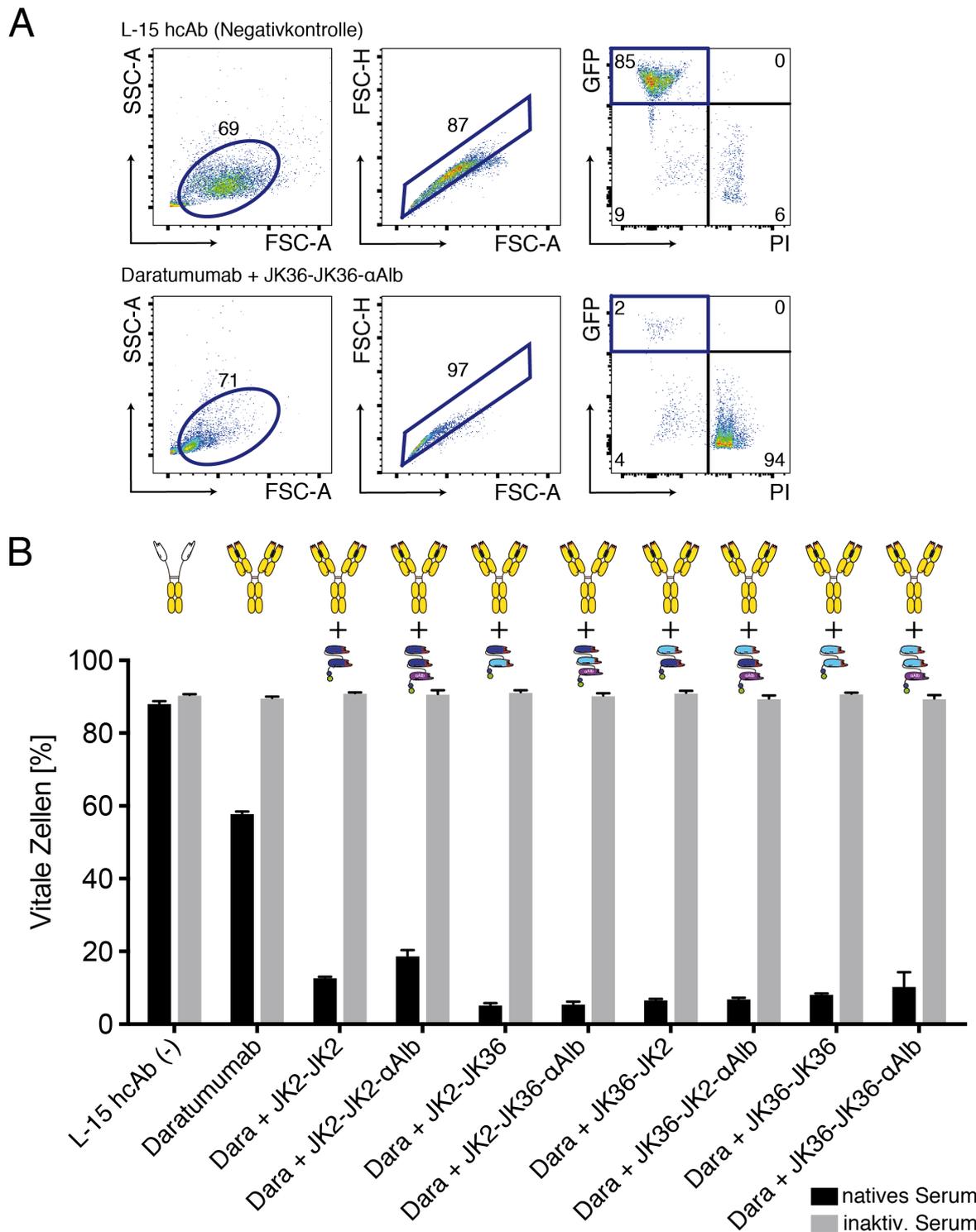


Abbildung 16 | „Nackte“ Nanobody-Dimere und HLE Nanobody-Dimere zeigen eine vergleichbare Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC *in vitro*.

Der CDC-Assay an LP-1 luc Zellen wurde analog den CDC-Vorversuchen durchgeführt. In diesem Versuch wurden jeweils HLE Nanobody-Dimere vergleichend mit „nackten“ Nanobody-Dimeren (ohne Albumin-spezifischen Nanobody) untersucht. Je $1,5 \times 10^5$ LP-1 luc Zellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 100 nM Antikörper und/oder (HLE) Nb-Dimer vorinkubiert. Danach wurde 12,5 % (vol/vol) natives bzw. inaktiviertes humanes Serum (56 °C, 30 min) hinzugefügt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde PI hinzugegeben und die Vitalität der Zellen (GFP+, PI-) durchflusszytometrisch analysiert. (A) Gating. (B) Graphische Darstellung der Ergebnisse (n=3). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-.

Die zusätzliche Anknüpfung eines α Alb-Nanobodies führte zu einem um ca. 15 kDa größeren Protein. Ziel des nachfolgenden Versuchs war es, die CDC-Verstärkung durch „nackte“ Nanobody-Dimere im Vergleich mit ihren HLE Analoga zu quantifizieren. Hierzu wurden die Zellen wie in den Vorversuchen mit den (HLE) Nb-Dimeren und humanem Serum inkubiert. Im direkten Vergleich zwischen HLE Nb-Dimeren und „nackten“ Nanobody-Dimeren zeigte sich ein ähnliches Ergebnis in der Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC (**Abb. 16**). In beiden Fällen erwiesen sich die *biparatopischen* Dimere JK2-JK36(- α Alb) und JK36-JK2(- α Alb) etwas potenter als die *bivalenten* Dimere JK2-JK2(- α Alb) und JK36-JK36(- α Alb). Der α Alb-Nanobody hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die CDC-Verstärkung durch Nanobody-Dimere.

Um sicherzustellen, dass die CDC-steigernden Effekte der HLE Nanobody-Dimere nicht durch Tag-spezifische Sekundärantikörper verursacht wurden, wurden taglose („tagless“) Nanobody-Fusionsproteine (vgl. Teil 1, **Abb. 7+8**) hergestellt. Hierzu wurde mittels Mutagenese-PCR der Leserahmen des Nb-Fusionsproteins wie bereits beschrieben auf einen Bereich ohne die codierenden Sequenzen für den myc-Tag sowie his₆-Tag verkürzt. Zur vereinfachten Darstellung wurden diese taglosen Fusionsproteine durch **, als Repräsentation der eingefügten Stop-Codone, bezeichnet. Analog zu den Vorversuchen wurden die LP-1 luc Zellen für 90 min bei 37 °C mit Daratumumab und taghaltigen oder taglosen HLE Nb-Dimeren sowie humanem Serum inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Auch die taglosen HLE Nb-Dimere zeigten eine deutliche Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC (**Abb. 17**), vergleichbar mit der Verstärkung durch ihre taghaltige Variante. Ebenso ergab sich für diese taglosen Konstrukte ein sichtbarer Unterschied zwischen *bivalenten* und *biparatopischen* Dimeren. Die *biparatopischen* Dimere JK2-JK36- α Alb** und JK36-JK2 α Alb** zeigten sich auch hier in Kombination mit Daratumumab potenter als die *bivalenten* Varianten JK2-JK2- α Alb** und JK36-JK36- α Alb**.

Es konnte bestätigt werden, dass die verwendeten Tags nicht ursächlich für die beobachtete CDC-Verstärkung durch Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren sind.

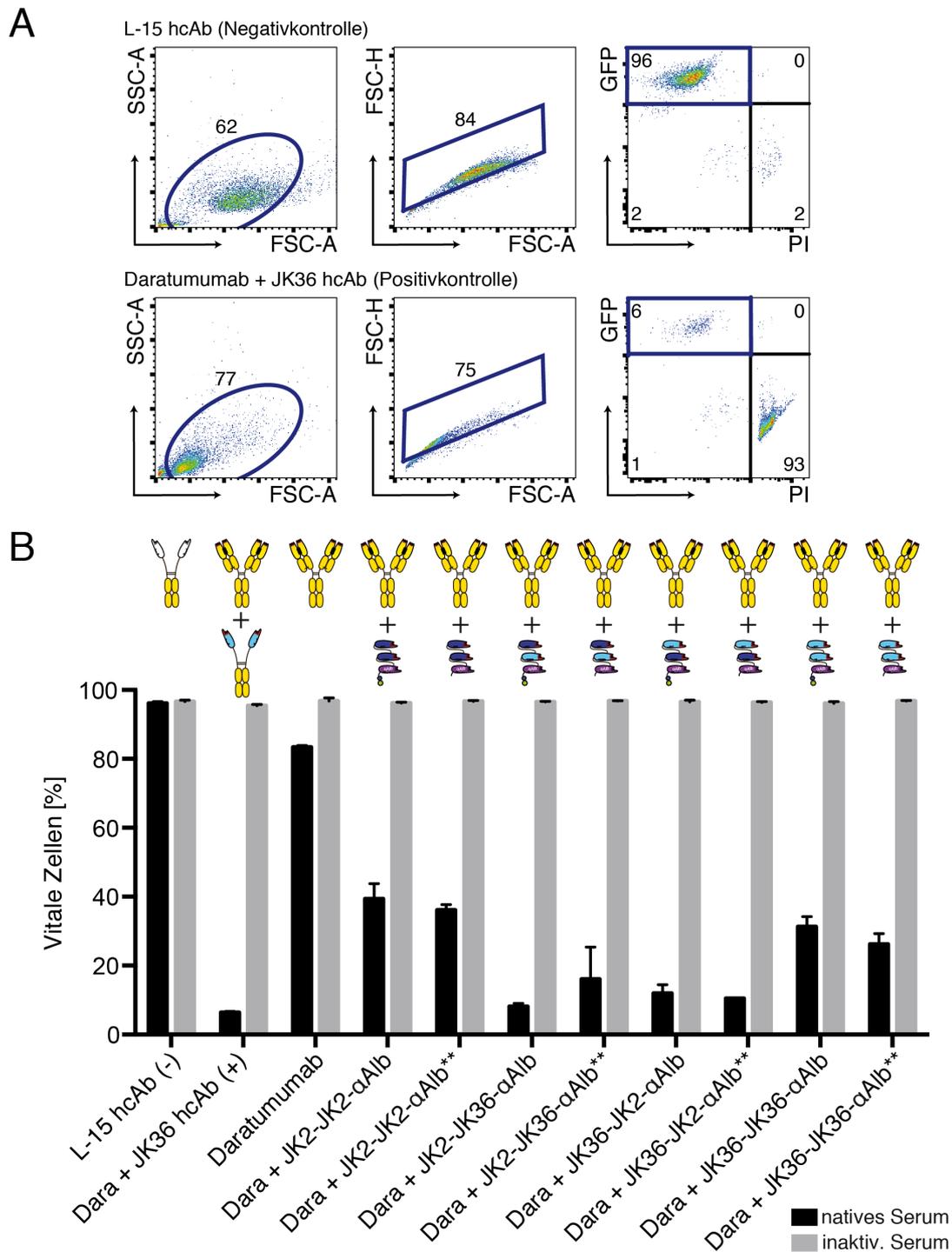


Abbildung 17 | Taglose und taghaltige HLE Nanobody-Dimere zeigen eine jeweils ähnliche Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC.

Der CDC-Assay an LP-1 luc Zellen wurde analog den Vorversuchen durchgeführt. In diesem Versuch wurde die Kombination aus Daratumumab und taghaltigen HLE Nanobody-Dimeren mit der aus Daratumumab und taglosen HLE Nanobody-Dimeren vergleichend untersucht. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. **(A)** Gating. **(B)** Graphische Darstellung der CDC-Ergebnisse (n=3). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-. Taglose Konstrukte sind mit ** gekennzeichnet.

Um zu beweisen, dass die durch Daratumumab erzielten CDC-Effekte CD38-abhängig sind, wurden analog CDC-Versuche an CD38-defizienten LP-1 Zellen (LP-1 luc CD38KO) durchgeführt. Hier zeigten sich CD38KO Zellen resistent gegenüber dem Daratumumab-abhängigen CDC in und ohne Kombination mit HLE Nanobody-Dimeren (**Abb. 18**).

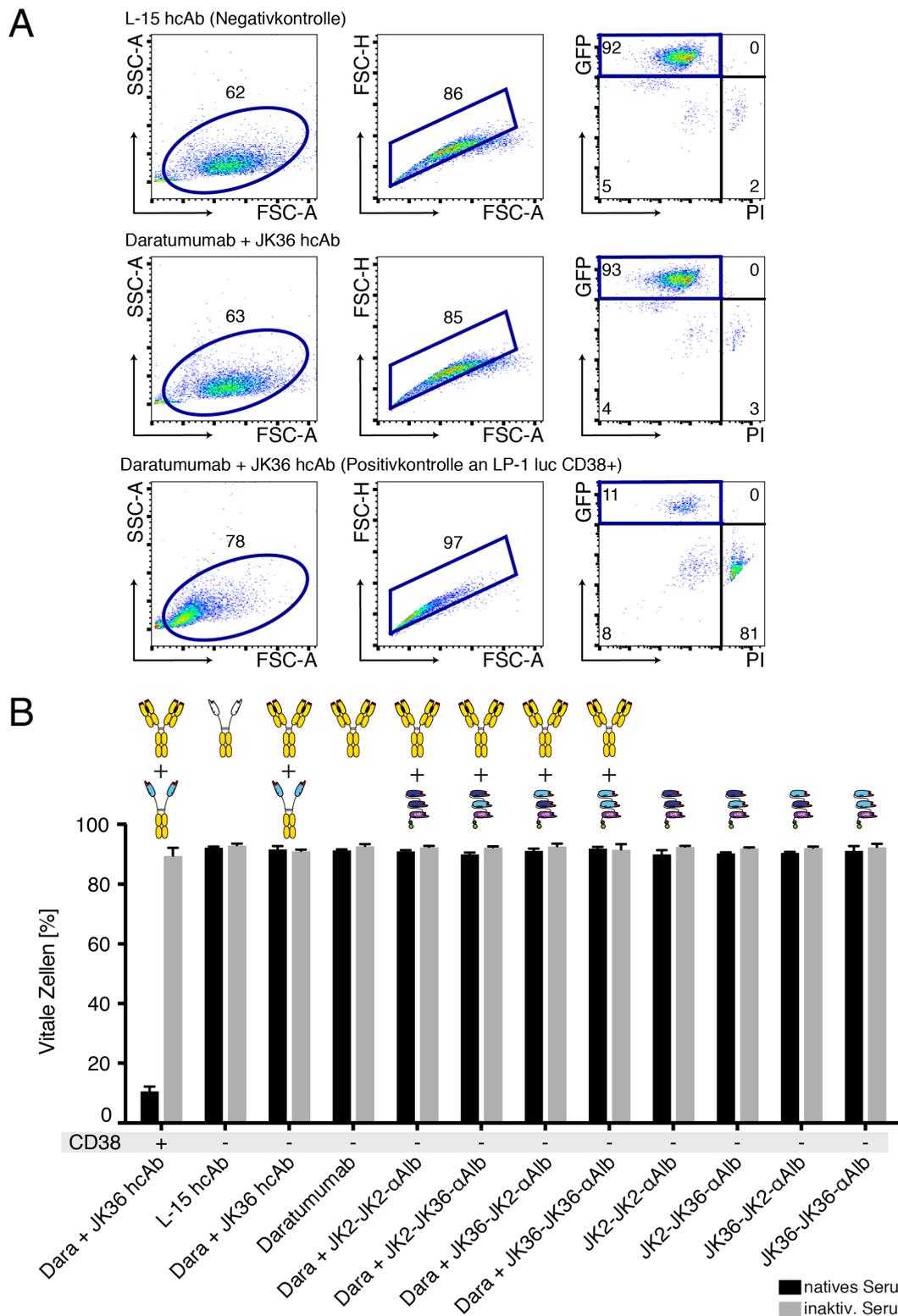


Abbildung 18 | CD38-negative LP-1 Zellen sind resistent gegenüber dem Dara-abhängigen CDC. Der CDC-Assay an LP-1 luc (CD38+) aus Abb. 13 wurde an LP-1 luc CD38KO Zellen (CD38-) wiederholt. CD38-positive LP-1 luc Zellen wurden in einem Kontrollansatz (CD38+) mit Daratumumab + JK36 hcAb verwendet. Wie detailliert in Abb. 13 beschrieben, wurden je $1,5 \times 10^5$ LP-1 luc CD38KO Zellen mit Antikörpern und/oder HLE Nb-Dimeren vorinkubiert. Danach wurde als Quelle für Komplementfaktoren natives humanes bzw. inaktiviertes Serum hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37°C wurde die Vitalität der Zellen durchflusszytometrisch nach Zugabe von PI analysiert. **(A)** Gating. Durch Komplementfaktoren lysierte Zellen sind durch ihre geringere Größe (niedrigerer FSC-A), den Verlust von GFP, sowie eine stärkere DNA-Färbung gut von vitalen Zellen zu unterscheiden. **(B)** Graphische Darstellung der CDC-Ergebnisse ($n=3$). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Kombination aus einem HLE Nb-Dimer mit Daratumumab erfolgreich die komplementvermittelte, CD38-spezifische Zelltötung von Daratumumab verstärken kann, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Effektverstärkung von der Konzentration der eingesetzten Konstrukte abhängig ist.

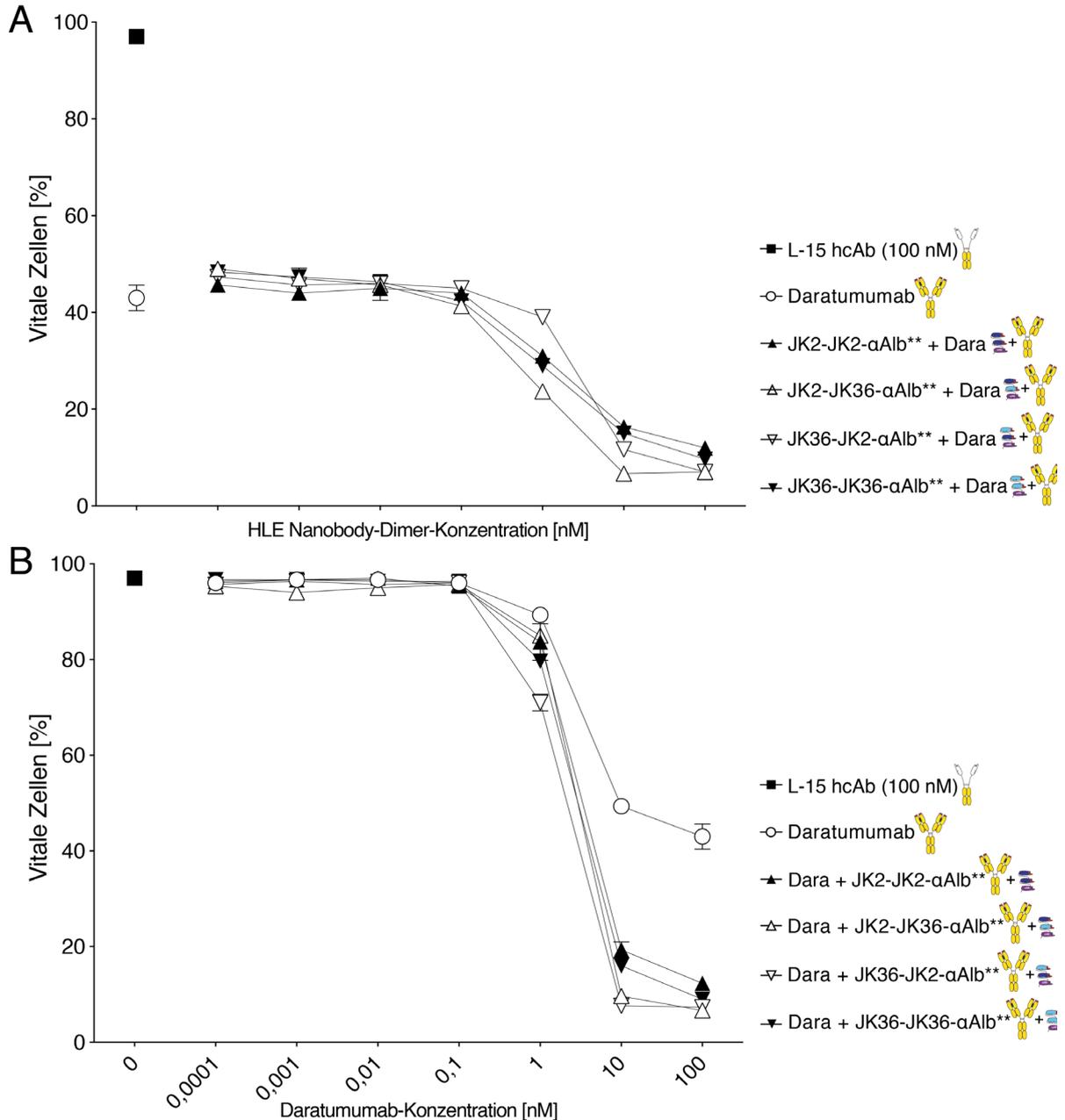


Abbildung 19 | HLE Nanobody-Dimere verstärken den Daratumumab-abhängigen CDC konzentrationsabhängig.

Der CDC-Assay an LP-1 luc Zellen wurde analog den Vorversuchen mit titrierten Mengen von HLE Nanobody-Dimeren (A) bzw. Daratumumab (B) durchgeführt. Nach 10 min Inkubation der Zellen mit Antikörpern und HLE Nb-Dimeren bei 4 °C wurde 12,5 % (vol/vol) natives humanes Serum hinzugefügt und die Zellen wurden für 90 min bei 37 °C weiter inkubiert. Dann wurde die Vitalität der Zellen (GFP+, PI-) analog zu den vorausgehenden Abbildungen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Titration von HLE Nanobody-Dimeren bei konstanter Daratumumab-Konzentration (100 nM), n=3. (B) Titration von Daratumumab bei konstanter Konzentration der HLE Nb-Dimere (100 nM), n=3. Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-.

Zu diesem Zweck wurden äquimolare Mengen der HLE Nanobody-Dimere (**Abb. 19A**) bzw. Daratumumab (**Abb. 19B**) in einer Verdünnungsreihe vorgelegt. Im Falle der HLE Nanobody-Dimere wurden konstant je 100 nM Daratumumab, im Falle von Daratumumab je 100 nM des entsprechenden HLE Nanobody-Dimers hinzugegeben. Der weitere Versuchsablauf erfolgte analog zu den Vorversuchen an LP-1 luc Zellen mit nativem humanem Serum. Die Titrationsanalysen zeigten, dass der Daratumumab-verstärkende Effekt der HLE Nb-Dimere konzentrationsabhängig ist (EC50: ~2-4 nM) (**Abb. 19A**). Auch hier bestätigt sich ab einer eingesetzten Dimer-Konzentration von ≥ 10 nM die Überlegenheit der *biparatopischen* Konstrukte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine minimale Abdeckung von CD38 durch Daratumumab erforderlich ist (≥ 1 nM), um eine entsprechende Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC zu erzielen (**Abb. 19B**).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war ein Zeitraum von 90 Minuten als Standard für eine CDC-Inkubation *in vitro* festgelegt worden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ab welchem Zeitpunkt ein maximaler CDC-Effekt beobachtet werden kann. Hierzu wurde eine CDC-Serie mit 15-minütigen Zeitabständen aufgesetzt (**Abb. 20**). LP-1 luc Zellen wurden in sieben verschiedenen Zeitintervallen mit einer Differenz von je 15 Minuten mit Daratumumab allein oder mit einem HLE-Dimer sowie aktivem humanen Serum bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die vitalen Zellen mittels GFP-Positivität bei gleichzeitigem Fehlen von PI durchflusszytometrisch quantifiziert. Aufgrund der Titrationszeit zwischen den einzelnen Serien sind in der Abbildung zu den Assay-Zeiten jeweils 5 min aufaddiert.

Bereits bei der ersten Messung nach 5 min war ein Daratumumab-abhängiger CDC messbar, der durch Hinzugabe von CD38-spezifischen HLE Nb-Dimeren verstärkt wurde. Bei Hinzugabe des nicht-CD38-bindenden HLE Nb-Dimers s+16dim- α Alb, einem ART2-Antagonisten (Isotypkontrolle), kam es zu keiner Verstärkung des Daratumumab-abhängigen Effekts. Nach Kombination von HLE Nb-Dimeren und Daratumumab war bereits nach 50 min ein Plateau erreicht, bei dem kaum vitale Zellen verblieben. Durch Daratumumab allein wurde im gemessenen Zeitraum von 95 min noch kein Plateau erreicht. Für HLE Nb-Dimere schien bereits ein Zeitraum von 50 min auszureichen, um an LP-1 luc Zellen einen maximalen CDC-Effekt in Kombination mit Daratumumab zu erzielen. Dies deutet stark auf eine zeitliche Beschleunigung des Effekts durch Hinzugabe der HLE Nb-Dimere hin. Die in diesem Experiment verwendete Isotypkontrolle bestehend aus Daratumumab und dem nicht-CD38-bindenden HLE Nb-Dimer s+16dim- α Alb zeigt, dass die beobachtete CDC-Verstärkung durch Hinzugabe HLE Nb-Dimere CD38-spezifisch ist und nicht von anderen Faktoren wie z.B. dem Vorhandensein eines GS-Linkers oder HLE Nb-Dimers per se abhängt.

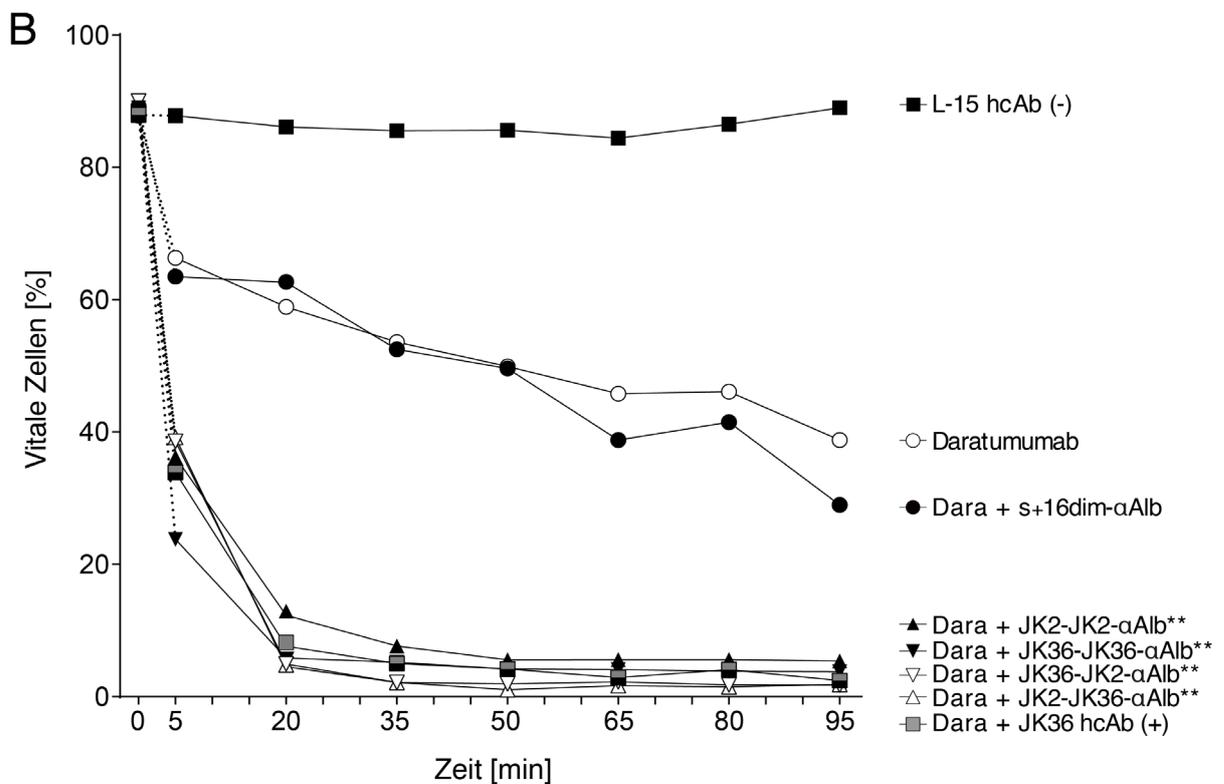
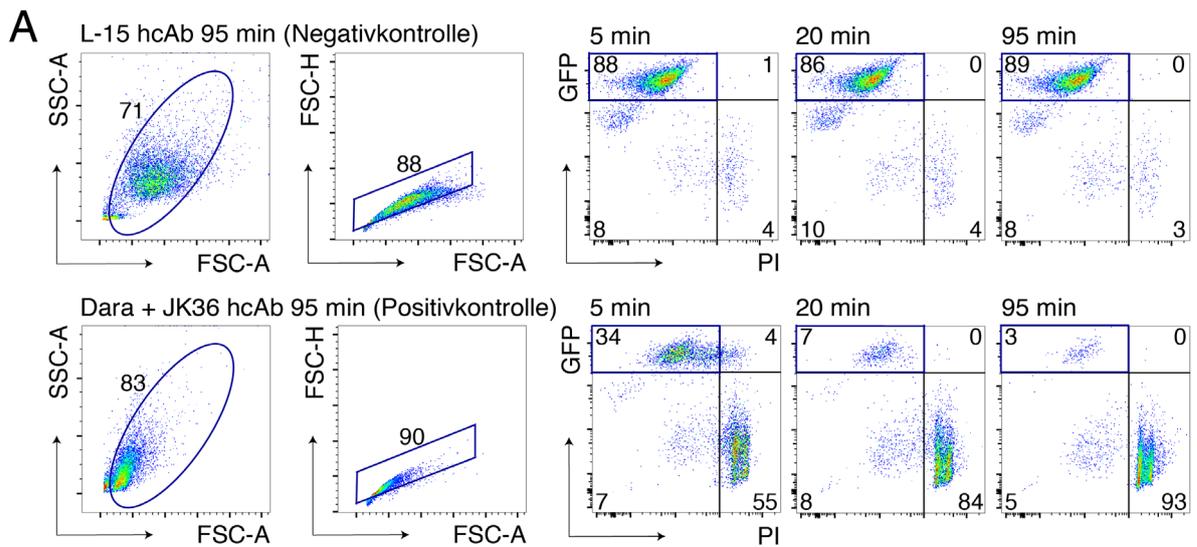


Abbildung 20 | HLE Nanobody-Dimere induzieren eine rasche Verstärkung des Daratumumab-induzierten CDC.

Zu $1,5 \times 10^5$ LP-1 luc Zellen wurden in 15-minütigen Abständen 100 nM Antikörper allein oder mit Nb-Fusionsprotein hinzugegeben, anschließend wurde ohne weitere Zwischeninkubation 12,5 % aktives humanes Serum hinzugefügt und für den angegebenen Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Der 0 min-Wert entspricht einem Set nach Zugabe von inaktiviertem Serum (90 min, 37 °C). Vitale Zellen [%] = GFP+, PI-.

4.2.3 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Weiterhin sollte überprüft werden, ob HLE Nanobody-Dimere auch bei anderen Fc-abhängigen Effektorfunktionen wie dem ADCC verstärkend wirken können.

Hierzu wurden ADCC-Assays an LP-1 Zellen durchgeführt (Abb. 21).

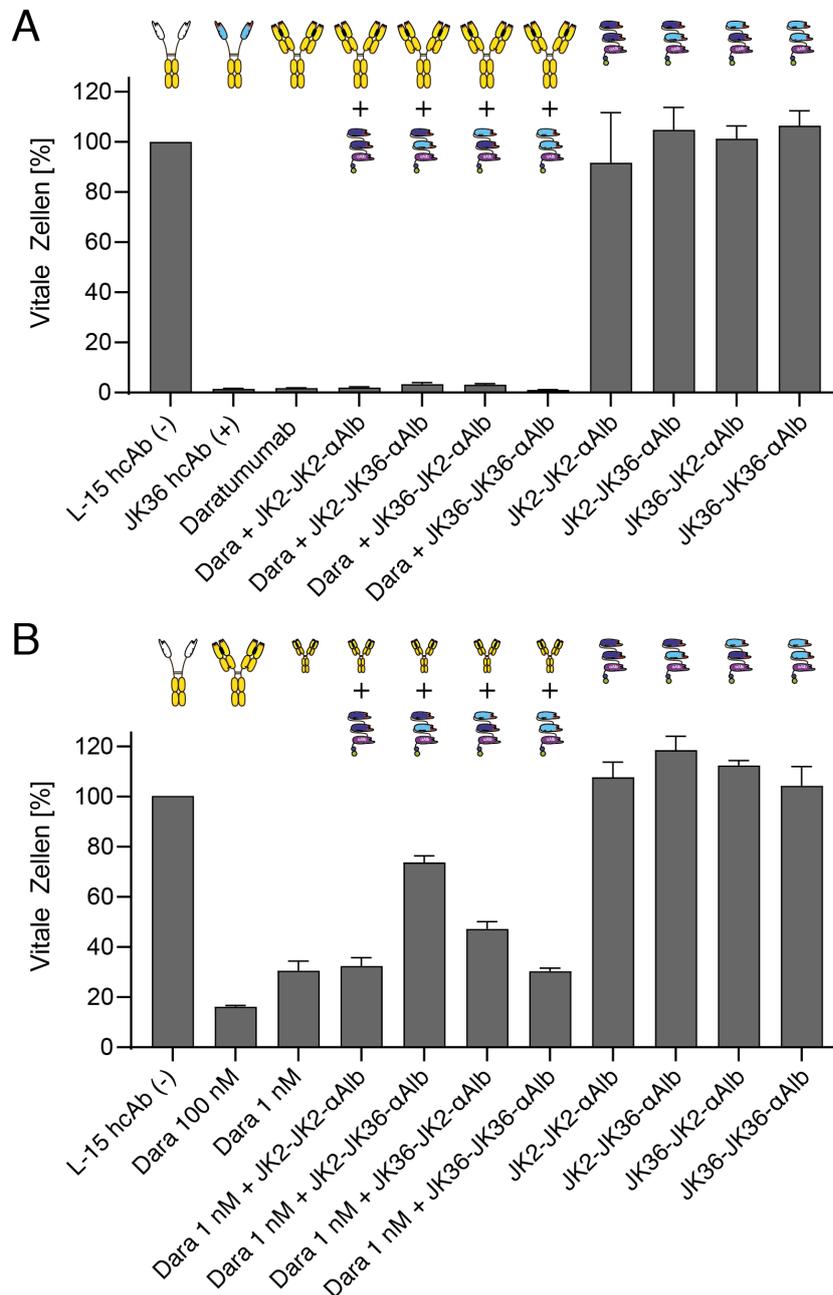


Abbildung 21 | HLE Nanobody-Dimere induzieren keinen ADCC *in vitro*.

ADCC-Assays an LP-1 luc Zellen. Zu $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden 100 nM (A, B) bzw. 1 nM (B) Antikörper und / oder 100 nM HLE Nb-Dimer hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden $4,5 \times 10^5$ NK-92 hCD16 CD38KO Zellen (NK) hinzugefügt und für 150 min bei 37 °C inkubiert. Die Effektor-zu-Target-Ratio (E:T) betrug somit 3:1. **(A)** HLE Nb-Dimere alleine induzieren keinen ADCC. Der Daratumumab-Effekt ist bereits so stark, dass keine Aussage über eine Verstärkung desselben getroffen werden kann. **(B)** Auch bei unvollständiger Zytotoxizität von Dara (1 nM) führt die Hinzugabe der HLE Nb-Dimere zu keiner Verstärkung des Effekts. Die Analyse der Luciferase-Aktivität (BLI) erfolgte luminometrisch nach Hinzugabe von Luciferin. Vitale Zellen [%] = $\text{BLI}_{\text{Probe}} / \Delta \text{BLI}_{\text{L-15 hcAb}} \times 100$.

Als Effektorzelle wurde die etablierte NK-Zelllinie NK-92 in einer Effektor-zu-Target-Ratio [E:T] von 3:1 eingesetzt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war diese Zelllinie bereits stabil mit hCD16 transduziert worden. Mittels CRISPR/Cas war darüber hinaus in diesen Zellen das CD38-kodierende Gen inaktiviert worden. Die neu entwickelte Variante wurde als NK-92 hCD16 hCD38KO bezeichnet (*Schriewer et al. 2020*).

Da sich einzelne unterschiedliche Schwereketten-Antikörper beim ADCC als ähnlich effizient erwiesen hatten wie eine Kombination derselben, wurde bei den ADCC-Assays als Positivkontrolle JK36 hcAb eingesetzt, als Negativkontrolle der nicht-bindende L-15 hcAb. Bei hohen Antikörper-Konzentrationen (100 nM) führten sowohl JK36 hcAb als auch Daratumumab zu einer nahezu vollständigen Lyse der eingesetzten LP-1 luc Zellen (**Abb. 21A**). HLE Nb-Dimere allein hingegen induzierten wie zu erwarten keinen ADCC. Um eine eventuelle Verstärkung des Daratumumab-abhängigen ADCC durch HLE Nb-Dimer sichtbar zu machen, wurde deshalb in einem weiteren Experiment eine hundertfach niedrigere Konzentration (1 nM) von Daratumumab ohne und in Kombination mit HLE Nb-Dimeren eingesetzt (**Abb. 21B**). Hier zeigte sich jedoch keine Verstärkung des Daratumumab-abhängigen ADCC durch die HLE Nb-Dimere; die Zugabe *biparatopischer* Konstrukte (JK2-JK36- α Alb oder JK36-JK2- α Alb) führte sogar zu einer Abschwächung des ADCC.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass HLE Nanobody-Dimere aufgrund ihres fehlenden Fc-Teils *in vitro* keinen ADCC induzieren. Auch führen sie in Kombination mit Daratumumab zu keiner Verstärkung der Daratumumab-abhängigen Zytotoxizität.

4.3 Komplementvermittelte Zytotoxizität an primären Knochenmarkzellen

Die zytotoxische Wirkung verschiedener Nanobody-Fusionsproteine allein oder in Kombination mit Daratumumab wurde im nächsten Schritt mit CDC-Assays *ex vivo* an Knochenmarkproben von Patienten mit Multiplem Myelom überprüft. Hierzu wurden frische Knochenmarkaspirate von Patienten mit Erstdiagnose eines Multiplen Myeloms mittels Dichtezentrifugation zur Isolation von mononukleären Zellen aufbereitet. Die Zellen wurden analog zu den *in vitro* Versuchen für 90 min bei 37 °C mit Daratumumab allein oder in Kombination mit JK36-JK36- α Alb und humanem Serum inkubiert. Auch hier wurde L-15 hcAb als Negativkontrolle, JK36 hcAb in Kombination mit Daratumumab als Positivkontrolle eingesetzt. Anschließend erfolgte die Anfärbung mit Antikörpern gegen CD38, CD138, CD45, CD19, CD56/CD269/CD319 sowie mit Pacific Orange (PacO) als Lebend-Tot-Farbstoff.

Die Anfärbung von CD38 erfolgte jeweils mithilfe eines CD38-spezifischen Nanobodys, der das verbleibende freie Epitop erkennt (respektive MU523-AF680 für Epitop 2 oder JK36-AF680 für Epitop 3). Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert, wobei die Myelomzellen nach Ausschluss von Debris, Dubletten und toten Zellen über ihre Zelloberflächen-Expression von CD38 und CD138 eindeutig zu identifizieren waren.

In diesem Experiment zeigte sich eine deutliche Verminderung der CD38+/CD138+ Myelomzellpopulation bei allen vier Patientenproben nach Behandlung mit Daratumumab (in prozentualen Anteil [%] der lebenden Zellen von 10,9 auf 4,1; von 13,1 auf 2,7; von 22,2 auf 7,5 und von 14,0 auf 7,6) (**Abb. 22A**). Gleichzeitig stieg bei allen Daratumumab-behandelten Proben der Anteil der PacO-positiven Zellen (in [%] von 0,4 auf 1,1; von 0,2 auf 5,1; von 1,2 auf 15,1; und von 0,3 auf 1,8) (**Abb. 22B**). Daratumumab induzierte folglich *ex vivo* eine Zytotoxizität von CD38+/CD138+ Myelomzellen. Die Hinzugabe des CD38-spezifischen Schwereketten-Antikörpers JK36 hcAb zu Daratumumab führte bei allen Proben zu einer leichten bis deutlichen zusätzlichen Verminderung der Myelomzellpopulation (**Abb. 22A, E**) bei gleichzeitiger Steigerung der Population toter Zellen (**Abb. 22B, E**). Die Hinzugabe des HLE Nb-Dimers JK36-JK36- α Alb zu Daratumumab hingegen ergab weder eine belastbare Abnahme der CD38+/CD138+ Myelomzellen noch eine belastbare Zunahme des Anteils der PacO-positiven Zellen (**Abb. 22A, D vs. C 1-4**).

Bei den Patientenproben 3 und 4 wurden als Negativkontrolle auch jeweils ein Ansatz mit inaktiviertem Serum analysiert. Hier zeigte sich eine leichte prozentuale Reduktion der Myelomzellpopulation (von 22,2 auf 15,1 bzw. von 14,0 auf 10,0) (**Abb. 22A**) ohne Zugewinn an toten Zellen im PacO-Gate (**Abb. 22B**). Möglicherweise führte die Antikörperbehandlung hier zu einer Verminderung von CD38 und CD138 auf der Zelloberfläche, etwa durch andere Effektormechanismen, Internalisation oder Shedding.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Daratumumab an primären Knochenmarkzellen eine > 50 %ige Zytotoxizität gegenüber CD38+ Myelomzellen induzierte. Durch zusätzlichen Verlust der CD38- und CD138-Expression führte dies zu einem weitgehenden Verlust der Population aus dem Gate. Eine Verstärkung des Effekts durch Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren, wie es an den Zellkulturzellen eindrücklich gezeigt werden konnte, ließ sich *ex vivo* nicht eindeutig zeigen. Die Hinzugabe des unabhängig bindenden Schwereketten-Antikörpers JK36 hcAb erzielte jedoch bei fast allen Fällen eine zusätzliche Wirkverstärkung.

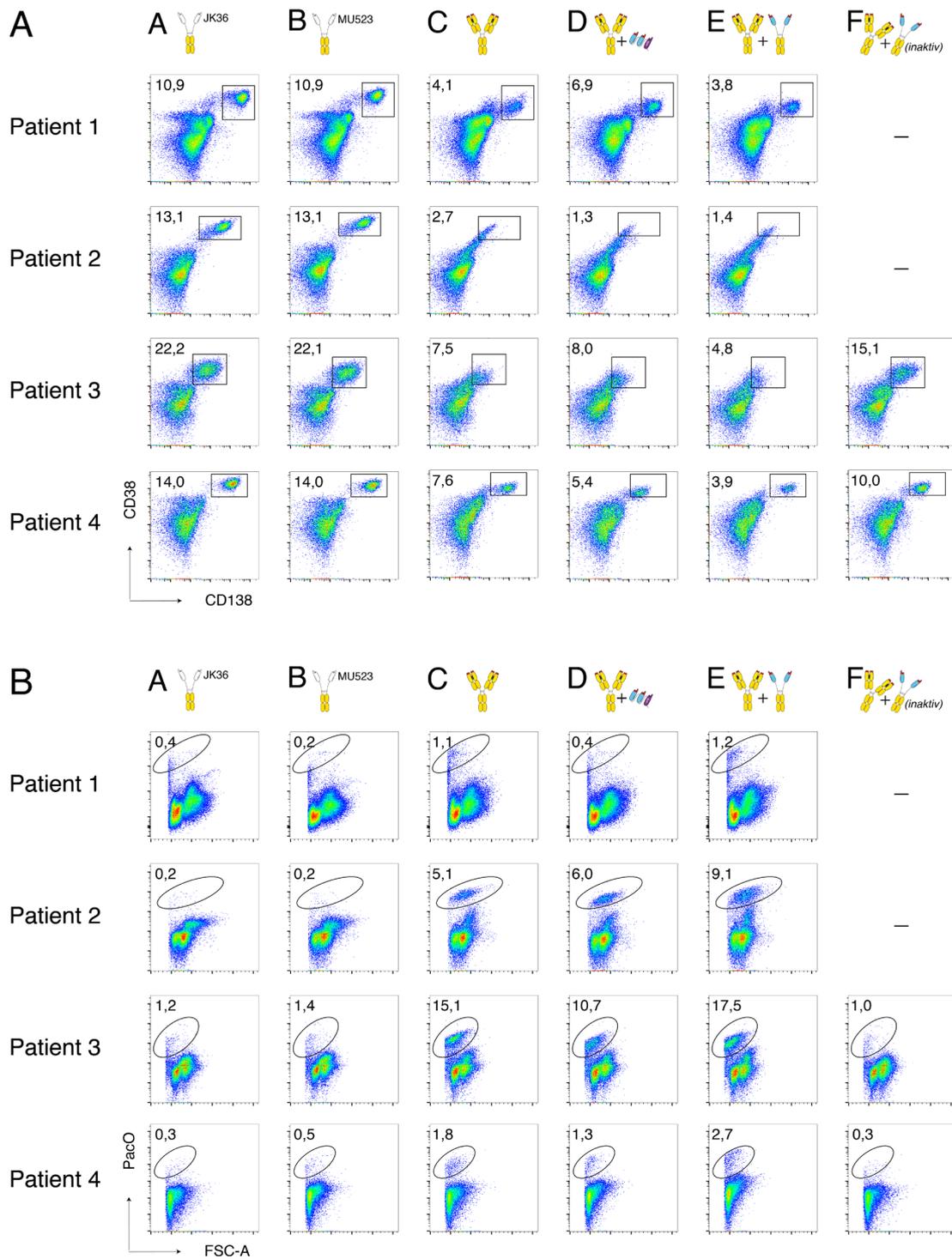


Abbildung 22 | HLE Nb-Dimere induzieren *ex vivo* keine deutliche Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC an CD38+/CD138+ Myelomzellen aus primärem Knochenmark. Graphische Darstellung der CDC-Assays am Knochenmark-Aspirat von vier Patienten mit histologisch gesichertem Multiplem Myelom nach Ficoll-Dichte-zentrifugation. $2,5 \times 10^5$ Zellen aus dem Zellgemisch wurden für 10 min analog den Zellkulturversuchen mit 100 nM Ak und/oder HLE Nb-Dimer vorinkubiert, anschließend mit 12,5 % (vol/vol) nativem/hitzeinaktiviertem Serum für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Myelomzellen sind nach Ausschluss von Debris, Dupletten und toten Zellen über ihre CD38- sowie CD138-Positivität leicht zu identifizieren. Da die Daten Auszüge aus einem größeren Experiment darstellen, erfolgte die Anfärbung von L-15 hcAb, JK36-JK36- α Alb und Daratumumab + JK36-JK36- α Alb mit MU523-AF647 (α CD38) bzw. für L-15 hcAb und Daratumumab mit JK36-AF647 (α CD38). Darüber hinaus erfolgte die Anfärbung mit α CD138-BV421 und PacO (30 min, 4 °C). **(A)** Auswertung der CD38+/CD138+ Myelomzellpopulation. **(B)** Gating auf tote Zellen (PacO+).

4.4 Fluorochrom-Konjugation von Nanobodies und *in vivo* Targeting-Experimente

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatte sich die murine Tumorzelllinie YAC-1 als Allograft-Modell durch ihr homogenes und reproduzierbares Wachstum in einem verhältnismäßig kurzen Zeitraum (7-14d) bewährt (Kunick 2019). Um eine dauerhafte Expression von hCD38 auf der Zelloberfläche der murinen Zellen zu erzielen, waren diese Zellen über Elektroporation mit einem Expressionsvektor für hCD38 stabil transfiziert worden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden sowohl die parentalen CD38-negativen als auch die stabil mit hCD38 transfizierten Zellen zusätzlich mit GFP sowie Luziferase lentiviral stabil transduziert. Es ergab sich entsprechend das Expressionsmuster YAC-1 luc (CD38-, GFP+, Luziferase+) sowie YAC-1 hCD38 luc (CD38+, GFP+, Luziferase+). Diese Zelllinien wurden für die nachfolgenden *in vivo* Bildgebungsversuche eingesetzt.

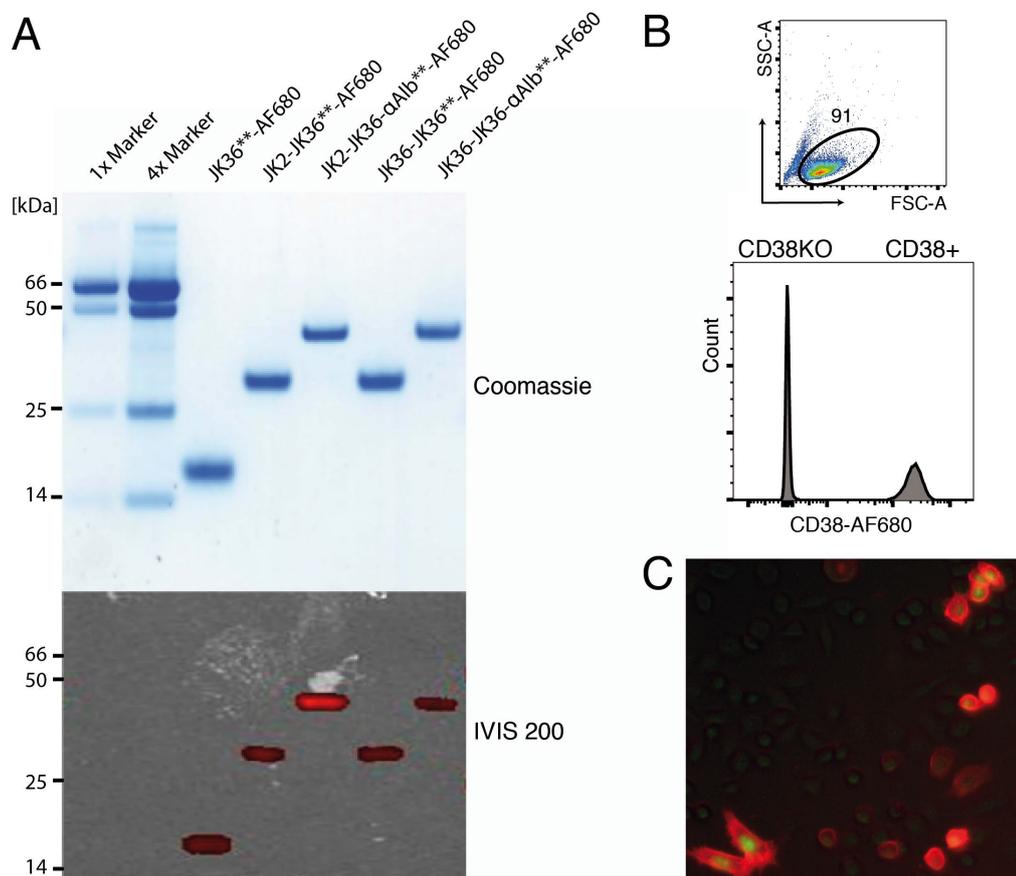


Abbildung 23 | Kopplung von Nanobody-Fusionsproteinen an den Nah-Infrarot-Farbstoff Alexa Fluor 680 für *in vivo*-Bildgebungsversuche.

Nb-Fusionsproteine wurden aus dem Kulturüberstand transient transfizierter HEK-6E Zellen gewonnen, an Nickel-NTA- bzw. Protein-A-Säulen aufgereinigt und an Nah-Infrarot Farbstoffe (Alexa Fluor 680) gekoppelt. (A) SDS-PAGE AF680-gekoppelter Nb-Fusionsproteine mit Coomassie-Staining (oben) sowie im IVIS200-Gerät (unten). (B) Spezifische Anfärbung CD38+ Zellen durch JK2-JK36- α Alb**-AF680 in einer Mischung aus hCD38+ und hCD38- YAC-1 luc Zellen. (C) Immunhistologischer Nachweis der CD38-spezifischen Anfärbung mit JK2-JK36- α Alb**-AF680 an transient transfizierten, fixierten CD38+ CHO-Zellen (GFP cotransfiziert).

Für die molekulare Bildgebung von CD38-exprimierenden Tumoren *in vivo* wurden verschiedene aufgereinigte Nanobody-Fusionsproteine an das Nah-Infrarot-Fluorochrom AF680 gekoppelt (**Abb. 23**). Der Fluorochromfarbstoff wurde dabei über einen Succinimidylester mit freien Aminogruppen verbunden. Der Kopplungserfolg wurde nach Größenfraktionierung der Proteine mittels SDS-PAGE am IVIS200-Gerät überprüft (**Abb. 23A**). Die SDS-PAGE zeigte nach Coomassie-Färbung die unterschiedlichen Nb-Formate (**Abb. 23A**): Das Nb-Monomer wies das geringste Molekulargewicht mit ca. 15 kDa auf, gefolgt von dem Nb-Dimer mit ca. 30 kDa und dem HLE Nb-Dimer mit ca. 45 kDa. Die Fluoreszenzaufnahme desselben Gels im IVIS200 zeigte die erfolgreiche Kopplung des Nah-Infrarot-Farbstoffes AF680. Die Rechnung zur Beurteilung des Kopplungserfolgs ergab 0,07 Fluorochrompartikel / Molekül (F/M) für JK36**, 0,09 F/M für JK36-JK36**, 0,12 F/M für JK2-JK36**, 0,14 F/M für JK36-JK36- α Alb** sowie 0,47 F/M für JK2-JK36- α Alb**. Die spezifische Anfärbung von CD38+ Zellen durch das Fluorochrom-konjugierte JK2-JK36- α Alb wurde durchflusszytometrisch (**Abb. 23B**) und immunhistologisch (**Abb. 23C**) analysiert. Diese Ergebnisse bestätigen die CD38-spezifische Detektion durch JK2-JK36- α Alb**-AF680.

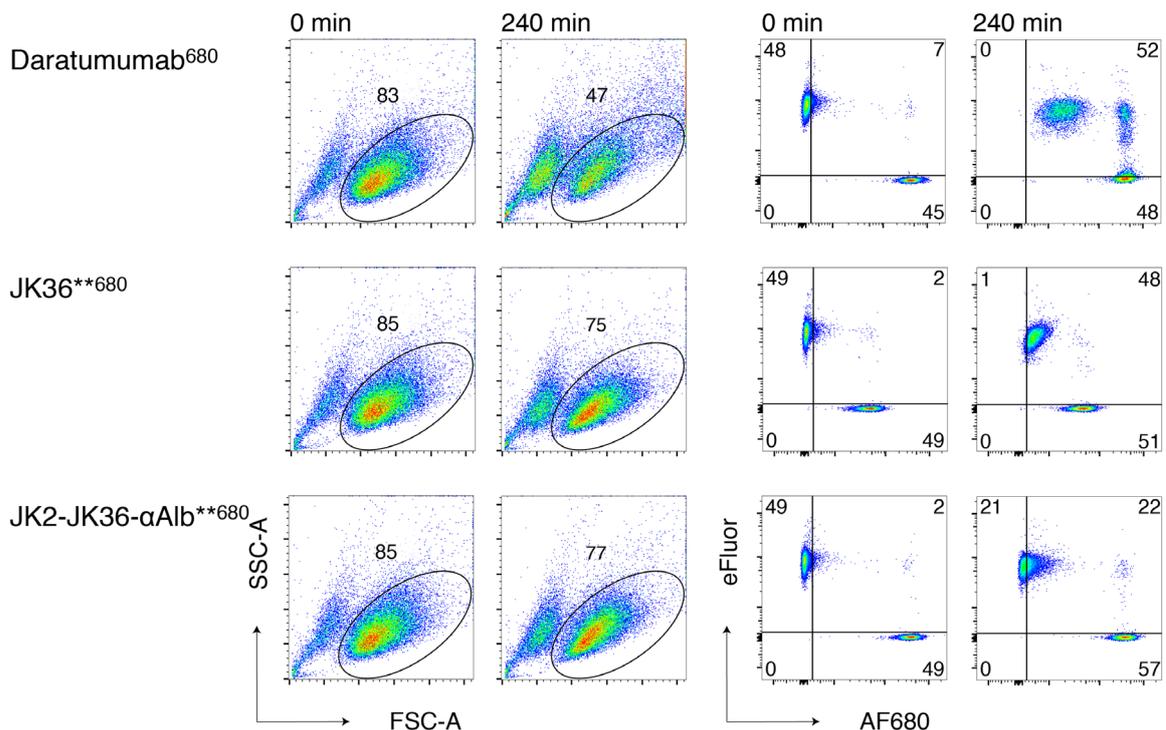


Abbildung 24 | AF680-konjugierte biparatopische HLE Nanobody-Dimere zeigen im Vergleich mit dem Monomer und Daratumumab *in vitro* die stabilste Antigenbindung bei Raumtemperatur. Zeitlicher Verlauf der MFI-Änderungen des konjugierten Monomers, HLE Nb-Dimers und Daratumumab. 5×10^4 Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit einem Überschuss des AlexaFluor⁶⁸⁰-konjugierten Monomers, HLE Nb-Dimers oder Daratumumab inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Verlust der zellassoziierten Fluoreszenz nach 240 min bei Raumtemperatur durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ ein Aliquot CD38-exprimierender YAC-1 luc Zellen (eFluor450-markiert) als Bindungspartner für die dissoziierten Konstrukte in die Mischung gegeben.

Um die Bindungsavidität der Fluorochrom-gekoppelten Konstrukte an CD38 zu bestimmen, wurden YAC-1 Zellen für 30 min mit einem Überschuss des AlexaFluor⁶⁸⁰-konjugierten Nb-Monomers, HLE Nb-Dimers oder Daratumumab inkubiert. Ungebundene Konstrukte wurden durch Waschen der Zellen entfernt und der Verlust der zellassoziierten Fluoreszenz bei Raumtemperatur durchflusszytometrisch analysiert (**Abb. 24**). Als „Fänger“ für dissoziierte Antikörper wurde ein Aliquot eFluor450-markierter YAC-1 Zellen hinzugefügt. Daratumumab zeigte nach vier Stunden die stärkste Dissoziation von eFluor450-negativen Zellen bei gleichzeitiger Assoziation mit eFluor450-positiven Zellen, JK2-JK36- α Alb** wies die geringste Dissoziation von den YAC-1 Zellen auf. Nach Hinzugabe von Daratumumab erschien die Population von lebenden YAC-Zellen nach 60 min darüber hinaus deutlich reduziert (von 83 % auf 47 %) und es ergab sich eine starke, doppelt positive Population (eFluor+/AF647+). Diese Ergebnisse zeigen, dass JK2-JK36- α Alb** verglichen mit JK36** und Daratumumab die höchste Antigenavidität bei Raumtemperatur besitzt.

Die Fähigkeit des Fluorochrom-konjugierten HLE Nb-Dimers JK2-JK36- α Alb, CD38+ Tumorzellen *in vivo* zu erreichen, wurde in dem etablierten subkutanen Allograft-Mausmodell mithilfe des *in vivo* Imaging-Systems IVIS 200 überprüft (**Abb. 25**). Um interindividuelle Unterschiede auszuschließen, wurden einer immundefizienten Nacktmaus (Mauslinie: NMRI nu/nu, Janvier Labs) hCD38-negative murine YAC-1 Lymphomzellen auf Höhe des linken und hCD38-positive YAC-1 Lymphomzellen auf Höhe des rechten Vorderlaufs injiziert. Da es sich um einen Ausschnitt aus einem kleinen Pilotexperiment handelt, betrug die Anzahl der mit diesem Antikörper injizierten Tiere $n = 2$. Sieben Tage nach subkutaner Implantation der Tumorzellen wurde das HLE Nb-Dimer injiziert. NIRF-Imaging wurde unmittelbar vor sowie 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24h nach Injektion des HLE Nb-Dimers durchgeführt (**Abb. 25A**).

Es zeigte sich nach spätestens 8h eine klare Differenz in der Fluoreszenzintensität zwischen CD38+ und CD38- Tumor (**Abb. 25A, B**). Das Signal im Bereich der CD38+ Tumoren stieg hier bis zum gemessenen Zeitpunkt von 24 Stunden nach Injektion des HLE Nb-Dimers zunehmend. Unter Vernachlässigung des 6 h-Wertes aufgrund einer Linkskrümmung der Maus in der IVIS-Aufnahme stieg das Signal nahezu logarithmisch mit Annäherung an ein Plateau.

Da die Zuteilung „Maus – injiziertes Konstrukt“ zufällig und erst nach Käfigbesetzung erfolgt war, kam es zu keiner strikten Separation der Mäuse in den Käfigen entsprechend ihrer injizierten Konstrukte. Die in der Abbildung sichtbaren Artefakte an Kopf, Rücken, ggf. Tumorbereich, Hinterlauf sowie Schwanz der Maus waren auf Kontaminationen mit Urin der anderen Mäuse im Verlauf des Experiments zurückzuführen und somit auch bei einer Maus sichtbar, der kein Tumor injiziert wurde (**Appendix 6**).

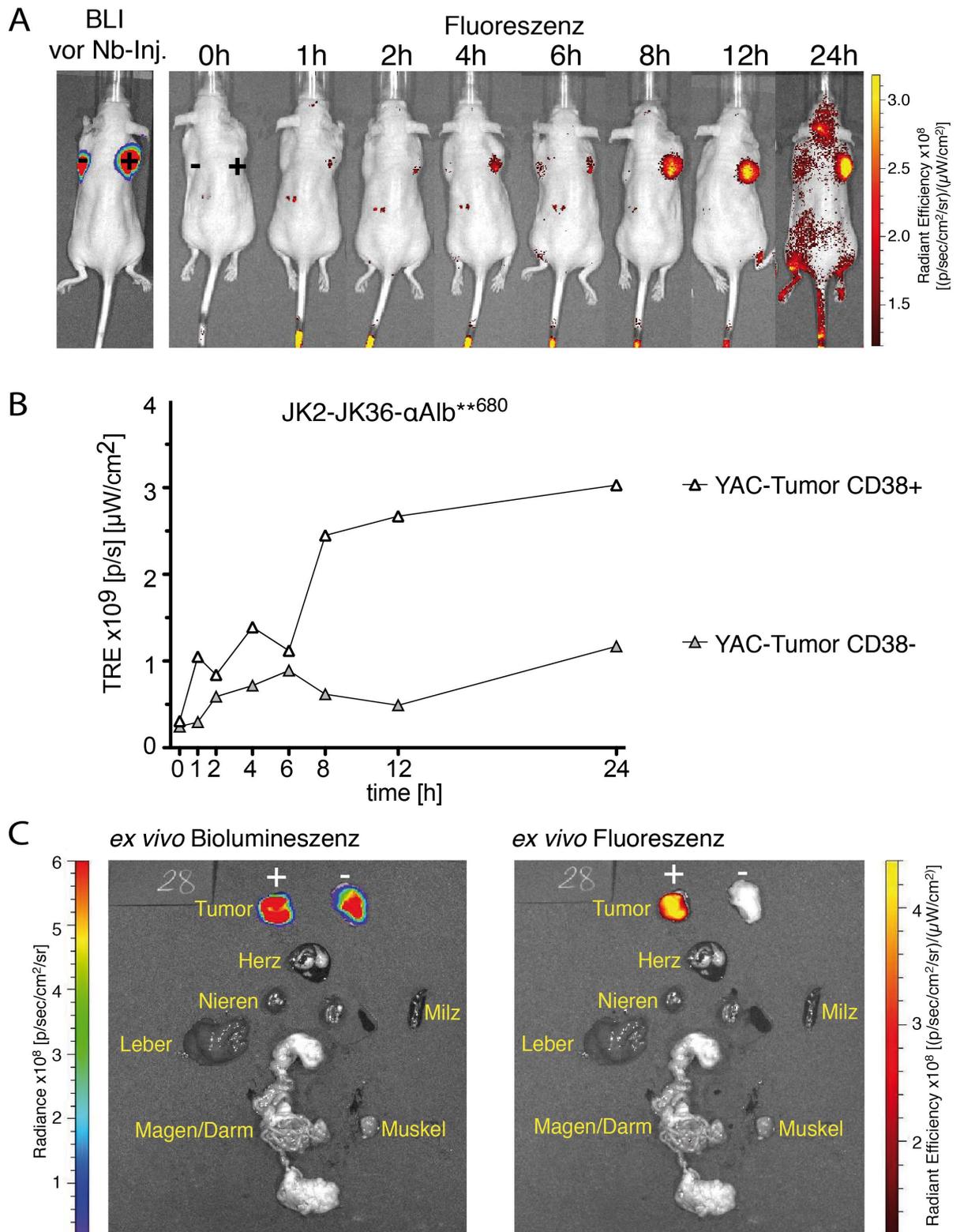


Abbildung 25 | Biparatopische NIRS-markierte HLE Nanobody-Dimere zeigen eine spezifische Anfärbung CD38-positiver subkutaner Allograft Lymphome *in* und *ex vivo*.

7d nach s.c. Implantation von CD38-positiven (+) und CD38-negativen (-) YAC-1 Zellen wurde einer NMRI nu/nu Maus eine Dosis von 15 μg JK2-JK36-αAlb^{**}-AF680 injiziert. (A) NIRS-Imaging wurde vor, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 h nach Injektion durchgeführt. (B) Der Gesamtfluss wurde semi-quantitativ mittels ROI auf die Tumoren (+/-) bestimmt. TRE = Total Radiant Efficiency. (C) Biolumineszenz und Fluoreszenz der Gewebe post mortem, ca. 24 Stunden nach Nanobody-Injektion.

In diesem Versuch wurde kein Mausurin gewonnen. Die Maus mit injiziertem HLE Nb-Dimer zeigte jedoch im Gegensatz zu einer Maus mit injiziertem Monomer ohne HLE zu keinem Zeitpunkt eine Anfärbung der Harnblase (**Appendix 7**). Dies spricht für eine ausbleibende renale Filtration der HLE Nb-Dimere.

In der nachfolgenden Analyse *ex vivo* (**Abb. 25C**) zeigten sich die soliden Tumoren analog ihrem Expressionsmuster in der Biolumineszenz Luciferase-positiv, ein Fluoreszenz-Signal war jedoch nur in den hCD38⁺ Tumoren sichtbar.

Dies bestätigt das präzise Targeting der HLE Nb-Dimere.

In den ergänzenden *ex vivo* Analysen (**Abb. 26**) sollte nun das Bindungsverhalten des HLE Nb-Dimers näher untersucht werden. Hierzu wurden die Tumoren entnommen und halbiert. Die eine Hälfte wurde für anschließende FACS-Analysen in Suspension gebracht, die andere für die immunhistologische Aufarbeitung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Zellsuspension wurde durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP und AF680 untersucht. Um zu testen, welcher Anteil der verfügbaren Epitope tatsächlich durch das HLE Nb-Dimer gebunden war, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich *ex vivo* mit JK2-JK36- α Alb nachgefärbt (**Abb. 26A**). An den CD38-negativen YAC-Tumorzellen war weder *in vivo* noch *ex vivo* ein AF680-Signal detektierbar. Die CD38-positiven Tumore hingegen wiesen zwar ein AF680-Signal auf, dieses war jedoch heterogen verteilt und hinterließ > 60 % der GFP⁺ Zellen ohne AF680-Signal. Die *ex vivo* Nachfärbung mit dem eingesetzten HLE Nb-Dimer bewirkte eine stärkere und zugleich vollständige Anfärbung der GFP-positiven, sowie einiger weniger GFP-negativer Zellen. Überraschend ist, dass die CD38-positiven YAC-Tumoren nach Explantation zwar sehr hohe Fluoreszenzwerte in der NIRF-Bildgebung aufwiesen (**Abb. 25C**), in der anschließenden FACS-Analyse jedoch nur ein schwaches bzw. gar kein AF680-Signal im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar war (**Abb. 26A**).

Zur weiteren Analyse der Beobachtungen wurden die ca. 2 μ m dicken DAPI-gefärbten Paraffinschnitte (erstellt durch die hausinterne Core Facility für Mauspathologie) unter dem ApoTome näher untersucht. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt **Abb. 26B**. Abgebildet sind je zwei Vergrößerungen dreier solider Tumore: der CD38-positiv YAC-1 luc Tumor einer Maus ohne Injektion sowie der CD38-positiv und CD38-negativ YAC-1 luc Tumor der Maus aus **Abb. 25** nach Injektion von JK2-JK36- α Alb. Einzig am Positivtumor der Dimer-Maus *ex vivo* war in der 5-fachen Vergrößerung ein pinkes Signal erkennbar. Bei 20-facher Vergrößerung fiel auf, dass dieses Signal diffus-clusterförmig um die DAPI-positiven Zellen lag. Hierbei handelte es sich um die injizierten HLE Nb-Dimere, die auf der Zelloberfläche CD38-positiver Zellen gebunden hatten.

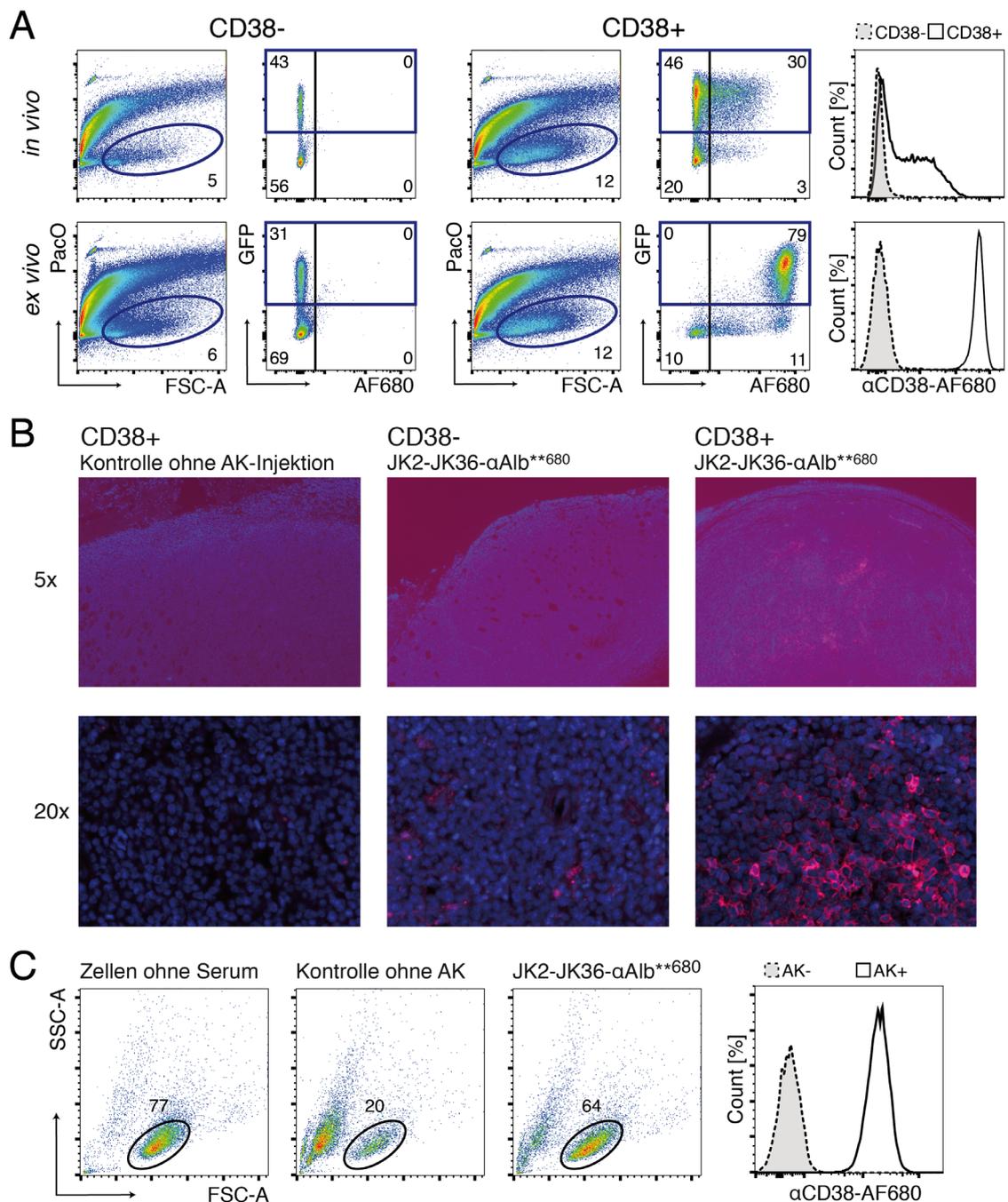


Abbildung 26 | Die Opsonierung der Tumorzellen durch *biparatopische* HLE Nb-Dimere⁶⁸⁰ lässt sich sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch bestätigen. Auch im Serum ist JK2-JK36 α Alb⁶⁸⁰ noch in großen Mengen nachweisbar.

(A) Die soliden YAC-Tumore wurden explantiert, halbiert und eine Hälfte wurde nach Hinzugabe von 0,25 mg/mL Collagenase D sowie 10 u/mL DNaseI im GentleMACS enzymatisch und mechanisch verdaut. Anschließend wurden 50 % der Zellen mit PacO angefärbt (*in vivo*), die andere Hälfte wurde zusätzlich zu PacO mit einem Überschuss an JK2-JK36- α Alb⁶⁸⁰ nachgefärbt (*ex vivo*). Gating: YAC-1 Zellen waren durch ihre GFP-Positivität gut von anderen Mauszellen zu unterscheiden. (B) Die verbleibende Hälfte der Tumoren wurde in Formalin (4 %) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die ca. 2 μ m dicken Schnitte wurden mit DAPI angefärbt und unter dem ApoTome (5x/0.16, 20x/0.8) untersucht. Die Bildakquise erfolgte via AxioCAM HR3. Blau (DAPI) = Zellkerne mit DNA, pink = JK2-JK36- α Alb⁶⁸⁰. (C) Das Mausserum der Kontrollmaus ohne Antikörperinjektion (Kontrolle ohne AK; AK-) sowie der Maus mit injiziertem HLE Nb-Dimer (JK2-JK36- α Alb⁶⁸⁰; AK+) wurde auf verbleibende AK gescreent. Hierzu wurden 1×10^5 CA-46 Zellen mit 9 % Mausserum (vol/vol) bzw. 9 % PBS + 0,2 % BSA (Zellen ohne Serum) für 30 min bei 4 °C inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert (n=3).

Bei 20-facher Vergrößerung war auch im Paraffinschnitt des Negativtumors ein dezentes, pinkfarbenes Signal zu erkennen, das jedoch interzellulär und a.e. vermutlich intravasal lag. Dieses Signal wies auf das Vorhandensein des zirkulierenden Nanobodies auch in den Blutgefäßen des Negativtumors hin.

Diese ersten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Opsonierung der Tumorzellen mit den HLE Nb-Dimeren CD38-spezifisch aber heterogen erfolgt, was auch die Nachfärbbarkeit der Epitope *ex vivo* erklären würde. Von einer reinen Oberflächenanfärbung der soliden Tumore ist bei fehlender Anfärbung des sichtbaren Tumorrandes in **Abb. 26B** nicht auszugehen.

Um herauszufinden, ob der heterogenen Anfärbung der soliden Tumore durch das injizierte HLE Nb-Dimer JK2-JK36- α Alb⁶⁸⁰ ein Antikörpermangel im Blut zugrunde liegt, wurden zuletzt Serumproben der Negativkontroll-Maus sowie der Dimer-Maus entnommen, in einer 1:10 Verdünnung für 30 Minuten mit CD38⁺ Zellen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (**Abb. 26C**).

In der Serumprobe der Dimer-Maus zeigte sich ein starkes CD38⁺ Signal, was das Vorhandensein von HLE Nb-Dimeren im Blutkreislauf der Maus nach >24h beweist. Nach über 24h befanden sich noch ausreichend Antikörper im Körperkreislauf der Maus. Dies erklärt folglich nicht die beobachtete heterogene Anfärbung der CD38-positiven Tumorzellen, beweist jedoch die ausbleibende renale Filtration der HLE Nb-Dimere durch Bindung an Albumin.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität von Daratumumab in Kombination mit CD38-spezifischen HLE Nanobody Dimeren gegenüber humanen Lymphomzelllinien und primären Knochenmarkzellen sowie die Pharmakokinetik von systemisch injizierten CD38-spezifischen HLE Nanobody-Dimeren in einem Allograft-Mausmodell untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Sensitivität von humanen Zelllinien gegenüber dem CDC von der Expressionsstärke sowohl des Targets CD38 als auch der Komplement-inaktivierenden Ektoenzyme CD55 und CD59 auf der Zelloberfläche abhängt. Die HLE Nanobody-Dimere steigerten den Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber Lymphomzelllinien. Dieser Effekt war gegenüber Myelomzellen aus primären Knochenmarkproben nicht in gleicher Weise zu beobachten. Die Ergebnisse des *in vivo* Imaging-Versuchs an subkutane Tumore tragenden Mäusen zeigen, dass Fluorochrom-konjugierte HLE Nanobody-Dimere innerhalb von acht Stunden nach intravenöser Injektion spezifisch CD38-exprimierende, nicht aber CD38-negative Tumorzellen erreichten.

5.1 Die Zelloberflächenexpression von CD38, CD55 und CD59 beeinflusst die CDC-Sensitivität von Tumorzelllinien

Das Komplementsystem ist ein Teil der unspezifischen humoralen Immunantwort. Durch Bindung von hexamerem C1q an gebundene Antikörper-Oligomere wird eine Enzymkaskade in Gang gesetzt, die über kovalente Bindung des C3-Spaltproduktes C3b und anschließende Insertion des MAC-Komplexes in die Zellmembran die Lyse der Zelle durch Porenbildung zur Folge hat (*Murphy and Weaver 2018*).

Humanes Serum kann als Quelle für Komplementfaktoren benutzt werden (*Inglis et al. 2008*). Durch Erhitzen des Serums auf 56 °C werden die enzymatischen Komponenten der Komplementkaskade inaktiviert (*Gstraunthaler and Lindl 2021*). Die Fc-Bindungsaffinität von C1q bleibt hingegen auch nach Hitzeinaktivierung des Serums erhalten (**Abb. 10**). Hitzeinaktiviertes humanes Serum diente als Negativkontrolle in sämtlichen CDC-Assays dieser Arbeit zur Verifikation der komplementvermittelten Tötung. Komplement-Inhibitoren wie CD55 und CD59 verhindern nicht die Bindung von C1q, hemmen jedoch die Ausbildung der Poren durch Inhibierung der nachgeschalteten Enzymkaskade (*Rink et al. 2015*).

Mehrere Faktoren beeinflussen die Empfindlichkeit einer Zelllinie gegenüber dem CDC: Die CDC-Effizienz wird positiv durch die Höhe der CD38-Expression auf der Zelloberfläche

sowie negativ durch Hemmung der Komplement-Kaskade, d.h. zusätzliche Expression von Komplement-Inhibitoren wie z.B. CD55 und CD59 beeinflusst.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit vier CD38-exprimierenden Lymphomzelllinien (**Abb. 9-12**) lassen sich anhand der beschriebenen Wirkmechanismen erklären: Eine hohe CD38-Expression (LP-1, CA-46, RPMI-8226) führt zu einer vermehrten Bindung von Fc und konsekutiv über C1q-Bindung zu einer Initiierung der Komplementkaskade. Läuft diese vollständig ab, mündet sie in die Lyse der Zielzelle, die im CDC-Assay quantifiziert wird (LP-1, CA-46). Besteht parallel jedoch eine hohe Expression von Komplementinhibitoren wie CD55 und CD59, kommt es im weiteren Verlauf zu einem Abbruch der Komplementkaskade und folglich keiner Lyse der Zielzellen (RPMI-8226). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Patienten mit Multiplem Myelom: Im Falle einer erhöhten CD38-Expression auf Myelomzellen kam es zu einer signifikanten Verstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC. Im Tumorrezidiv ließ sich auf den Myelomzellen eine Hochregulierung von CD55 und CD59 nachweisen, was ihre Resistenz gegenüber der Daratumumab-abhängigen Zytotoxizität erklärt (*Nijhof et al. 2016*). Aufgrund der Möglichkeit einer Komplementinhibition durch CD55 und CD59 liefert der alleinige Nachweis einer C1q-Bindung folglich keinen Beweis für den vollständigen Ablauf der Komplementkaskade und ist somit kein sicherer Indikator für eine nachfolgende Lyse.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass *in vitro* die Sensitivität gegenüber dem CDC auch durch induziertes Shedding von CD55/CD59 oder das Unterbinden der Expression von CD55/CD59 erhöht werden kann (*Geis et al. 2010, Nijhof et al. 2016*). Möglicherweise könnte angelehnt an *Ziller et al. 2005* auch eine Blockade der Enzymaktivität von CD55 und CD59 durch inhibitorische Nanobodies eine CDC-Verstärkung hervorrufen bzw. eine bestehende Unempfindlichkeit aufheben. Aufgrund ihrer kleineren Größe, besseren Gewebepenetration und günstigeren Produktion hätten auch hier CD55- oder CD59-blockierende Nanobodies einen Vorteil gegenüber Antikörpern.

5.2 HLE Nb-Dimere steigern den Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber Lymphomzelllinien, nicht aber gegenüber primären Myelomzellen

Ein monoklonaler Antikörper wie Daratumumab kann allein maximal zwei CD38-Moleküle simultan binden. Die Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren führt vermutlich zu einer Kreuzvernetzung der CD38-Moleküle zu CD38-Multimeren auf der Zelloberfläche. Die Steigerung des Daratumumab-abhängigen CDC gegenüber Lymphomzelllinien durch HLE Nb-Dimere könnte somit durch eine erleichterte bzw. beschleunigte Bindung des Hexamers

C1q an die Fc-Regionen (**Abb. 4, Abb.14**) und eine damit verbundene Intensivierung der komplementvermittelten Zytotoxizität *in vitro* erklärt werden.

Die Verstärkung der Daratumumab-induzierten C1q-Bindung sowie des CDC war durch die *biparatopischen* Konstrukte JK2-JK36- α Alb und JK36-JK2- α Alb größer als durch die *bivalenten* Konstrukte JK2-JK2- α Alb und JK36-JK36- α Alb (**Abb. 13, 14, 16, 17**). Auch wenn in beiden Fällen eine Kreuzvernetzung von CD38 auf der Zelloberfläche ermöglicht wird, zeigt **Abb. 27**, dass zwischen 12 CD38-Molekülen durch die Kombination aus Daratumumab und einem *bivalenten* HLE Nb-Dimer maximal 12 parallele Verbindungsmöglichkeiten bestehen können. Durch die Kombination aus Daratumumab und einem *biparatopischen* HLE Nb-Dimer können hingegen anderthalbmal so viele, also 18 parallele Verknüpfungen geschaffen werden. Diese intensivierte Vernetzung könnte die bessere C1q-Bindung und infolgedessen größere CDC-Verstärkung durch *biparatopische* HLE Nanobody-Dimere erklären.

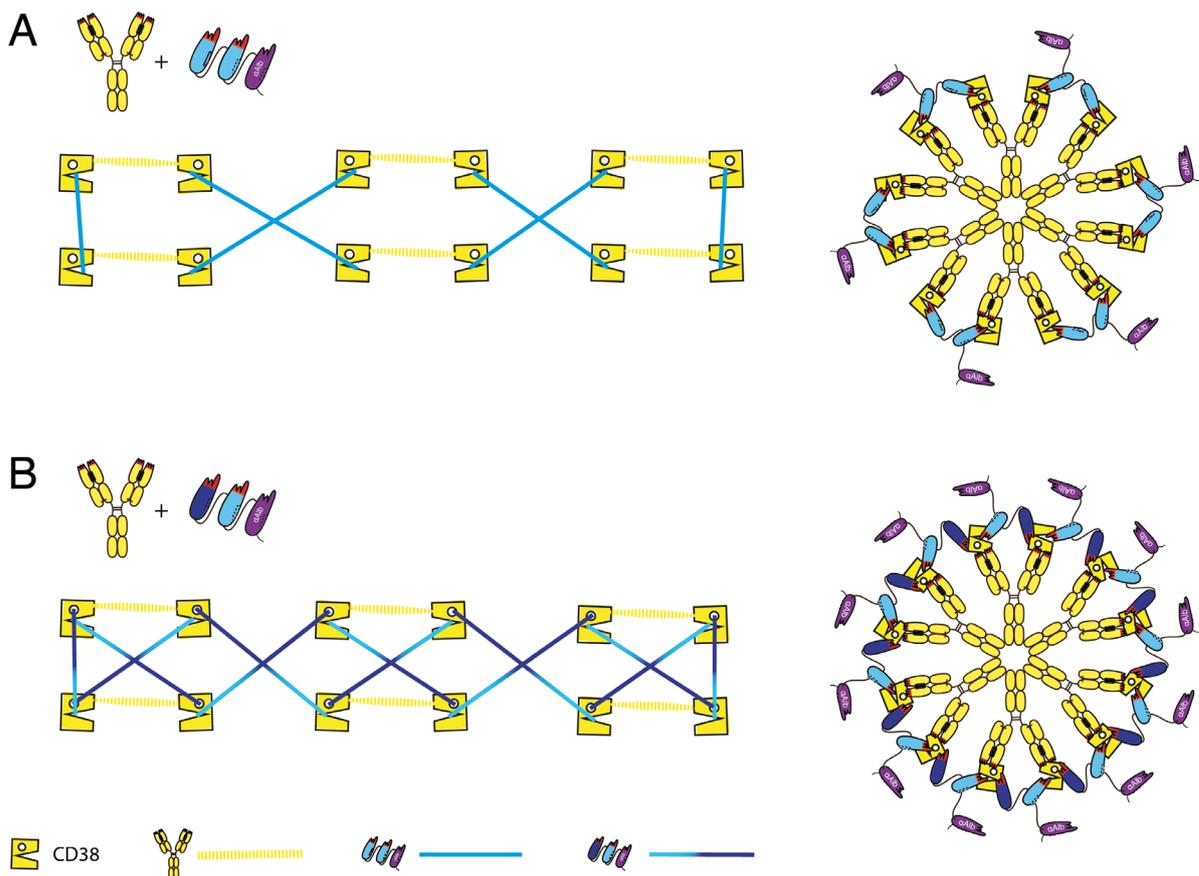


Abbildung 27 | Biparatopische HLE Nanobody-Dimere induzieren vermutlich aufgrund der intensiveren Kreuzvernetzung eine potentere Verstärkung des CDC als bivalente Dimere. Zwischen 12 CD38-Molekülen können durch die Kombination aus Daratumumab (gelbe Linie) und einem *bivalenten* HLE-Dimer (hellblaue Linie) maximal 12 parallele Verbindungsmöglichkeiten bestehen (**A**), während durch die Kombination aus Daratumumab und einem *biparatopischen* HLE Nb-Dimer (hell-dunkelblaue Linie) anderthalb mal so viele, nämlich 18 parallele Verknüpfungen geschaffen werden können (**B**).

Zudem zeigte sich, dass weder die Epitop-Tags (myc, his₆) noch der Albumin-spezifische Nanobody einen relevanten Einfluss auf den CDC haben (**Abb. 16, Abb. 17**). Eine denkbare Verstärkung des CDC aufgrund von präformierten Tag-reaktiven Antikörpern im Serum ist somit eher unwahrscheinlich.

Die Kombination aus Schwereketten-Antikörper und HLE Nb-Dimer bei Belegung desselben Epitops induzierte keine Verstärkung des CDC (*Ergebnisse nicht gezeigt*). Ähnliche Ergebnisse hatte unsere Arbeitsgruppe zuvor auch bei der Kombination von zwei Schwereketten-Antikörpern erhoben (*Schütze et al. 2018*). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HLE Nb-Dimere über Kreuzvernetzung der CD38-Moleküle eine Zunahme der lokalen Fc-Dichte von gebundenen Daratumumab-Molekülen auf der Zelloberfläche induzieren.

Für den ADCC ist ein Zusammenhang zwischen Antigendichte bzw. der Menge gebundener Antikörper und der Intensität des ADCC beschrieben (*Temming et al. 2019*). Die Ergebnisse des ADCC-Experiments dieser Arbeit sowie weitere ADCC-Assays unserer Arbeitsgruppe (*Schütze 2020*) deuten an, dass weder die lokale Kreuzvernetzung noch eine leichte Erhöhung der Anzahl gebundener Fc-Fragmente (durch zusätzliche, unabhängig bindende Antikörper) die Intensität des darauffolgenden ADCC wesentlich verstärken. So rief weder eine Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren (nicht-Fc-tragend, **Abb. 21**) zu Daratumumab noch die Hinzugabe eines unabhängig bindenden hcAb (Fc-tragend, *Schütze 2020*) eine ADCC-Verstärkung hervor.

MOR202, ein humaner monoklonaler CD38-spezifischer Antikörper, induziert keinen CDC und zeigt sich in klinischen Studien weniger erfolgreich als Daratumumab (*Chim et al. 2018*). Gleichzeitig konnten Thymus-aplastische Nacktmäuse, denen zuvor ein T-Zell-Lymphom injiziert worden war, mit einer Rituximab-Injektion (CD20-Antikörper) geheilt werden, während C1q-Knockout-Mäuse im gleichen experimentellen Setting nach Rituximab-Injektion analog der Negativkontrolle verstarben (*Di Gaetano et al. 2003*). Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass die beiden Prozesse ADCC und CDC *in vivo* nicht gleichzeitig ablaufen können. So wurde in Anwesenheit von aktivem Komplementsystem für die NK-Zelllinie KHYG-1 *in vivo* eine komplette Suppression von ADCC durch das Komplementsystem beobachtet (*Mishima et al. 2012*). Dies impliziert, dass die Induktion von CDC bei Non-Hodgkin-Lymphomen wie dem Multiplen Myelom eine Relevanz für das klinische Outcome hat. Die Studienergebnisse deuten zudem an, dass in peripherem Blut der CDC den ADCC zu dominieren scheint. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf die Knochenmarknische und das Multiple Myelom übertragen lassen, ist zur Zeit noch unklar (*Wong and Comenzo 2015*).

Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich an Knochenmarkproben von Patienten mit Multiplem Myelom keine konsistente Wirkverstärkung des Daratumumab-abhängigen CDC durch die Zugabe von Nanobody-Dimeren. Hierzu gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

- 1) Es kommt zu keiner Kreuzvernetzung der CD38-Moleküle.
- 2) Der beobachtete Daratumumab-Effekt ist kein reiner CDC und damit durch Kreuzvernetzung nicht steigerbar.

Aufgrund der Heterogenität der Ergebnisse in **Abb. 22** reicht die Probenanzahl für eine definitive Beurteilung der Wirkung der HLE Nb-Dimere zum jetzigen Zeitpunkt nicht aus. Zur genaueren Charakterisierung des Effekts nach Hinzugabe von HLE Nb-Dimeren zu Daratumumab wäre eine größere Stichprobenanzahl an Knochenmarkproben sowie der Einsatz aller HLE Nb-Dimere erforderlich. In diesem Kontext bliebe auch die CD38-Expression im Vergleich mit LP-1 sowie das Vorkommen komplementinhibierender Faktoren wie CD55 oder CD59 zu prüfen. Neben dem Expressionslevel von CD38 könnte auch die Beweglichkeit des Antigens in der Zellmembran einen Einfluss auf die Kreuzvernetzung haben (*Diebold et al. 2014*). Ob sich die Beweglichkeit von CD38 auf Myelomzellen aus primärem Knochenmark von derer der Zellkulturzellen unterscheidet, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt und bleibt Bestandteil zukünftiger Forschung.

Ein weiterer zu untersuchender Ansatz wäre eine Verkürzung der verwendeten GS-Linkerlängen für die *ex vivo* Experimente. Nanobody-Fusionsproteine mit längeren GS-Linkern (25GS, 35GS) hatten in Vorversuchen *in vitro* eine geringere Verstärkung des CDC erzielt als die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte mit 15GS (*Schuster 2021*). Geht man davon aus, dass Daratumumab CD38-Epitope dauerhaft belegt (*Oberle et al. 2017*) und eine Verminderung von CD38 auf Plasmazellen bewirkt (*Nijhof et al. 2016*), könnten HLE Nb-Dimere das Ansprechen ggfs. im Verlauf einer Daratumumab-Therapie dennoch durch dann ermöglichte Kreuzvernetzung der Epitope verbessern.

Es wurde berichtet, dass Daratumumab auch CDC-unabhängig direkt apoptotisch wirken kann (*Krejci et al. 2016*). CDC-Negativkontrollen mit inaktiviertem Serum bewirkten *ex vivo* einen Verlust der Myelompopulation ohne Steigerung der PacO-positiven Population (**vgl. Abb. 22A F3/4 vs. A3/4 und Abb. 22B F3/4 vs. A3/4**). Dies passt zu der Hypothese, dass Daratumumab hier in Anwesenheit mononukleärer Knochenmarkzellen bereits über andere Effektormechanismen eine effektive Zytotoxizität induziert, die nicht durch Nanobody-Dimere gesteigert werden kann. Schließlich dürfte ein reiner CDC bei Hinzugabe von inaktiviertem Serum keine Veränderung der Myelompopulation auslösen. So ließe sich auch eine ähnlich zu **Abb. 21** beobachtete Verminderung des Daratumumab-abhängigen Effekts erklären.

Weiterführend stellt sich die Frage, ob für die Effektivität des CDC eine qualitative (durch Kreuzvernetzung) oder quantitative (durch Hinzugabe von unabhängig bindenden Antikörpern) Verfügbarkeit von Fc-Fragmenten ausschlaggebend ist. Sämtliche Experimente mit der Positivkontrolle JK36 hcAb zeigen, dass der Schwereketten-Antikörper dem HLE Nb-Dimer als Kombinationspartner von Daratumumab *in vitro* mindestens gleichgestellt, *ex vivo* sogar überlegen war. Somit scheint in der Kombination aus Daratumumab + hcAb die Erhöhung der Fc-Dichte durch einen unabhängig-bindenden Schwerekettenantikörper für den folgenden CDC effektiver als eine lokale Verdichtung durch Kreuzvernetzung. Ob HLE Nb-Dimere aufgrund einer besseren Gewebegängigkeit und Erreichbarkeit der Knochenmarknische dennoch einen therapeutischen Effekt verstärken können, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

5.3 HLE Nb-Dimere erreichen solide, subkutane CD38+ Tumore im Mausmodell

Mittels Maus-Tumor-Graft-Modellen lässt sich präklinisch ein erster Eindruck von Vorgängen wie Tumorwachstum und Erreichbarkeit der Tumorzellen für Therapeutika in einem lebenden Organismus gewinnen. Ziel war es, erste Erkenntnisse über die Pharmakokinetik der HLE Nb-Dimere *in vivo* zu erlangen. Da das HLE Nb-Dimer JK2-JK36- α Alb⁶⁸⁰ *in vitro* die stärkste Fluorochrom-Kopplung (**Abb. 23A**) und stabilste Antigenbindung zeigte (**Abb. 24**), wurde dieses Konstrukt für die folgenden Versuche verwendet. Die stärkere Bindung gegenüber dem Monomer JK36⁶⁸⁰ lässt sich durch die *biparatopische* Bindung an CD38 erklären.

In dem Pilotexperiment konnte die Opsonierung der Tumorzellen durch HLE Nanobody-Dimere auf drei Arten nachgewiesen werden: fluoreszenzbildgebend, durchflusszytometrisch sowie immunhistochemisch (**Abb. 25+26**). Dies unterstreicht den vielfältigen Einsatz von Nanobodies nicht nur für den therapeutischen, sondern auch für den diagnostischen Ansatz. Aufgrund der Tatsache, dass Daratumumab CD38-Epitope dauerhaft belegt (*Oberle et al. 2017*), könnten sich Nanobodies, die ein anderes Epitop oder Antigen auf Myelomzellen belegen, gut zur Messung eines Therapieerfolgs unter Daratumumab-Gabe eignen.

Fluoreszenzbildgebend scheint ein Zeitpunkt von ca. 8-12 Stunden nach Injektion des HLE Nb-Dimers am besten geeignet. Ein ähnliches Zeitintervall wurde auch in Vorarbeiten von *Kunick 2019* mit Nb-Monomeren beobachtet. Nb-Monomere besitzen eine Molekülgröße von 15 kDa und liegen nach Labelling mit AF680 (Molekulargewicht ca. 1,2 kDa) unterhalb der renalen Filtrationsgrenze. HLE Nb-Dimere (45 kDa) erreichen nach Andocken an Albumin (66 kDa) jedoch Molekülgrößen oberhalb der renalen Filtrationsgrenze von 80 kDa.

Eine Anreicherung der HLE Nb-Dimere in Niere und Harnblase stellt anders als bei Monomeren keine Limitation der *in vivo* Bildgebung dar (**Appendix 7**). Als zusätzlichen Beweis für die ausbleibende renale Elimination wäre es sinnvoll, in einem weiterführenden Experiment die Urinproben der Mäuse analog der Analyse der Serumproben (**Abb. 26C**) auf das Vorhandensein von HLE Nb-Dimeren oder Fragmenten derselben zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit denen von *Tijink et al. 2008*, die sogar 72h nach Injektion eines EGFR-spezifischen HLE Nb-Dimers eine 25-fach höhere Anreicherung im Tumorgewebe als nach Injektion von Nb-Dimeren ohne HLE beobachteten. Diese EGFR-spezifischen HLE Nb-Dimere zeigten zudem eine homogenere Verteilung innerhalb der Tumore als konventionelle Antikörper.

Die injizierten YAC-Zellen waren aufgrund ihres schnellen Wachstums sowie ihrer stabilen Expression von Luciferase und GFP für den Pilotversuch ausgewählt worden. Die Luciferase-Aktivität ermöglichte auch periexperimentell eine Viabilitätsanalyse der Zellen via Biolumineszenzmessung (**vgl. Abb. 25A**); der Nachweis von GFP bot durchflusszytometrisch *ex vivo* eine Möglichkeit, die injizierten Tumorzellen von umgebendem Gewebe zu unterscheiden (**Abb. 26A**). Tatsächlich zeigte sich 24h nach Injektion auf den Tumorzellen lediglich ein schwaches Signal. Durch Hinzugabe eines Überschusses an JK2-JK36- α Alb**⁶⁸⁰ war zudem eine Nachfärbung auf über das Zehnfache der Intensität möglich. Dies deutet an, dass die zugänglichen Epitope *in vivo* nur partiell abgedeckt waren, was dennoch eine deutliche Fluoreszenz-Bildgebung des Positivtumors ermöglichte (**Abb. 25C**). Denkbar ist auch, dass im Rahmen der Zellpräparation für die *ex vivo* Untersuchung durch mechanischen und thermischen Stress eine Dissoziation der HLE Nb-Fluorochrom-Konjugate von den Tumorzellen bewirkt wird. Stress während der Präparation könnte auch erklären, warum > 80 % der Zellen in diesem Versuch nicht mehr vital zur Darstellung kamen.

Der Pilotversuch gibt einen vielversprechenden Eindruck vom Einsatz der Nanobody-Dimere *in vivo*. Prinzipiell erscheint das HLE-Format aufgrund der langen Halbwertszeit für therapeutische Zwecke geeigneter als Nb-Dimere ohne Halbwertszeitverlängerung. Letztere haben in der diagnostischen Anwendung den Vorteil der kurzen Halbwertszeit, jedoch gleichzeitig den Nachteil der hohen renalen Filtration und damit der starken Anfärbung der harnableitenden Wege. Interessanterweise konnten *Xavier et al. 2013* bei Konstrukten ohne His-Tag eine deutliche Reduktion der Nieren-Signale beobachten. Möglicherweise bewirkt die positive Ladung des Histidin-Tags eine verstärkte tubuläre Rückresorption (*Xavier et al. 2013*). Somit wären die in dieser Arbeit generierten taglosen Nanobody-Dimere besser als ihre taghaltigen Äquivalente für die Bildgebung von Tumoren geeignet.

Analog zu den *biparatopischen* Nanobody-Dimeren sind auch alternative, *bispezifische* Zytotoxizität-induzierende Nanobody-Dimere für therapeutische Ansätze denkbar. So könnte man verschiedene Prozesse der antikörperabhängigen Zytotoxizität simulieren: Durch Fusion eines CD38- und CD16-spezifischen Nanobodies ließe sich ein *bispezifisches* NK-Zell aktivierendes Nanobody-Dimer, kurz BiKE, herstellen. Hiermit könnte NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (ähnlich des ADCC) und ggfs. auch Makrophagen-vermittelte Phagozytose induziert werden. (Hambach et al. 2022).

Durch Fusion eines CD38- und CD3-spezifischen Nanobodies ließe sich ein *bispezifisches* T-Zell-aktivierendes Nanobody-Dimer, kurz BiTE, generieren und hierüber T-Zell-Zytotoxizität und Apoptose stimulieren (Mandrup et al. 2021). Zuletzt könnte man durch Fusion eines CD38- und C1q-spezifischen Nanobodies ein *bispezifisches* Komplement-aktivierendes Nanobody-Dimer, kurz BiCE, erzeugen. Mit einem BiCE wäre eine Aktivierung der Komplementkaskade (ähnlich des CDC) auch ohne verfügbaren Fc-Teil denkbar (Pedersen et al. 2022). In allen drei Fällen ließe sich durch weitere Fusion an einen Albumin-spezifischen Nanobody die Halbwertszeit verlängern.

Da das im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzte Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Imaging (NIRF) nur eine begrenzte Eindringtiefe von ca. 7-10 mm im Gewebe hat (Bannas et al. 2014), das Multiple Myelom jedoch in nur seltenen Fällen (Plasmozytom) als solider Herd zu detektieren ist, bleibt die bildgebende Modalität ebenfalls zu optimieren, z.B. durch Verwendung von PET-kompatiblen Radionukliden wie ^{64}Cu oder ^{18}F (Rashidian et al. 2015, Ingram et al. 2018). Die genannten Limitationen könnten dann ggfs. durch das Immuno-PET-Imaging überwunden werden (Dun et al. 2021, Wang et al. 2021).

Zusammenfassend liefert die in dieser Dissertation vorgestellte Forschung interessante Werkzeuge und neue Erkenntnisse für die Diagnostik und Therapie von CD38-exprimierenden Neoplasien wie dem Multiplen Myelom mit Hilfe von Nanobodies. Darüber hinaus bildet sie eine Basis für zukünftige Untersuchungen, mithilfe derer das Potenzial der Nanobody-Fusionsproteine auch über das Gebiet der hämato-onkologischen Erkrankungen hinaus weiterentwickelt werden kann.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit thematisiert die Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms durch neuartige CD38-spezifische Halbwertszeit-verlängerte Nanobody-Dimere (HLE Nb-Dimere) und Daratumumab (Darzalex[®]), einen für die Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms eingesetzten CD38-spezifischen Antikörper.

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung Immunglobulin-produzierender monoklonaler Plasmazellen. Myelomzellen zeigen eine Überexpression von CD38, welches somit ein attraktives Zielprotein in der Diagnostik sowie Therapie dieser Erkrankung darstellt.

Nanobodies sind Einzeldomänen-Antikörper, die aus der antigenbindenden Domäne von kameliden Schwereketten-Antikörpern (hcAb) bestehen. Unsere Arbeitsgruppe konnte CD38-spezifische Nanobodies aus immunisierten Lamas isolieren, die drei verschiedene Epitope auf CD38 erkennen. Zwei CD38-spezifische Nanobodies können bei identischer Epitop-Spezifität zu *bivalenten* und bei unterschiedlicher Epitop-Spezifität entsprechend zu *biparatopischen* Nb-Dimeren fusioniert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unabhängig von Daratumumab bindende Nb-Dimere mit dem Albumin-spezifischen Nanobody Alb8 fusioniert, um *bivalente* und *biparatopische* CD38-spezifische HLE Nb-Dimere zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war es, die antitumorale Wirkung von Daratumumab in Kombination mit den generierten CD38-spezifischen HLE Nb-Dimeren zu steigern. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die HLE Nb-Dimere zur Diagnostik des Multiplen Myeloms eignen.

Daratumumab vermittelt *in vitro* nur geringe Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC). Auch einzelne Nb-basierte hcAb zeigen nahezu keinen CDC. Die Kombination von zwei hcAb, die an unterschiedliche Epitope auf CD38 binden, führt hingegen zu einer deutlichen Steigerung des CDC. HLE Nb-Dimere allein können aufgrund des fehlenden Fc-Fragments keine zytotoxischen Effekte induzieren. Die simultane Bindung von HLE Nb-Dimeren und Daratumumab an CD38-exprimierende Myelom- und Burkitt-Lymphomzellen *in vitro* führte zu einer deutlichen Steigerung des CDC. Diese deutliche Verstärkung des CDC ließ sich jedoch an primären Knochenmarkzellen von Patienten mit Multiplem Myelom *ex vivo* bisher nicht reproduzieren. Fluorochrom-konjugierte HLE Nb-Dimere zeigten im Mausmodell *in vivo* eine spezifische und langanhaltende Anfärbung CD38-positiver solider Tumore. Die zusätzliche Fusionierung des Albumin-spezifischen Nbs führte zu einer verminderten renalen Ausscheidung, welche die verlängerte *in vivo* Halbwertszeit der HLE Nb-Dimere bedingt.

HLE Nb-Dimere stellen somit hilfreiche neue Werkzeuge für die Verbesserung von Therapie und Diagnostik CD38-überexprimierender Neoplasien wie dem Multiplen Myelom dar.

Abstract

This thesis focuses on the diagnosis and therapy of multiple myeloma using novel CD38-specific half-life extended nanobody dimers (HLE Nb-Dimers) and Daratumumab (Darzalex[®]), a CD38-specific antibody for first-line therapy of multiple myeloma.

Multiple myeloma is a malignant disease of immunoglobulin-producing monoclonal plasma cells. Myeloma cells display overexpression of the transmembrane protein CD38, constituting an attractive target protein for diagnosing and treating this neoplasia.

Nanobodies are single-domain antibodies consisting of the antigen-binding domain of camelid heavy chain antibodies. Our research group previously isolated distinct CD38-specific nanobodies from immunized llamas, recognizing three distinct epitopes of CD38. Two nanobodies with either identical or different epitope-specificity can be fused into *bivalent* or *biparatopic* Nb-Dimers, respectively. In the research discussed in this thesis, Nb-Dimers binding independently of Daratumumab were additionally linked with the albumin-specific nanobody Alb8 to create *bivalent* and *biparatopic* variants of CD38-specific HLE Nb-Dimers.

This research aimed to increase the anti-tumor effect of Daratumumab by adding these generated CD38-specific HLE Nb-Dimers. In addition, it should be evaluated if HLE Nb-Dimers were suitable for diagnosing multiple myeloma.

Daratumumab mediates only little complement-dependent cytotoxicity (CDC) *in vitro*. Even single Nb-based hcAb show almost no CDC. On the other hand, a combination of two hcAb binding different epitopes on CD38 leads to a significant increase in CDC. While CD38-specific HLE Nb-Dimers alone cannot induce cytotoxic effects due to the lack of the Fc region, simultaneous binding of HLE Nb-Dimers and Daratumumab *in vitro* led to a significant increase in CDC on CD38-expressing myeloma and Burkitt cell lines. However, this significant effect could not yet be reproduced *ex vivo* on primary bone marrow cells from patients with multiple myeloma.

Fluorochrome-conjugated HLE Nb-Dimers demonstrated specific and long-lasting staining of CD38-positive solid tumors in a mouse allograft model *in vivo*. Linking the albumin-specific nanobody resulted in reduced renal excretion and consequently extended the *in vivo* half-life of the HLE Nb-Dimers.

HLE Nb-Dimers thus represent helpful new tools for improving the therapy and diagnosis of CD38-overexpressing tumors such as multiple myeloma.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper, <i>engl.</i> <u>A</u> ntib <u>o</u> dy
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, <i>engl.</i> <u>A</u> ntib <u>o</u> dy <u>D</u> ependent <u>C</u> ell-mediated <u>C</u> ytotoxicity
ADCP	Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose, <i>engl.</i> <u>A</u> ntib <u>o</u> dy <u>D</u> ependent <u>C</u> ell-mediated <u>P</u> hagocytosis
a.e.	am ehesten
AF	Alexa Fluor
Ak	Antikörper
Alb8	Albumin-spezifischer Nanobody
ART2	ADP-Ribosyltransferase 2
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BGH	<i>engl.</i> bovine growth hormone
BiCE Nb-Dimere	bispezifische Komplement-aktivierende Nanobody-Dimere <i>engl.</i> <u>B</u> ispecific <u>C</u> omplement <u>E</u> ngagers
BiKE Nb-Dimere	bispezifische NK-Zell aktivierende Nanobody-Dimere <i>engl.</i> <u>B</u> ispecific <u>K</u> iller Cell <u>E</u> ngagers
BiTE Nb-Dimere	bispezifische T-Zell-aktivierende Nanobody-Dimere <i>engl.</i> <u>B</u> ispecific <u>T</u> -Cell <u>E</u> ngagers
BLI	Biolumineszenz-Bildgebung, <i>engl.</i> Bioluminescence Imaging
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
C1q - C9	Komplementfaktoren
cADPR	Zyklische Adenosindiphosphat-Ribose
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CDC	Komplementvermittelte Zytotoxizität, <i>engl.</i> <u>C</u> omplement- <u>D</u> ependent <u>C</u> ytotoxicity
CDCP	Komplementvermittelte zelluläre Phagozytose, <i>engl.</i> <u>C</u> omplement- <u>D</u> ependent <u>C</u> ellular <u>P</u> hagocytosis
CDR	Hypervariable Regionen, <i>engl.</i> <u>C</u> omplementary- <u>D</u> etermining <u>R</u> egions
CDTa	Clostridioides difficile Toxin, Untereinheit a

Abkürzungsverzeichnis

CH	Konstante Domäne der schweren Kette (eines Antikörpers)
CHO	Ovarien des Chinesischen Hamsters, <i>engl.</i> Chinese Hamster Ovary
Cilta-Cel	Ciltacabtagene-Autoleucel
CL	Konstante Domäne der leichten Kette (eines Antikörpers)
CMV	Cytomegalie-Virus
CR	Komplement-Rezeptor
CT	Computertomografie
DAPI	Diamidin-2-Phenylindol
Dara	Daratumumab
dim	Dimer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dntp	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>engl.</i> <u>D</u> ulbecco's <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
EBNA	Epstein-Barr-Kernantigen
EC50	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere, <i>lat.</i> et alii
Fab	Antigen-bindendes Fragment, <i>engl.</i> <u>F</u> ragment <u>a</u> ntigen <u>b</u> inding
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl.</i> <u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
Fc	Kristallisierbares Fragment, <i>engl.</i> <u>F</u> ragment <u>c</u> rystallisable
FCS	Fetales Kälberserum
ff.	fortfolgend
FI	Fluoreszenz-Intensität
FR	Konservierte Regionen, <i>engl.</i> <u>F</u> ramework <u>R</u> egions
FS	Fabienne Seyfried
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>engl.</i> <u>f</u> orward <u>s</u> catter
fwd	<i>engl.</i> forward
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GPI	<u>G</u> lycosylphosphatidyl <u>i</u> nositol
GS	Glycin Serin
hcAb	Schwereketten-Antikörper, <i>engl.</i> <u>h</u> eavy <u>c</u> hain <u>A</u> ntib <u>o</u> dy

Abkürzungsverzeichnis

HEK	menschliche embryonale Nierenzellen, <i>engl.</i> <u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney
HH	Hamburg
His	Histidin
his ₆	Hexahistidin (auch polyHis für Polyhistidin)
HLE	Halbwertszeit-verlängert, <i>engl.</i> <u>h</u> alf- <u>l</u> ife <u>e</u> xtended
HOPA	Hämatologisch-Onkologische Praxis Altona
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IMiD	Immunmodulator, <i>engl.</i> <u>I</u> mmun <u>o</u> modulatory <u>i</u> mide <u>d</u> rugs
i.v.	intravenös
IVIS	<i>in vivo</i> Imaging-System
JK	Julia Königsdorf
kDa	Kilodalton
KO	knockout
KP	Katharina Petry
LB	<i>engl.</i> <u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth
LD	Loading Dye
LeS	Levin Schriewer
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAC	Membran-Angriffs-Komplex
MEM	<i>engl.</i> <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität, <i>engl.</i> <u>M</u> ean <u>F</u> luorescence <u>I</u> ntensity
MGUS	<u>M</u> onoklonale <u>G</u> ammopathie <u>u</u> nklarer <u>S</u> ignifikanz
MM	Multiples Myelom
MOA	Wirkmechanismus <i>engl.</i> <u>m</u> echanism <u>o</u> f <u>a</u> ction
MRD	Minimale Resterkrankung, <i>engl.</i> <u>M</u> inimal <u>r</u> esidual <u>d</u> isease
NAADP	Nicotin-Säure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NIKA	Periplasmatisches Nickel-/Metallophore-Bindungsprotein
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NiS	Niklas Schuster

Abkürzungsverzeichnis

NIRF	Nah-Infrarot-Fluoreszenz
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMRI	Naval Medical Research Institute
nu	nackt, <i>engl.</i> nude
PacO	Pacific Orange succinimidyl ester
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>engl.</i> <u>Phosphate buffered saline</u>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pCSE2.5	Eukaryotischer Expressionsvektor
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PFS	Progressionsfreies Überleben, <i>engl.</i> <u>Progression free survival</u>
PI	Propidiumiodid
PI	Proteasominhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen /min, <i>engl.</i> <u>revolutions per minute</u>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROQ	Rechter oberer Quadrant
rvs	<i>engl.</i> reverse
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese <i>engl.</i> sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serin
SM	Super Marker
SMM	Schwelendes MM, <i>engl.</i> <u>s</u> mouldering <u>m</u> ultiple <u>m</u> yeloma
SOC	<i>engl.</i> <u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression
SSC	Seitwärtsstreulicht, <i>engl.</i> <u>s</u> ide <u>s</u> catter
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA-Puffer
TC	Thermocycler
TC (-Flaschen)	Tissue Culture (-Flaschen)
TRE	<i>engl.</i> <u>T</u> otal <u>R</u> adiant <u>E</u> fficiency
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

UMIF	UKE Microscopy Imaging Facility
UV	Ultraviolett
VH	Variable Domäne der schweren Kette (eines Antikörpers)
VHH	Variable Domäne der schweren Kette (eines Schwereketten-Antikörpers), <i>engl. variable heavy chain of heavy chain antibodies</i>
VL	Variable Domäne der leichten Kette (eines Antikörpers)
vol/vol	Volumenprozent
WF	William Fumey
2x YT	Yeast Extract Tryptone

8 Literaturverzeichnis

Bannas, P., et al. (2017). "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics." Front Immunol **8**: 1603.

Bannas, P., et al. (2015). "Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection." Contrast media & molecular imaging **10**(5): 367-378.

Bannas, P., et al. (2014). "In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies." Contrast media & molecular imaging **9**(2): 135-142.

Baum, N., et al. (2020). "Daratumumab and nanobody-based heavy chain antibodies inhibit the ADPR cyclase but not the NAD⁺ hydrolase activity of CD38-expressing multiple myeloma cells." Cancers **13**(1): 76.

Berdeja, J. G., et al. (2021). "Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study." The Lancet **398**(10297): 314-324.

Chari, A., et al. (2017). "Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **130**(8): 974-981.

Chim, C., et al. (2018). "Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond." Leukemia **32**(2): 252-262.

Cho, S.-F., et al. (2017). "Monoclonal antibody: A new treatment strategy against multiple myeloma." Antibodies **6**(4): 18.

Cortez-Retamozo, V., et al. (2002). "Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels." International journal of cancer **98**(3): 456-462.

Davies, D. R., et al. (1975). "Three-dimensional structure of immunoglobulins." Annu Rev Biochem **44**: 639-667.

Deaglio, S., et al. (2001). "Human CD38: a (r) evolutionary story of enzymes and receptors." Leukemia research **25**(1): 1-12.

Di Gaetano, N., et al. (2003). "Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo." The Journal of Immunology **171**(3): 1581-1587.

Diebold, C. A., et al. (2014). "Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface." Science **343**(6176): 1260-1263.

Dimopoulos, M., et al. (2020). "Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study." The Lancet **396**(10245): 186-197.

Dimopoulos, M. A., et al. (2016). "Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma." New England Journal of Medicine **375**(14): 1319-1331.

Dun, Y., et al. (2021). "ImmunoPET imaging of hematological malignancies: From preclinical promise to clinical reality." Drug Discovery Today.

Elouahabi, A. and J.-M. Ruyschaert (2005). "Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes." Molecular therapy **11**(3): 336-347.

Esser, A. F. (1994). "The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity." Toxicology **87**(1-3): 229-247.

Facon, T., et al. (2019). "Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone for untreated myeloma." New England Journal of Medicine **380**(22): 2104-2115.

Forthal, D. N. (2014). "Functions of antibodies." Microbiology spectrum **2**(4): 2.4. 21.

Frank, M. M. and K. E. Sullivan (2014). Deficiencies of the complement system. Stiehm's Immune Deficiencies, Elsevier: 731-763.

Fumey, K. M. R. W. (2021). Herstellung und Fc-Engineering CD38-spezifischer Schwereketten-Antikörper für eine effektivere Zytotoxizität gegenüber Myelomzellen, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.

Fumey, W., et al. (2017). "Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo." Scientific reports **7**(1): 1-13.

Gaboriaud, C., et al. (2003). "The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties." Journal of Biological Chemistry **278**(47): 46974-46982.

Geis, N., et al. (2010). "Inhibition of membrane complement inhibitor expression (CD46, CD55, CD59) by siRNA sensitizes tumor cells to complement attack in vitro." Current cancer drug targets **10**(8): 922-931.

Graille, M., et al. (2000). "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(10): 5399-5404.

Gstraunthaler, G. and T. Lindl (2021). Zellkulturmedien. Zell-und Gewebekultur, 8. Auflage, Springer: 87-114.

Gurjar, S. A., et al. (2017). "Surrogate CD16-expressing effector cell lines for determining the bioactivity of therapeutic monoclonal antibodies." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **143**: 188-198.

Hambach, J., et al. (2022). "Targeting multiple myeloma with nanobody-based heavy chain antibodies, bispecific killer cell engagers, chimeric antigen receptors, and nanobody-displaying AAV vectors." Frontiers in immunology **13**.

Hamers-Casterman, C., et al. (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." Nature **363**(6428): 446-448.

Harmsen, M. M. and H. J. De Haard (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." Applied microbiology and biotechnology **77**(1): 13-22.

Herold, G. (2021). Innere Medizin 2022, 47. Auflage, De Gruyter, 84-88.

Ho, M., et al. (2020). "Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM)." Leukemia **34**(12): 3111-3125.

Inglis, J. E., et al. (2008). "The serum complement system: a simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system." Advances in Physiology Education **32**(4): 317-321.

Ingram, J. R., et al. (2018). "Exploiting nanobodies' singular traits." Annual review of immunology **36**: 695-715.

Jäger, V., et al. (2013). "High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells." BMC biotechnology **13**(1): 1-20.

Janeway Jr, C. A., et al. (2001). The complement system and innate immunity. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition, Garland Science.

Janssen Biotech, I. (2022). "DARZALEX®(Daratumumab) Injection, for Intravenous Use [Prescribing Information]."

Krejčík, J., et al. (2016). "Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **128**(3): 384-394.

Kunick, V. H. (2019). Vergleichende Analyse von Nanobodies und monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD38 für die NIRF-Bildgebung von Lymphomen in vivo, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.

Lee, H. C. (2006). "Structure and enzymatic functions of human CD38." Molecular medicine **12**(11): 317-323.

Lenz, A. (2016). Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.

Liu, Q., et al. (2005). "Crystal structure of human CD38 extracellular domain." Structure **13**(9): 1331-1339.

Malavasi, F., et al. (1992). "CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality." International Journal of Clinical and Laboratory Research **22**(1): 73-80.

Mandrup, O. A., et al. (2021). "Programmable half-life and anti-tumour effects of bispecific T-cell engager-albumin fusions with tuned FcRn affinity." Communications biology **4**(1): 1-11.

Mateos, M.-V., et al. (2017). "Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma." New England Journal of Medicine **378**(6): 518-528.

Mateos, M.-V., et al. (2020). "Subcutaneous versus intravenous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (COLUMBA): a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised, phase 3 trial." The lancet haematology **7**(5): e370-e380.

Mazinani, M. and F. Rahbarizadeh (2022). "CAR-T cell potency: from structural elements to vector backbone components." Biomarker Research **10**(1): 1-24.

Mishima, Y., et al. (2012). "High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγRIIIa polymorphism." International immunology **24**(8): 477-483.

Morandi, F., et al. (2018). "CD38: a target for immunotherapeutic approaches in multiple myeloma." Frontiers in immunology **9**: 2722.

Moreau, P., et al. (2019). "Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study." The Lancet **394**(10192): 29-38.

Murphy, K. and C. Weaver (2018). Janeway Immunologie, Springer, 9. Auflage: 16-18, 60-89, 179-194, 243-251, 557-581.

Muyldermans, S. (2013). "Nanobodies: natural single-domain antibodies." Annu Rev Biochem **82**(1): 775-797.

Nagai, Y., et al. (2019). "CD38 Knockout Primary NK Cells to Prevent "Fratricide" and Boost Daratumumab Activity." Blood **134**(Supplement_1): 870-870.

Nguyen, V. K., et al. (1999). "Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies." Molecular immunology **36**(8): 515-524.

Nijhof, I. S., et al. (2016). "CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **128**(7): 959-970.

Oberle, A., et al. (2017). "Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection." Haematologica **102**(9): e368.

Onkologie, L. (2022). Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder Multiplem Myelom. D. K. Deutsche Krebsgesellschaft, AWMF.

Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." Molecular immunology **31**(3): 169-217.

Palumbo, A., et al. (2016). "Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma." New England Journal of Medicine **375**(8): 754-766.

Pape, L. J., et al. (2022). "CD38-specific nanobodies allow in vivo imaging of multiple myeloma under daratumumab therapy." Frontiers in immunology: 6314.

Pedersen, M. L., et al. (2022). "Nanobody-mediated Complement Activation to Kill HIV-infected Cells." bioRxiv.

Rajkumar, S. V. (2022). "Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management." American journal of hematology **97**(8): 1086-1107.

Rashidian, M., et al. (2015). "Noninvasive imaging of immune responses." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(19): 6146-6151.

Rink, L., et al. (2015). Immunologie für Einsteiger, Springer, 2. Auflage: 4-14, 33-50, 66-89.

Schriewer, L., et al. (2020). "Nanobody-based CD38-specific heavy chain antibodies induce killing of multiple myeloma and other hematological malignancies." Theranostics **10**(6): 2645.

Schuster, N. (2021). Therapeutisches Potential von CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern und Nanobody-Dimeren beim Multiplen Myelom, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.

Schütze, K. (2020). Humanisierte Schwerekettenantikörper für die Markierung und Tötung CD38-exprimierender Tumorzellen, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.

Schütze, K., et al. (2018). "CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells." Front Immunol **9**: 2553.

Scully, M., et al. (2019). "Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura." New England Journal of Medicine **380**(4): 335-346.

Seidel, U. J., et al. (2013). "Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies." Frontiers in immunology **4**: 76.

Spencer, A., et al. (2018). "Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of CASTOR." Haematologica **103**(12): 2079.

Temming, A. R., et al. (2019). "Functional attributes of antibodies, effector cells, and target cells affecting NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity." The Journal of Immunology **203**(12): 3126-3135.

Tijink, B. M., et al. (2008). "Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology." Molecular cancer therapeutics **7**(8): 2288-2297.

Usmani, S. Z., et al. (2016). "Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **128**(1): 37-44.

van de Donk, N. W., et al. (2016). "Monoclonal antibodies targeting CD 38 in hematological malignancies and beyond." Immunological reviews **270**(1): 95-112.

Vincke, C. and S. Muyldermans (2012). "Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies." Single Domain Antibodies: 15-26.

Walport, M. J. (2001). "Complement first of two parts." N Engl J Med. **344**: 1058-1066.

Wang, C., et al. (2021). "ImmunoPET imaging of multiple myeloma with [68Ga] Ga-NOTA-Nb1053." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging **48**(9): 2749-2760.

Wesolowski, J., et al. (2009). "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity." Medical microbiology and immunology **198**(3): 157-174.

Wong, S. W. and R. L. Comenzo (2015). "CD38 monoclonal antibody therapies for multiple myeloma." Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia **15**(11): 635-645.

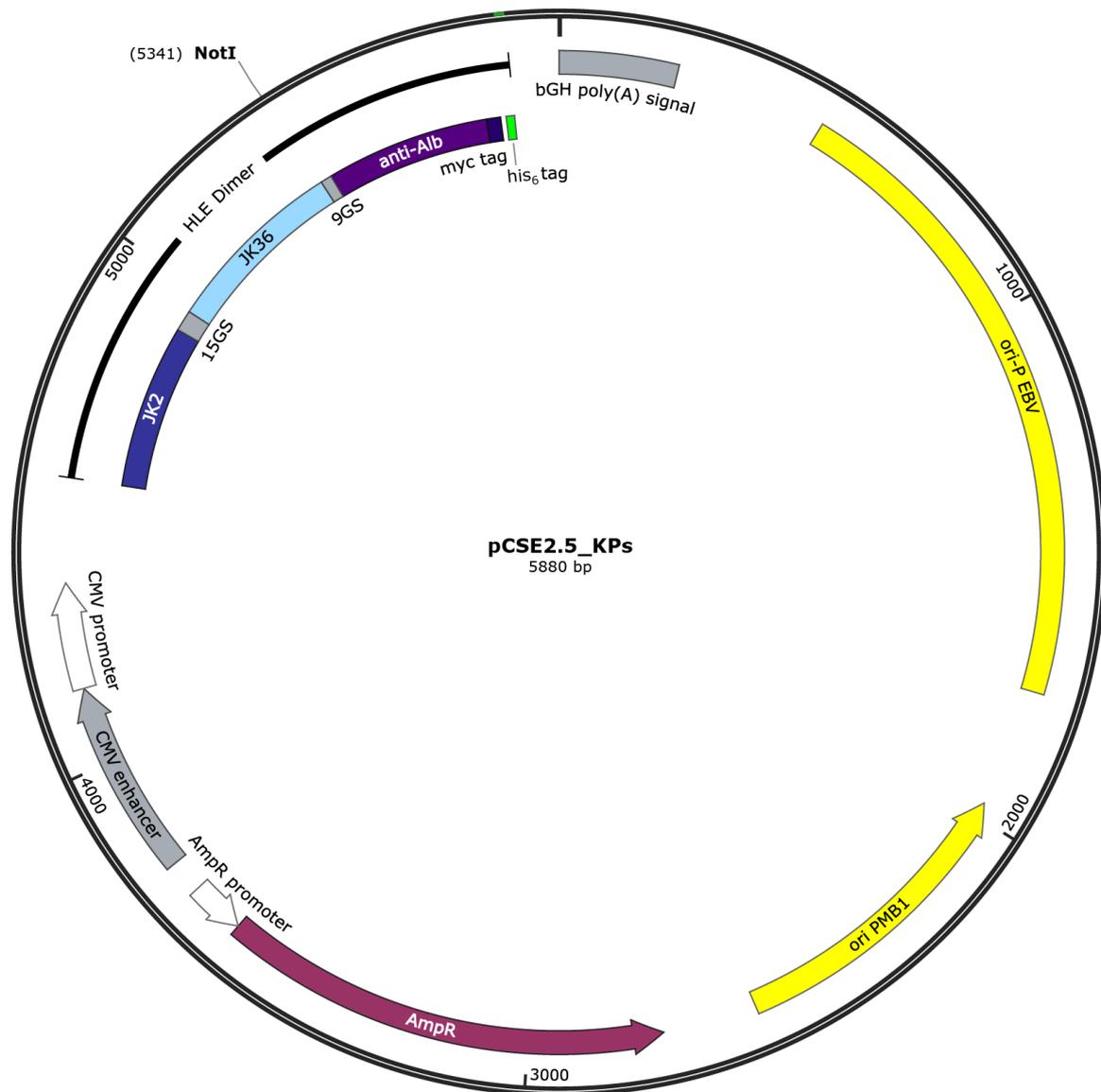
Xavier, C., et al. (2013). "Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of 68Ga-NOTA-anti-HER2 Nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer." Journal of Nuclear Medicine **54**(5): 776-784.

Yang, E. Y. and K. Shah (2020). "Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics." Frontiers in Oncology **10**(1182).

Yu, J., et al. (2020). "How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies." Journal of Hematology & Oncology **13**(1): 1-10.

Ziller, F., et al. (2005). "Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59." European journal of immunology **35**(7): 2175-2183.

9 Appendix

**Appendix 1 | Plasmidkarte pCSE 2.5 für HLE Nanobody-Dimere (erstellt mit SnapGene).**

Die vier Plasmide der HLE Nb-Dimere JK2-JK2- α Alb, JK2-JK36- α Alb (hier repräsentativ abgebildet), JK36-JK2- α Alb und JK36-JK36- α Alb entstanden aus dem Vektor FS#717 und je einem Insert der vier Plasmide NiS#1-4. FS#717 enthält die DNA für ein HLE Nb-Dimer bestehend aus s+16 dim und dem Nanobody Alb8. NiS#1-4 enthält entsprechend der Reihenfolge die DNA der Nanobody-Dimere mit 15GS-Linker: JK2-JK2, JK2-JK36, JK36-JK2, JK36-JK36. Die Restriktionsstellen in FS#717 sind wie folgt angeordnet: NcoI – s+16dim – NotI – 9GS – Alb8 – myc – his₆ – XbaI. Der Verdau mit NcoI und NotI führte zur Entfernung von s+16dim aus dem Zielvektor und ermöglichte die anschließende Insertion der Dimer-DNA aus NiS#1-4. Da die Restriktionsstellen in NiS#1-4 durch die in Schuster 2021 angewandte Klonierungstechnik nicht für einen Verdau zugänglich sind (Nco/PciI), mussten die Inserts mittels PCR aus den Plasmiden isoliert werden. Anschließend konnten die Inserts mit PciI und NotI verdaut und in den Vektor-Backbone ligiert werden. Auch in den neu geschaffenen Plasmiden KP#1-4 ist die vordere Restriktionsstelle durch Kombination von Nco/PciI nicht mehr für einen einfachen Verdau zugänglich.

JK2 dim- α Alb myc his₆ 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMS
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYQLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYQLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

JK2-JK36- α Alb myc his₆ 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMS
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYQLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
AE NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNAADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

JK36-JK2- α Alb myc his₆ 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMS
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
AE NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNAADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYQLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

JK36 dim- α Alb myc his₆ 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMS
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
AE NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNAADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
AE NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNAADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

Appendix 2 | Sequenzen der HLE Nanobody-Dimere mit myc- und his₆-Tag.

JK2 dim- α Alb ** 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AA**KLISEEDLNAAHHHHHHH

JK2-JK36- α Alb ** 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AA**KLISEEDLNAAHHHHHHH

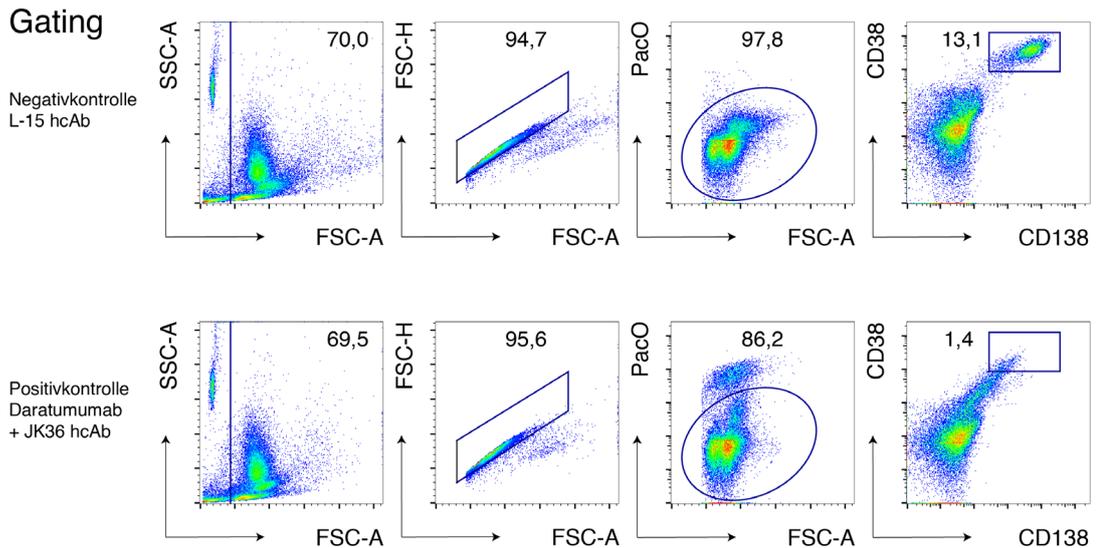
JK36-JK2- α Alb ** 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGIVGSMGITNYADSVKGRFTISSDNAK
NTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AA**KLISEEDLNAAHHHHHHH

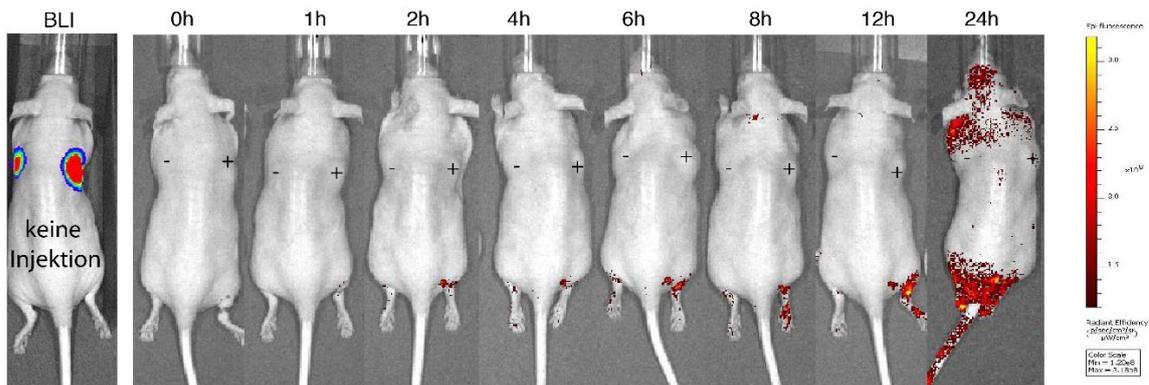
JK36 dim- α Alb ** 15GS

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
MA
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSDTLVADSVKGRFTISRDN
NTVSLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
EPKTPKPQFAAA
GGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
KTTLYLQMNLLKPEDTAVYYCTIGGSLRSLSSQGTLLVTVSS
AA**KLISEEDLNAAHHHHHHH

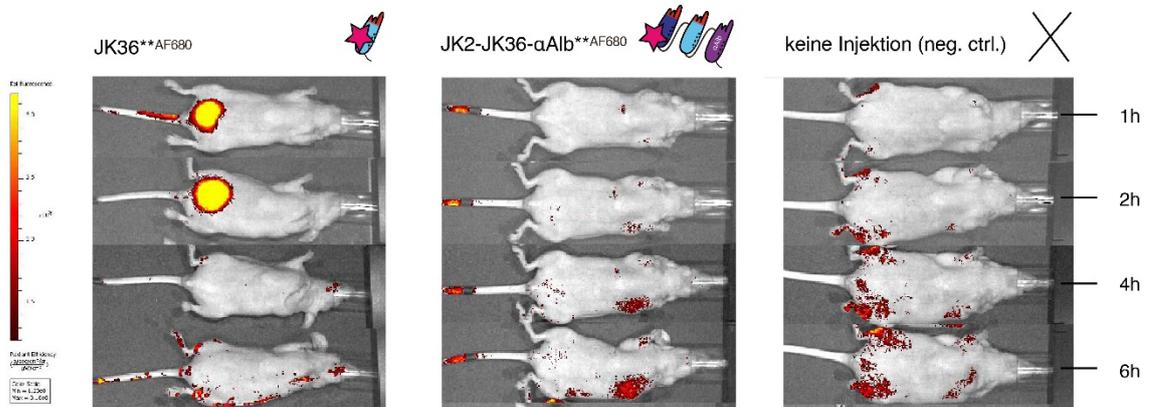
Appendix 3 | Sequenzen der HLE Nanobody-Dimere ohne Tags.



Appendix 5 | Gating an primären Knochenmarkzellen von Patienten mit Multiplem Myelom
 Myelomzellen aus primärem Knochenmark lassen sich nach Ausschluss von Debris (FSC-A low), Dupletten und toten Zellen (PaCO+) über ihre CD38- sowie CD138-Positivität identifizieren.



Appendix 6 | Darstellung der Hautkontamination durch renal filtrierte Monomer⁶⁸⁰ am Beispiel einer Maus des Pilotprojekts ohne Injektion eines fluorchromgekoppelten Nb-Fusionsproteins.
 Analog zu Abb. 25A ergibt sich auch bei einer Maus ohne stattgehabte Injektion eines fluorchromgekoppelten Fusionsproteins nach spätestens 24 Stunden ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich der Pfoten, des Schwanzes sowie des Kopfes.



Appendix 7 | Renale Filtration fluorchromgekoppelter Nb-Fusionsproteine im Vergleich (Nb-Monomer, HLE Nb-Dimer)

In Rückenlage zeigt sich bei HLE Nb-Dimeren anders als beim Nb-Monomer keine Anfärbung der Harnblase innerhalb der ersten 6 Stunden.

10 Danksagung

„If [...] it doesn't confirm your hypothesis, you have made a discovery. (Martin Chalfie)

Für die kollegiale und spannende Doktorarbeitszeit im IFI danke ich dem gesamten Team der AG Bannas & Nolte und unseren Nachbar-AGs Haag, Mittrücker & Tolosa. Hier geht mein Dank auch an alle nicht namentlich erwähnten (ehemaligen) MitarbeiterInnen des Instituts für Immunologie, die durch ihre in unterschiedlicher Form engagierte Unterstützung die Experimente in der vorliegenden Dissertation mit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Bannas für die Überlassung dieses interessanten Themas, die regelmäßigen Besprechungen während meiner Labortätigkeit, die wertvollen Diskussionen und seinen fachlichen Rat in den letzten fünf Jahren.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte für sein immerwährendes Interesse am Thema, seine konstruktive Kritik und die Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein großes Dankeschön geht an Birte Albrecht und Julia Hambach für die Einarbeitung ins richtige Trieren, Pipettieren, Zellkultivieren, FACSen und Adobe Illustrieren, die zahlreichen gemeinsamen Nachtschichten und nicht zuletzt das kritische Korrekturlesen. Danke für eure stete Hilfsbereitschaft, euren unumstößlichen Optimismus und eure langjährige Freundschaft.

Marten Junge danke ich für die tatkräftige Unterstützung insbesondere während des Pilotversuchs in vivo, ex vivo und post laborem. Thomas Eden danke ich für seine fachliche Expertise bei tiefergehenden molekularbiologischen Fragestellungen, seine Navigation in gedanklichen Sackgassen und das kritische Überprüfen meiner Ergebnisse. Danke an alle weiteren Mitglieder des MitFiMo (Jana, Marie, Nathalie, Nati, Josi, Tobi, Waldi) für die wertvolle gemeinsame Zeit während der Arbeit und nach Feierabend. Darüber hinaus gilt mein Dank Timon Hansen und seinen Kollegen der HOPA für die Bereitstellung der Patientenproben, Michael Horn-Glander für die Hilfe bei der Durchführung der IVIS-Messungen und Auswertung der Ergebnisse (yieees!), Susanne Krasemann für die Anfertigung geeigneter Paraffin-Schnitte und den Mitarbeitern der UMIF für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und Bereitstellung der Mikroskope.

Ein besonderer Dank gebührt auch der José Carreras Leukämie-Stiftung und der DGHO für das einjährige Promotionsstipendium und die damit verbundene finanzielle und ideelle Förderung dieses Forschungsvorhabens.

Danke an meine Familie und meine Freunde für die stete Motivation und die Überzeugung, dass diese Arbeit auch neben dem Berufsalltag einen Abschluss finden wird.

11 Tabellarischer Lebenslauf

aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: