Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Adam)

Vergleichende Analyse von Nanobodies und monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD38 für die NIRF-Bildgebung von Lymphomen in vivo

Dissertation

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

> Vorgelegt von Valentin Helmut Kunick aus Hamburg

> > Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 30.06.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gerhard Adam

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsve	erzeichnis	3
Abkürzu	ngen	7
1. Einlei	tung	9
1.1	Molekulare Bildgebung	9
1.2	Techniken der molekularen Bildgebung	9
1.3	Die Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung	10
1.4 Bilo	Antikörper als Werkzeuge für die spezifische molekulare Igebung	11
1.5 Ant	Nanobodies als kleinere Alternative zu konventionellen ikörpern	12
1.6	Das Zielantigen CD38	15
1.7	Ziel der Arbeit	16
2. Mater	ial und Methoden	17
2.1	Material	17
	2.1.1 Laborgeräte	17
	2.1.2 Verbrauchsmaterial	18
	2.1.3 Flüssigkeiten, Puffer, Chemikalien	19
	2.1.4 Antikörper	20
	2.1.5 Restriktionsenzyme	20
	2.1.6 DNA	20

3

	2.1.7 Software	20
	2.1.8 Verwendete Kits	21
	2.1.9 Mauslinie	21
	2.1.10 Zelllinien	21
2.2 N	1ethoden	22
	2.2.1 In vitro Zellkulturen	22
	2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer improved-Zählkammer	22
	2.2.3 Synthese der α -CD38 Antikörper A10 und MU1067	22
	2.2.4 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Antikörper	23
	2.2.5 Färben von Zellen mit fluorophormarkierten Antikörpern	25
	2.2.6 Durchflusszytometrie	25
	2.2.7 Enzymatische Spaltung des Trägervektors von hCD38	26
	2.2.8 Stabile Transfektion muriner Lymphomzellen mit humanem CD38	27
	2.2.9 In vitro Fluoreszenz-Mikroskopie	27
	2.2.10 Wachstumskontrollen der Tumoren im MRT	28
	2.2.11 Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung	28
	2.2.12 NIRF-Bildgebung in vitro	29
	2.2.13 NIRF-Bildgebung in vivo	29
	2.2.14 NIRF-Bildgebung ex vivo per IVIS	30
	2.2.15 FACS-Kontrolle der explantierten Tumorzellen	31
	2.2.16 Urin- und Serumanalyse	31

4

3. Erg	gebnisse	33
:	3.1 Etablierung eines CD38-Allograft-Tumormodells mit Lymphomzellen für die intravitale Bildgebung	34
	3.1.1 Drei von sechs humanen Lymphomlinien zeigen eine natürliche Oberflächenexpression von CD38	34
	3.1.2 Stabile Transfektion von murinen Lymphomzellen mit humanem CD38	37
	3.1.3 Murine Lymphomzellen zeigen nach Transfektion mit humanem CD38 ein verlässliches und einheitliches Wachstum in vivo	38
:	3.2 Vergleichende Bindungsanalysen in vitro mit dem fluorophormarkierten hCD38-spezifischen Nanobody MU1067 und dem konventionellen Antikörper A10 an Lymphomzellen	40
	3.3 Intravitales Imaging von hCD38-positiven YAC- Zelllymphomen mit fluorophormarkierten Nanobodies und konventionellen Antikörpern	44
;	3.4 Die Quantifizierung der intravitalen NIRF-Aufnahmen zeigt Vorteile von MU1067 ⁶⁸⁰ gegenüber A10 ⁶⁸⁰ zu frühen Zeitpunkten für die in vivo Bildgebung	52
:	3.5 Ergänzende ex vivo Analysen von YAC-Tumoren, Serum und Urin der zuvor im IVIS untersuchten Mäuse	58
	3.6 Die ex vivo NIRF-Aufnahmen der explantierten Organe und Tumoren bestätigen die Ergebnisse der intravitalen Bildgebung	63
4. Dis	skussion	67
	4.1 Murine YAC-Lymphomzellen können mit humanem CD38 transfiziert werden und als Allograft-Tumormodell eingesetzt werden.	67
	4.2 Vergleichende in vitro Analysen von MU1067 und A10	69
•	4.3 Spezifische in vivo NIRF-Bildgebung von CD38-positiven Lymphomen	69

3.

2.2.17 Statistische Auswertung

4.4 Ex vivo Analysen	72
4.5 Limitationen der Arbeit	74
4.5.1 Grenzen der Anwendbarkeit aufgrund des Versuchsdesigns	75
4.5.2 Grenzen der Anwendbarkeit aufgrund der Methode	76
4.6 Ausblick	78
Zusammenfassung	80
Abstract	81
Literaturverzeichnis	82
Lebenslauf und Liste der Vorveröffentlichungen	88
Danksagung	89
Eidesstattliche Versicherung	90

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AF680	Alexa Fluor 680
B-ALL	Akute lymphatische B-Zellleukämie
B-CLL	Chronische lymphatische B-Zellleukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
cADPr	Cyclic ADP ribose (dt. zyklische ADP-Ribose)
CD38	Cluster of differentiation 38 (dt. Unterscheidungsgruppe 38)
hCD38	Humanes CD38
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Fragment antigen binding (dt. Antigen-bindendes Fragment)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (dt. Fluoreszenzaktivierter Flusssortierer = Durchflusszytometer)
FCS	Fetal calf serum (dt. Fetales Kälberserum)
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	Intravenös
IVIS	In vivo imaging system (dt. In vivo Bilgebungssystem)
kDa	Kilodalton
LD	Live-Dead stain (dt. Lebend-Tot-Färbung)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mAk	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NIRF	Nahinfrarot-Fluoreszenz
NRS	Natural rat serum (dt. natürliches Rattenserum)

PacO	Pacific Orange
PBS	Phosphate buffered saline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerasekettenreaktion)
rpm	Rounds per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S.C.	Subcutaneous (dt. Subkutan)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (dt. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
T-ALL	Akute lymphatische T-Zellleukämie
UV	Ultraviolett
VHH	Variable domain of the heavy chain of a camelid heavy chain antibody (dt. Variable Domäne der schweren Kette eines Schwere-Ketten-Antikörpers)

1. Einleitung

1.1 Molekulare Bildgebung

Die molekulare Bildgebung hat in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle in der Diagnostik und Therapie von Tumoren, Entzündungen und Autoimmunkrankheiten eingenommen (Hoffman und Gambhir 2007, Blow 2009). Sie ist damit zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Krebsforschung, in klinischen Studien und in der medizinischen Praxis geworden (Weissleder und Pittet 2008). Die molekulare Bildgebung wird für die Charakterisierung und Messung von biologischen Prozessen in vivo auf zellulärer und molekularer Ebene eingesetzt (Weissleder and Mahmood 2001). Die molekulare Bildgebung dieser Prozesse in vivo trägt zum besseren Verständnis bestimmter Krankheiten bei und unterstützt deren frühzeitige Diagnose (Chakravarty et al. 2014).

1.2 Techniken der molekularen Bildgebung

Zur diagnostischen Bildgebung und Früherkennung von Tumoren stehen heutzutage verschiedene Techniken zur Verfügung, mit denen es möglich ist, dynamische biologische Prozesse in lebenden Organismen zu messen (Chakravarty et al. 2014; Weissleder and Pittet 2008). Dabei haben sich einige Bereiche besonders hervorgetan: die Magnetresonanztomographie (MRT), nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) und die Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), sowie optische Verfahren wie die Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung (Blow 2009). Die MRT arbeitet mit Kontrastmitteln, wobei speziell SPIOs (super paramagnetic iron oxide particles) eingesetzt werden. Die Größe dieser Partikel limitiert jedoch deren Einsatzmöglichkeiten für die in vivo Bildgebung. Sowohl nukleare als auch NIRF-Bildgebung beinhalten die Verabreichung eines Kontrastmittels, welches durch einen Zerfall Photonen produziert. Deren Ausbreitung im Gewebe wird verfolgt, um ein differenziertes Bild zu erstellen (Sevick-Muraca 2012). Bei der PET und SPECT werden Radionuklide eingesetzt, deren abgegebene Gammastrahlen detektiert werden. Einer der größten Vorteile der optischen Bildgebung ist neben einer ähnlich hohen Spezifität und Sensitivität vor allem die Abwesenheit von ionisierender Strahlung (Kaur et al. 2012 Kijanka et al. 2013). Außerdem müssen Radionuklide sehr aufwendig und gezielt in technisch dafür ausgestatten Speziallaboren produziert und gehandhabt werden und sind anschließend aufgrund des radioaktiven Zerfalls nur sehr begrenz haltbar. Dadurch entsteht ein hoher Planungs- und Kostenaufwand. Obwohl die nukleare molekulare Bildgebung lange Zeit als Goldstandard galt (Sevick-Muraca 2012) und nach wie vor eine der wichtigsten Methoden zur nicht-invasiven Tumordiagnostik darstellt, zeigt sich besonders in der experimentellen Forschung ein deutlicher Trend hin zur optischen und damit zur NIRF-Bildgebung.

1.3 Die Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung weist deutlich niedrigere Kosten und eine breitere Verfügbarkeit als Verfahren mit Radionuklid-markierten Kontrastmitteln auf (Kijanka et al. 2013). Nahinfrarot-Fluoreszenzlicht wird im Wellenlängenbereich von 700 bis 900 nm von organischem Gewebe nur in geringem Maße absorbiert. Aus diesem Grund eignet es sich besonders gut zur diagnostischen nicht-invasiven Bildgebung. Entscheidend ist dabei speziell die geringe Absorption der NIRF durch Wasser und Hämoglobin, so dass das von NIR-Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht das Gewebe vergleichsweise gut durchdringen kann. Zusätzlich ist der Störfaktor der vom Gewebe ausgehenden Autofluoreszenz in diesem Bereich des optischen Spektrums besonders gering. Die NIRF-Bildgebung setzt sich aus vier grundlegenden Elementen zusammen. Dazu gehören (a) das von einem Laser produzierte Exzitationslicht, (b) eine NIRF-Sonde (z.B. fluorophormarkierter Antikörper), welche sicher verabreicht werden kann und spezifisch eine Zielstruktur markiert, (c) optische Linsen und Filter, das vergleichsweise schwache Fluoreszenzlicht von dem gestreuten um Exzitationslicht des umliegenden Gewebes zu unterscheiden und (d) ein NIRsensitiver Detektor (CCD, charged coupled device), der das Fluoreszenzlicht effizient erfasst (Sevick-Muraca 2012). Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass die gleiche Probe mit verschiedenen Techniken untersucht werden kann. Diese optische Bildgebung ermöglicht in vitro, in vivo und ex vivo Messungen mittels Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und IVIS (In Vivo Imaging System). Durch die Verwendung identischer Proben ist eine direkte Vergleichbarkeit der Markierungseffizienz gewährleistet.

1.4 Antikörper als Werkzeuge für die spezifische molekulare Bildgebung

Das Ziel einer spezifischen Bildgebung ist es, ein möglichst hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis zu erreichen. Voraussetzung hierfür ist die Markierung der Zielstruktur mit Kontrastmittel-Sonden. Die Zielzellen müssen dafür schnell und selektiv erreicht und markiert werden, während die überschüssigen ungebundenen Kontrastmittel-Sonden rasch ausgeschieden werden. Aufgrund der unübertroffenen Bindungsselektivität und Affinität gelten mAk als die spezifischsten Marker für die zielgerichtete Bildgebung (Wu & Olafsen 2008, Lisy et al. 2008). Mittlerweile sind verlässliche Methoden verfügbar, die es erlauben, spezifische Antikörper für jede beliebige Zielstruktur zu generieren (Wu 2009). Aus dieser Option ist ein umfangreiches Forschungsfeld entstanden, das mittlerweile zu einem vielfältigen Einsatz von mAk sowohl in der experimentellen Forschung als auch in der klinischen Diagnostik und Therapie geführt hat. Beispiele in der klinischen Anwendung sind die Verwendung in der diagnostischen Immunphänotypisierung von Leukämien (Diehl et al. 1986, Foss et al. 2000) oder der therapeutische Einsatz von Trastuzumab (Herceptin) bei HER2/neuüberexprimierendem Brustkrebs im Rahmen der personalisierten Therapie (Jackson und Chester, 2015). Aktuell befinden sich ca. 50 mAk in fortgeschrittenen klinischen Studien und es wird davon ausgegangen, dass in der nahen Zukunft jährlich mindestens sechs bis neun mAk eine Marktzulassung in den USA und Europa erhalten werden (Reichert 2017).

Mit Daratumumab ist zudem bereits ein α-hCD38-Antikörper zur Therapie des multiplen Myeloms zugelassen (FDA News Release 2015). Allerdings wird der klinische Nutzen der Antikörper durch die geringe und langsame Gewebepenetration, die verzögerte Ausscheidung aus dem Blutkreislauf, sowie den langen Verbleib in nicht anvisiertem Gewebe eingeschränkt (Kijanka et al. 2013). Aufgrund der Größe von circa 150kDa verbleiben konventionelle Antikörper mit einer Halbwertzeit von mehreren Tagen bis Wochen sehr lange im Blutkreislauf, da sie nicht renal ausgeschieden werden können (Bannas et al. 2014, Chakravarty et al. 2014, Monnet et al. 2014). Die Fc-Region geht zudem unspezifische Bindungen mit körpereigenen Strukturen ein, besonders mit solchen, die den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) auf der Oberfläche tragen, wie beispielsweise dendritische Zellen oder neutrophilen Granulozyten (Kuo et al. 2010, Olafsen und Wu, 2011). Eine lange Halbwertzeit kann bei therapeutischen Einsätzen durchaus gewünscht sein, ist jedoch für die diagnostische Bildgebung

hinderlich, da hohe Hintergrundwerte die Anreicherung im Zielorgan verschleiern können. Um diese für das Signal-Hintergrund-Verhältnis nachteiligen Eigenschaften der mAk zu verbessern wurde intensiv an der Entwicklung neuer und insbesondere kleiner Antikörperformate, wie Diabodies, Minibodies, Einzelketten-Antikörper-Fragmenten (single-chain variable fragments, scFv) und Nanobodies geforscht (Holliger und Hudson 2005, Wu und Olafsen 2008, Wu 2009).

1.5 Nanobodies als kleinere Alternative zu konventionellen Antikörpern

Nanobodies stellen die kleinste funktionelle Einheit der modifizierten Antikörperformate dar. Dabei handelt es sich um die antigenbindende Domäne von Schwere-Ketten-Antikörpern (hcAb, heavy chain antibody). Schwere-Ketten-Antikörper wurden erstmalig 1993 als "natürlich auftretende Antikörper ohne leichte Ketten" beschrieben. Sie kommen unter anderem in der Familie der Camelideae (Lama glama, Camelus dromedarius, Camelus bactrianus) und der Knorpelfische (Orectolobus maculates, Ginglymostoma cirratum) vor (Hamers-Casterman et al. 1993, Hassanzadeh-Ghassabeh et al. 2013). Sie unterscheiden sich strukturell von konventionellen IgG-Antikörpern, die typischerweise aus zwei schweren und zwei leichten Ketten aufgebaut sind. Die leichten Ketten bestehen aus je einer variablen (V_L, variable domain of the light chain) und einer konstanten Domäne (C_L, constant domain of the light chain). Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen (V_H, variable domain of the heavy chain) und drei konstanten Domänen (CH1, CH2, CH3, constant domain of the heavy chain).



Abb. 1.1 (modifiziert nach Muyldermans 2013)

Schematische Darstellung der Strukturen eines konventionellen IgG-Antikörpers, eines Schwere-Ketten-IgG-Antikörpers und eines Nanobodys.

Konventionelle IgG setzen sich aus zwei leichten (L) Ketten (bestehend aus VL und CL Domäne) und zwei schweren (H) Ketten (bestehend VH, CH1, Hinge-Region, CH2 und CH3 Domäne) zusammen. Schwere-Ketten-Antikörper setzen sich nur aus zwei schweren (H) Ketten zusammen (jeweils bestehend aus VHH, Hinge-Region, CH2 und CH3). CH2 und CH3 bilden bei beiden Formaten die Fc-Region. Beim konventionellen IgG besteht die Fab-Region aus CH1 und VH sowie der leichten Kette. Beim Schwere-Ketten-IgG besteht die Fab-Region nur aus der VHH-Domäne, isoliert auch Nanobody genannt.

Im Gegensatz dazu fehlen den Schwere-Ketten-Antikörpern der Kamele die leichten Ketten vollständig, genauso wie die C_H1-Domänen der schweren Ketten. Die antigenbindende Domäne besteht bei diesen Antikörpern nur aus der VH-Domäne der schweren Ketten (V_HH, variable domain of the heavy chain of camelid heavy chain antibody) und wird in isolierter Form auch Nanobody als oder Einzeldomänenantikörper bezeichnet. Diese Nanobodies können leicht als rekombinante Proteine produziert werden und sind mit einer Molekülmasse von nur ~15-18 kDa zehnmal kleiner als konventionelle IgG-Antikörper. Weitere nützliche Eigenschaften sind ihre gute Löslichkeit, thermodynamische Stabilität und eine gute Gewebegängigkeit (Harmsen und de Haard 2007, Wesolowski et al. 2009, Muyldermans 2013, Bruce et al. 2016, Gonzalez-Sapienza et al. 2017).

Ein entscheidender Vorteil ergibt sich durch die niedrige Molekülmasse. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern können Nanobodies die renale Filtrationsbarriere (Blut-Harn-Schranke) passieren und mit dem Urin schnell aus dem Kreislauf ausgeschieden werden (Cortez-Retamozo et al. 2002, Harmsen und de Haard 2007, Kijanka et al. 2013, Bannas et al. 2014). Außerdem weisen Nanobodies eine sehr geringe

Immunogenität auf (Cortez-Retamozo et al. 2002, Van Bockstaele et al. 2009, Hassanzadeh-Ghassabeh et al. 2013, Oliveira et al. 2013).

Wie oben erwähnt, wird für die nicht-invasive molekulare Bildgebung in vivo ein hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis angestrebt. Da Nanobodies eine bessere Gewebegängigkeit als konventionelle mAk haben und zudem renal schneller elimiert werden (Cortez-Retamozo et al. 2004), bietet es sich an, diese beiden Formate anhand der molekularen NIRF-Bildgebung zur nicht-invasiven Tumordiagnostik zu vergleichen (Vaneycken et al. 2011a (SPECT), Oliveira et al. 2012, Bannas et al. 2015). In unserem Labor wurden spezifische Nanobodies gegen die humane Variante des Oberflächenenzyms CD38 isoliert. Der Nanobody mit der höchsten Affinität wurde für die folgenden Experimente ausgewählt und als MU1067 bezeichnet. Für vergleichende Untersuchungen zur NIRF-Bildgebung wurden (a) der monoklonale αhCD38-Antikörper A10 und (b) der Nanobody MU1067 jeweils mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 (AF680) gekoppelt.



Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Bindung von MU1067⁶⁸⁰ und A10⁶⁸⁰ an hCD38 Der Nanobody MU1067 und der mAk A10 erkennen und binden spezifisch das membrangebundene humane CD38 auf der Oberfläche von Lymphomzellen. Die AlexaFluor 680 Fluoreszenzfarbstoffmoleküle sind als orange Sterne dargestellt.

In **Abbildung 1.2** sind jeweils Moleküle der beiden Antikörperformate als AF680-Konjugate und deren Bindung an hCD38-Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle schematisch dargestellt. Der Nanobody besteht nur aus einer antigenbindenden Domäne (Fab, engl. *"fragment antigen binding"*) und bindet daher jeweils nur ein hCD38-Molekül, während der mAk mit jeder Fab-Region an ein Antigen-Molekül binden und damit zwei Bindungsstellen besetzen kann.

1.6 Das Zielantigen CD38

CD38 oder zyklische ADP-Ribose-Hydrolase ist ein Ektoenzym, das vornehmlich auf der Zelloberfläche von Leukozyten zu finden ist; so zum Beispiel auf CD4+, CD8+, B-Zellen und natürlichen Killerzellen. Da das Enzym vorwiegend auf aktivierten T- und B-Zellen vorkommt, wird es auch als Aktivitätsmarker für Leukozyten verwendet (Malavasi et al. 1994, Berthelier et al. 1998). Die zyklische ADP-Ribose-Hydrolase katalysiert die namensgebende Hydrolyse von NAD⁺ zu zyklischer ADP-Ribose (cADPr). Ferner kommt CD38 auf der Oberfläche von Osteoklasten vor und spielt eine wichtige Rolle im Calciumstoffwechsel (Sun et al. 1999).

Außerdem konnte eine hohe Expressionsrate von CD38 auf der Oberfläche einer Reihe von bösartigen hämatologischen Tumorzelllinien nachgewiesen werden, zum Beispiel von multiplem Myelom, B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, B-CLL, B-ALL und T-ALL (Deckert et al. 2014). Trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahren in der Therapie beispielsweise des multiplen Myeloms und der CLL gemacht wurden, sind diese Krankheiten nach wie vor nicht heilbar. Im Fall von CLL konnte sogar ein Zusammenhang zwischen der Expressionsrate von CD38 auf den Leukämiezellen und der Aggressivität des Krankheitsverlaufs hergestellt werden (Chillemi et al. 2013).

Die erfolgversprechenden präklinischen Ergebnisse des therapeutischen α-hCD38-Antikörpers Daratumumab führten im Jahr 2012 zur Übernahme der entsprechenden Lizenzrechte für eine Summe von 1,1 Milliarden US-Dollar (Hersher 2012). Es gibt demnach ein berechtigtes Interesse sowohl aus medizinischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht, die weitere Erforschung von CD38 als Zielstruktur einer spezifischen nicht-invasiven molekularen Bildgebung in vivo voranzutreiben und die bislang unzureichenden Möglichkeiten in Diagnostik und Therapie auf diesem Feld zu verbessern. Daher wurde auf der Grundlage von vorbereitenden in vitro Versuchen im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit ein in vivo Tumormodell mit einer CD38-positiven Lymphomzelllinie entwickelt und der in **Abbildung 3.8** dargestellte Versuchsaufbau durchgeführt.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die vergleichende Untersuchung der charakteristischen Eigenschaften von Nanobodies und konventionellen Antikörpern in der nicht-invasiven in vivo Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung von Lymphomen am Beispiel von humanem CD38. Dabei lag der Fokus auf der Ermittlung der idealen Dosis und des idealen Zeitpunkts der Bildgebung nach der intravenösen Injektion um ein maximales Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erreichen. In vorangegangenen Studien konnten mit Nanobodies die besten Ergebnisse mit Dosen von 50 µg je Versuchstier erzielt werden (Kijanka et al. 2013, Bannas et al. 2015). Um zu überprüfen ob das auch für den Nanobody MU1067 der Fall sein würde, wurde diese Dosis gewählt. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine zweite niedrigere Dosis von 10 µg je Versuchstier gewählt, da bei Untersuchungen mit konventionellen Antikörpern Vorteile mit dieser Dosierung für die NIRF-Bildgebung beobachtet werden konnten (Bannas et al. 2015). Außerdem sollte die Biodistribution und die Ausscheidung der Antikörperkonjugate genauer untersucht werden, weshalb Serum- und Urinanalysen sowie ex vivo NIRF-Bildgebungen der explantierten Organe 48 Stunden nach Injektion durchgeführt wurden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Entwicklung besserer präklinischer klinischer Methoden zur spezifischen Diagnostik und Therapie von und Tumorerkrankungen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller	
Autoklaven	Modell 2540 EK	Tuttnauer Europe	
Autoriaven	Varioklav	H+P Labortechnik	
		GmbH	
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator 50L	Sanyo	
Durchflusszytometer	FACS Canto II	Becton Dickinson	
	FACS Aria	Becton Dickinson	
Elektroporationssystem	Genepulser II	Bio-Rad	
Gelelektrophorese-Kammer	40-0708	Peclab biotechnology	
(DNA)			
Gelelektrophorese-Kammer	Xcell II MiniCell	Invitrogen	
(Protein)			
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf	
In Vivo Imaging System	IVIS 200	Caliper Life Sciences	
Infrarotlampe	R95E Infrarot-Birne	Philips	
Isofluranvernebler		Völker	
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss	
	Axiovert 200M	Zeiss	
Mikroskop Filterset für	Filterset 32	70155	
Axiovert 200M		20133	
Magnetresonanztomograph	ClinScan 7 Tesla	Bruker	
Mikrowelle	M 637 EC	Miele	
Nanodrop	2000c	Peclab biotechnology	
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved	LaborOptik	
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech	
Pipetten	Research	Eppendorf	
Pipettierhilfe	Pipet Boy acu	Integra Biosciences	
SDS-PAGE	PowerPac 200	BioRad	
Elektrophoresekammer		σισιτάυ	

Sterile Werkbank	Herasafe HS12/2	Heraeus
Thermo Cycler	Т3	Biometra
UV Kamera		Peqlab
UV-Transilluminator	Тур ТІ 1	Biometra
Vortex Mixer	7-2020	Neolab
Waagen	Analytical Plus	Ohaus
	Тур 1412	Sartorius
Wasserbad	Typ 1007	Gesellschaft für
	1901	Labortechnik
Zentrifugen	Rotanta 460 R	Hettich
	Biofuge pico	Heraeus
	Cytospin 12 slot rotor	Shandon Elliot

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Тур	Hersteller
6-well Platten	Durchsichtig	Thermo Scientific
96-well Mikrotiterplatten	durchsichtig, schwarz	Thermo Scientific
Petri Schalen	100x15 mm mit Nocken	
Pipettenspitzen	verschiedene Größen	Sarstedt
Serologische Pipetten	verschiedene Größen	BD Falcon
Zellsieb	70µm	BD Falcon
Kunststoffspritzen	verschiedene Größen	Braun/ BD Biosciences
Injektionsspritzen	SubQ 1 ml	BD Falcon
Skalpellklingen	Figur 18	Bayha
FACS-Röhrchen	Verschiedene	BD Falcon
Cellstar-Tubes (Falcon)	verschiedene Größen	Greiner
Reagiergefäße	verschiedene Größen	Sarstedt
Parafilm	PM-999	Bemis
	10% und 12% Tris, 10	
SDS-PAGE Gele	Wells NuPAGE	Invitrogen
	Alfalfa-frei (low chlorophyll)	
Mausfutter	10mm, 5% Fett	Sniff

2.1.3 Flüssigkeiten, Puffer, Chemikalien

Verbrauchsmaterial	Тур	Hersteller
Agarose	UltraPure, kristallin	Invitrogen
Blasticidin	10 mg/ml	InvivoGen
BSA		Sigma-Aldrich
EDTA	Kristallin	Calbiochem
Ethanol		Merck
Expressionsmedium	FreeStyle F17	Gibco
FCS		Gibco
Heparin-Natrium	100.000 IE/10ml	Braun
Isofluran	100%, flüssig	Abbvie
Isopropanol		Honeywell
JetPei	Transfection Reagent	Polyplus
L-Glutamin	200 mM	Gibco
LDS Sample Buffer	NuPAGE, (4x)	Thermo Fisher
Matrigel Matrix	REF 354234	BD Biosciences
Mowiol-DAPI-Mix		AG Schumacher
Nährmedien für Zellkultur	RPMI 1640	Gibco
	DMEM	Gibco
NRS		Stemcell Technologies
RotiSafe	GelStain	Carl Roth GmbH
Pacific Orange	Succinimidylester	Invitrogen
PBS	DPBS 1x (-CaCl ₂ /-MgCl ₂)	Gibco
Supermarker	BSA, Schwere-Kette +	AG Koch-Nolte
	Leichte-Kette von mAk,	
	Lysozym	

"RPMI Medium komplett":

RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 1% L-Glutamin

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Klon	Fluorophor	Konzentration	Hersteller
MU1067 VHH	MU1067	AF680	0,28 mg/ml	AG Koch-Nolte
MU1067 Fc		AF647		AG Koch-Nolte
A10		AF680	1 mg/ml	AG Malavasi
Anti-msCD45	#13	PerCP/eFluor450	0,2 mg/ml	BioLeg
	#35			BD
Fc-Block	FcgR3/2			Biosciences
(msCD16/CD32)	(2.4G2)	Unmarkiert	0,5 mg/ml	

2.1.5 Restriktionsenzyme

Afl II Schnittstelle: 5' CTTAAG 3' (Schnittstelle im pEF Dest51 Vektor im Bereich der Ampicillin-Resistenz.

2.1.6 DNA

Vektor pEF Dest51, FS #357

2.1.7 Software

Programmname	Version	Hersteller
Word	2007, 2010	Microsoft
Excel	2007, 2010	Microsoft
Powerpoint	2007, 2010	Microsoft
Illustrator	2.0	Adobe
Living Image	4.2	Caliper Life Sciences
GraphPad Prism	5.0	GraphPad Software
FlowJo	9.0	Tree Star
OsiriX	3.9.2	Pixmeo SARL
AxioVision	4.8.2	Zeiss
ImageJ	1.46	Wayne Rasband (NIH)
Mendeley	1.16.3	Mendeley Ltd.

2.1.8 Verwendete Kits

- Alexa Fluor 680 Protein Labeling Kit (A20172), Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Colloidal Blue Staining Kit (LC6025), Invitrogen, life technologies, Carlsbad, California, USA
- QIAquick PCR Purification Kit (50), Qiagen, Venlo, Niederlande

2.1.9 Mauslinie

Für die in vivo Versuche wurden athymische Nacktmäuse der Linie NMRI-Foxn¹nu verwendet. Die Tiere wurden aus der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und von Charles River Laboratories bezogen und in einem Alter zwischen 6 und 10 Wochen bei einem Gewicht zwischen 22 g und 28 g für die Versuche eingesetzt. Die Tiere wurden unter S1 Bedingungen gehalten. Der Allgemeinzustand sowie das Gewicht wurden alle zwei Tage untersucht. Um Interferenzen bei der Fluoreszenzbildgebung aus dem Gastrointestinaltrakt der Tiere durch Chlorophyll zu vermeiden, wurden diese mindestens für eine Woche vor Beginn alfalfa-freiem Futter gefüttert. der Experimente mit Alle angewandten tierexperimentellen Verfahren wurden in Abstimmung mit den international gültigen Richtlinien für den ethischen Umgang mit Tieren durchgeführt und vor Beginn der Experimente von der zuständigen Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Fachbereich Veterinärmedizin, unter Einbeziehung des Tierschutzbeauftragten des UKE genehmigt.

2.1.10 Zelllinien

Die humanen Lymphomzelllinien CA46 (Burkitt-Lymphom), RPMI 8226 (Multiples Myelom), U266 (Multiples Myelom), PA682 (Burkitt-Lymphom), AG876(Burkitt-Lymphom) und Jijoye M13 (Burkitt-Lymphom) wurden für die in vitro Versuche verwendet. Für die in vivo Versuche wurden die humanen Zelllinien CA46, U266 und PA682, sowie die murinen Zelllinien DC27.10 (B-Zelllymphom) und YAC-1 (T-Zelllymphom), jeweils als untransfizierte und als mit dem humanen Enzym CD38 transfizierte Variante, eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 In vitro Zellkulturen

Die nicht-adhärent wachsenden humanen Zelllinien CA46, RPMI 8226, U266, PA682, AG876 und Jijoye M13, sowie die murinen Zelllinien DC27.10/DC27.10 CD38+ und YAC-1/YAC-1 CD38+ wurden in unbeschichteten Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm in 10 ml komplettem RPMI Medium (Zusammensetzung im Materialabschnitt) kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden Subkulturen der Zellen im Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium auf neuen Petrischalen angelegt. Die Zellkulturen wurden in einem CO₂-Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem Anteil von 5% CO₂ in RPMI komplett gehalten. Eine Besiedlung der Zellkulturen mit Mycoplasmen wurde durch regelmäßige Tests ausgeschlossen.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer improved-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurden 10 µl in die Neubauer improved-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt und daraus die durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Großquadrat berechnet. Bei einem Volumen von 0,1 µl/Großquadrat pro ml ergab sich die absolute Zellzahl durch folgende Formel:

Mittlere Zellzahl pro Großquadrat × 10000 × Verdünnungsfaktor = absolute Zellzahl

2.2.3 Synthese der α -CD38 Antikörper A10 und MU1067

Der hCD38-spezifische mAk A10 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Fabio Malavasi (Universität Turin, Italien) zur Verfügung gestellt. Der CD38-spezifische Nanobody MU1067 wurde von der AG Koch-Nolte nach zuvor beschriebenem Verfahren mittels Phage Display Technologie aus dem Blut von immunisierten Lamas hergestellt (Unger, 2012, Dissertation).

2.2.4 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Antikörper

Für die Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung wurden der konventionelle Antikörper A10 und der Nanobody MU1067 mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor® 680 konjugiert. Dafür wurde das AlexaFluor 680 Protein Labeling-Kit (A20172) von Molecular Probes verwendet und die Kopplung entsprechend des vom Hersteller gelieferten Protokolls durchgeführt. Die Fluorophorpartikel reagieren über einen Succinimidylesther-Rest mit primären Aminen des Proteins wodurch stabile Farbstoff-Protein-Konjugate gebildet werden. Nach der Kopplung wurde mit einem Photometer (Pharmacia Biotech) die Absorption (Extinktion) bei 280 nm und 679 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für AF680, sowie der Korrekturfaktor für den Einfluss des zur Kopplung eingesetzten Farbstoffs AF680 auf die photometrische Messung bei 280 nm wurden dem Protokoll des Labeling-Kits entnommen. Der Extinktionskoeffizient für den Nanobody MU1067 wurde anhand der Aminosäureseguenz berechnet (http://web.expasy.org/protparam/):

(LSCVGSGRRFDNYAMAWFRQAPGKERTFVAAISWSSGTTRYLDTVKGRFTISRDN AKSTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARYQPRYYDSGDMDGYEYEFWGQTQVTVS).

Als Extinktionskoeffizient für den konventionellen Antikörper A10 wurde der im Protokoll angegebene Standardkoeffizient eines IgG-Moleküls eingesetzt. Das Verhältnis von Fluorophoren zu Antikörpermolekülen wurde mit der im Protokoll gegebenen Formel und folgenden Werten berechnet:

Exzitationswellenlänge:	679 nm
Emissionswellenlänge:	702 nm
Verdünnungsfaktor:	10
Korrekturfaktor:	0,05
Extinktionskoeffizient AF680:	184000 cm ⁻¹ M ⁻¹
Extinktionskoeffizient MU1067:	31525 cm ⁻¹ M ⁻¹
Extinktionskoeffizient A10:	203000 cm ⁻¹ M ⁻¹ (Standard IgG)
Proteinkonzentration (MU1067):	1,52 x 10⁻⁵M
Absorption bei 679nm (MU1067):	0,266
Absorption bei 679nm (A10):	0,577

Proteinkonzentration

 $\frac{(A280 - A679 \times 0.05) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Extinktionskoeffizient (Ak)}} = \text{Proteinkonzentration in M}$

MU1067:

$$\frac{(0,061 - 0,266 \times 0,05) \times 10}{31525 cm^{-1} M^{-1}} = 1,76 \times 10^{-5} M$$

A10:

$$\frac{(0,175 - 0,577 \times 0,05) \times 10}{203000 cm^{-1} M^{-1}} = 7,2 \times 10^{-6} M$$

Fluorophore pro Antikörper

 $\frac{A679 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Extinktionskoeffizient (AF680)} \times \text{Proteinkonzentration in M}} = \text{Fluorophore pro Antikörper}$

MU1067:

$$\frac{0,266 \times 10}{184000 cm^{-1} M^{-1} \times 1,52 \times 10^{-5} M} = 0,82$$

A10:

$$\frac{0,577 \times 10}{184000 cm^{-1}M^{-1} \times 7,2 \times 10^{-6}M} = 4,36$$

Die Reinheit der Kopplung wurde durch eine SDS-PAGE Größenfraktionierung und anschließende Coomassie-Färbung bestimmt und mit einem In Vivo Imaging System (IVIS, PerkinElmer) überprüft. Zum Beladen des SDS-PAGE-Gels wurde der Ladepuffer angesetzt, bestehend aus 50 µl Wasser, 50 µl LDS und 10 µl DTT für zehn Proben. Davon wurden jeweils 10 µl mit 10 µl der Probe oder für die erste Spur mit 10 µl des Supermarkers gemischt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei 70 °C erhitzt und anschließend für drei Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die 20 µl wurden dann 24 in die Geltaschen überführt. Zuvor war das SDS-PAGE-Gel in die Kammer eingesetzt und die Kammer mit MES-Running Puffer aufgefüllt worden. Das Gel wurde für 40 Minuten einer Spannung von 200 V ausgesetzt. Für die anschließende Coomassie-Färbung wurde das Colloidal Blue Staining Kit verwendet und diese wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Danach wurde das Gel getrocknet und fotografiert.

2.2.5 Färben von Zellen mit fluorophormarkierten Antikörpern

In Vorbereitung auf alle in vitro oder ex vivo Versuche wurden je 1x10⁶ Zellen in 200 µl PBS mit 1 µg eines Antikörper-AF680 Konjugats bei 4 °C unter abgedunkelten Verhältnissen für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweifach mit je 1 ml PBS gewaschen und in das benötigte Untersuchungsgefäß überführt. Um die Zellen von dem für den Waschvorgang eingesetzten PBS zu befreien, wurden diese jeweils für fünf Minuten bei 4 °C mit 1600 rpm zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich) und der Überstand verworfen.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACS Canto II (BD Biosciences) durchgeführt. Dieses wurde regelmäßig gewartet und gereinigt. Zur Messung der mit AF680 markierten Antikörper wurden gegenüber der Grundeinstellung je zwei Filter (660/20 des blauen Lasers gegen 670LP des roten Lasers) und zwei Spiegel (685LP des blauen Lasers gegen 735LP des roten Lasers) ausgetauscht.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem Verhältnis von 1x10⁶ Zellen in 200 µl PBS in FACS Röhrchen verdünnt und wenn nicht anders beschrieben mit 1 µg Antikörper inkubiert. Bis kurz vor der Messung wurden alle Röhrchen stets abgedunkelt auf Eis gelagert und direkt vor der Messung noch einmal mit einem Vortex Schüttler durchmischt um eine Verklumpung von Zellen zu vermeiden.

Für das Cell-Sorting der hCD38-positiven Zellen nach der stabilen Transfektion wurde ein FACS Aria verwendet. Die Akquirierung und Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo Software. Dabei wurden jeweils untransfizierte Zellen als Negativkontrolle verwendet. Das CD38-Signal dieser Kontrollzellen wurde orientierend für das Gating der CD38-transfizierten Zellen herangezogen um Zellpopulationen einteilen zu können.

2.2.7 Enzymatische Spaltung des Trägervektors von hCD38

Zur erleichterten Aufnahme des Vektors in die Zielzellen wurde dieser vor der Transfektion enzymatisch gespalten, also gezielt mithilfe eines Restriktionsenzyms in einem nicht benötigten Bereich geschnitten und damit aus einer Ringform in eine linearisierte Form überführt. Die Durchführung dieser Reaktion erfordert spezielle Rahmenbedingungen um eine ideale Ausbeute zu ermöglichen. Dafür wurde eine genau definierte Menge des zu verdauenden Vektors gemeinsam mit einem Puffer und bovinem Serumalbumin angesetzt und mit Wasser und dem Restriktionsenzym ergänzt. Dieser Ansatz wurde in einen Thermocycler gegeben, welcher nach einem voreingestellten Programm die Temperatur verändert und damit die Reaktion einleitet.

Programm #28: 3 h 37 °C, 20 min 65 °C, kühlen bei 4 °C

Benötigte Komponenten:

- Vektor pEF dest 51 inklusive des kodierenden Genabschnitts für hCD38
- Restriktionsenzym Afl II (5' CTTAAG 3') für den gezielten Verdau des Vektors in einem nicht benötigten Bereich (Ampicillin-Resistenz)
- 10 Ansätze à 2µg DNA für den Verdau bestehend aus jeweils
 - ο 13 μl H₂O
 - ο 2 μl NEB Buffer 4
 - $\circ ~~2~\mu I~BSA$
 - \circ 2 µl DNA
 - ο 1 μl Afl II

Nach dem Ende des Programms wurde die DNA nach Anleitung des QIAquick PCR purification Kit Protocols aufgereinigt. Im Anschluss wurde zur Kontrolle der enzymatischen Spaltung des Vektors eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, diese zeigte einen sauberen Verdau. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrops gemessen. Diese ergab, dass von den eingesetzten 20 µg DNA nach dem Verdau 6 µg DNA übriggeblieben waren. Diese linearisierte DNA wurde anschließend für die stabile Transfektion verwendet.

2.2.8 Stabile Transfektion muriner Lymphomzellen mit humanem CD38

Das codierende Gen für das humane Enzym CD38 wurde in die murinen Lymphomzelllinien YAC-HH und DC27.10 transfiziert. Untransfizierte YAC-HH und DC27.10 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Das codierende Gen für humanes CD38 wurde als Bestandteil des linearisierten DNA-Vektors pEF dest 51 in die Lymphomzellen überführt. Für die Transfektion wurde das Verfahren der Elektroporation angewendet. Der Trägervektor enthielt neben der Gensequenz von humanem CD38 außerdem die codierenden Abschnitte für eine Blasticidin-Resistenz, welche nach der Transfektion eine Selektion mit Blasticidin der Zellen ermöglichte, die den Vektor und damit die Fähigkeit der Resistenz erfolgreich aufgenommen hatten. Dafür wurde zuvor die niedrigste Konzentration von Blasticidin bestimmt (10 µg/ml), welche ausreicht um alle unbehandelten Zellen abzutöten. Für die Elektroporation wurden 1x10⁷ Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium aufgenommen und in eine Küvette überführt. Anschließend wurden 3 µg der linearisierten DNA, mit dem enthaltenen Gen für humanes CD38 hinzugefügt und die Küvette in den Genepulser gesteckt. Die Küvette mit der enthaltenen Probe wurde für eine Dauer von drei Sekunden einer elektrischen Spannung von 0,25 V und mit einer Kapazität von 960 µF ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in vorgewärmte Petrischalen in komplettem RPMI Medium ausplattiert und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 48 Stunden wurde Blasticidin hinzugefügt, um alle Zellen abzutöten, die den Transfektionsvektor nicht aufgenommen hatten. Die Zellen wurden täglich im Lichtmikroskop beobachtet. Nach zwei Wochen war ein eindeutiges Wachstum erkennbar. Per FACS-Analyse konnte die Expression des durch das transfizierte Gen codierten Proteins auf der Oberfläche der Zellen nach Inkubation mit MU1067680 nachgewiesen werden. Anschließend wurde mit einem FACS Aria ein Cell-Sorting mit einer Selektion auf humanes CD38 durchgeführt.

2.2.9 In vitro Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die fluoreszenzoptische Validierung der Bindung der CD38-Antikörperkonjugate auf der Zelloberfläche wurden je 1x10⁷ Zellen mit je 1 µg der beiden Antikörperkonjugate für 30 Minuten inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Cytospin Zentrifuge (Cytospin 12 slot rotor, Shandon Elliot) für fünf Minuten bei 800rpm auf 27 Objektträger übertragen. Zur Fixierung wurden die Objektträger fünf Minuten in Aceton eingelegt, welches zuvor auf -20 °C gekühlt worden war. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden die Zellen mit einem Mix aus Mowiol und DAPI benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C vor Licht geschützt gelagert und am nächsten Tag mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) untersucht. Dabei wurde der Cy5-Kanal für AF680-Färbung verwendet, der DAPI-Kanal für die Zellkernfärbung und der Hellfeld-Kanal für die Darstellung der Zellstrukturen unabhängig von der Färbung zur späteren Überlagerung mit den Fluoreszenzsignalen. Für den Cy5-Kanal wurde ein spezieller Filter eingesetzt, um das AF680-Signal optimal zu detektieren (Filterset 32, Exzitation: BP 665/45, FT 695, Emission: BP 725/50, Zeiss).

2.2.10 Wachstumskontrollen der Tumoren im MRT

Für die Etablierung des Tumormodells war es nötig, das Wachstum der subkutan injizierten Lymphomzellen regelmäßig zu überprüfen. Durch die Verwendung eines Magnetresonanztomographen war dies möglich, ohne dass die Tiere getötet werden mussten. Es wurde ein ClinScan 7 Tesla MRT von Bruker verwendet. Die Mäuse wurden jeweils vor und während der Messungen mit Isofluran sediert. Anschließend wurde jeweils zunächst eine 54 sekündige Localizer-Sequenz zur Bestimmung des zu messenden Bereiches gefahren. Sobald dieser Bereich definiert war, folgte eine Messung der Tumorregion in der Transversalebene (Dauer 3:42 Min.) und eine in der Koronarebene (Dauer 3:42 Min.), jeweils in T2-Wichtung. Dabei wurden Schichtbildaufnahmen mit einer Schichtdicke von 0,8 mm angefertigt. Mithilfe der Osirix-Software wurden die aussagekräftigsten Aufnahmen ausgesucht und für die Darstellung der Tumoren optimiert.

2.2.11 Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Bildgebung

Bei den meisten in vitro- und allen in vivo- sowie ex vivo-Experimenten wurde der Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor⁶⁸⁰ (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Die maximale Anregung (Exzitation) dieses Fluorophors wird bei einer Wellenlänge von 679 nm erreicht und die maximale Abstrahlung (Emission) kann bei einer Wellenlänge von 702 nm detektiert werden.

2.2.12 NIRF-Bildgebung in vitro

Es wurden je 1x10⁶ hCD38-positive und negative YAC-Zellen genau wie für die FACS-Versuche mit A10⁶⁸⁰ oder MU1067⁶⁸⁰ inkubiert und in die Wells einer schwarzen 96-Wellplatte überführt. Nach Absetzen der Zellen am Boden wurden NIRF-Aufnahmen mit dem IVIS aufgenommen und diese mit der LivingImage Software ausgewertet. Dabei wurden die gleichen Filtereinstellungen verwendet wie für die in vivo Aufnahmen. Die Farbintensitätsskala wurde SO gewählt, dass keine Hintergrundsignale mehr zu erkennen waren. Als Hintergrundwerte wurden Probenvertiefungen gewählt, die nur mit PBS befüllt wurden.

2.2.13 NIRF-Bildgebung in vivo

Zur Vorbereitung auf die NIRF-Bildgebung in vivo wurden die Mäuse mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn ausschließlich mit alfalfa-freiem Futter ernährt, um eine Verfälschung der Messwerte durch Autofluoreszenz aus dem Gastrointestinaltrakt während der Fluoreszenzaufnahmen zu minimieren. Um das Wachstum zweier Tumoren vergleichbarer Größe zu erreichen, wurden 8-10 Tage vor den in vivo Aufnahmen 1,5x10⁶ CD38-negative YAC-Zellen subkutan rückseitig im Bereich des linken Vorderlaufs und 2,0x10⁶ CD38-positive YAC-Zellen entsprechend auf der rechten Seite injiziert. Die Zellen wurden in einer Mischung von 0,1 ml RPMI Medium und 0,1 ml Matrigel (BD Biosciences, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) aufgenommen und injiziert. Die verschiedenen Zellzahlen wurden gewählt um die abweichenden Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Zelllinien auszugleichen. Nach 8-10 Tagen hatten die Tumoren eine Größe von circa 8 mm erreicht. Direkt im Anschluss an die Subkutaninjektion wurde das Futter auf die alfalfa-freie Diät umgestellt. Nach Erreichen der notwendigen Tumorgröße wurden jeweils Leeraufnahmen aller am Versuch beteiligten Mäuse mit dem IVIS aufgenommen. Anschließend wurde den Mäusen je nach Gruppe 10 µg oder 50 µg des Nanobody-Konjugats MU1067⁶⁸⁰ oder des Antikörperkonjugats A10⁶⁸⁰ in 0,2 ml PBS intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Es wurden weitere NIRF-Aufnahmen 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach der Injektion gemacht. Dazu wurden bis zu 4 Mäuse gleichzeitig in der Kammer des Kleintier-NIRF-IVIS platziert und Aufnahmen mit den folgenden Fluoreszenzfiltern angefertigt: 615-665 nm zur Exzitation, 695-770 nm zur Emission und 580-610 nm für die Hintergrundkorrektur. Sowohl für die Injektionen als

auch die NIRF-Aufnahmen wurden die Mäuse jeweils über einen Vernebler mit Isofluran sediert. Die Aufnahmen wurden mit der Living Image 4.2 Software ausgewertet. Neben der qualitativen Analyse erfolgte die quantitative Analyse der Bilder. Dafür wurden ROIs (region of interest) im Bereich des CD38-negativen Tumor (links), des CD38-positiven Tumor (rechts), der Nieren und des rechten Hinterlaufs (Hintergrundwert) platziert und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Das Tumor-zu-Hintergrund Verhältnis wurde aus dem Quotienten der ROI über dem Tumor und der ROI über dem rechten Hinterlauf berechnet.

Auf dem Zeitstrahl im oberen Teil der **Abbildung 3.8** ist der zeitliche Ablauf der im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Experimente schematisch dargestellt. Insgesamt wurde für einen Durchlauf eine Dauer von zehn Tagen veranschlagt. Diese beinhaltete ab der subkutanen Injektion der Tumorzellen ca. 7-8 Tage für das Tumorwachstum und zwei Tage für die in vivo und ex vivo Bildgebung, sowie die weiterführenden durchflusszytometrischen Untersuchungen.

2.2.14 NIRF-Bildgebung ex vivo per IVIS

48 Stunden nach der intravenösen Injektion der fluorophormarkierten mAk oder Nanobodies wurde die letzte in vivo Messung durchgeführt. Die Tiere wurden per Genickbruch getötet und der Blutkreislauf wurde mit 20 ml PBS gespült, um die verbleibenden ungebundenen Antikörpermoleküle den Organen aus herauszuwaschen. Hierfür wurde die linke Herzkammer punktiert und der rechte Herzvorhof inzidiert. Im Anschluss wurden die beiden Tumoren aus dem Schulterbereich, sowie folgende Organe entnommen: Milz, Lunge, Leber mit Gallenblase, Nieren, Magen, ein Teil des Dünndarms und ein Stück Muskel. Diese wurden auf einer schwarzen Matte aufgereiht und erneut mit dem IVIS gemessen. Mit der Livinglmage-Software wurde über jedem Organ eine ROI zur Messung der mittleren Fluoreszenzintensität platziert. Durch die Bildung des Quotienten aus der ROI der jeweiligen Organe und der ROI des Muskels wurde das Organ-zu-Hintergrund-Verhältnis (O/H-Verhältnis) gebildet.

2.2.15 FACS-Kontrolle der explantierten Tumorzellen

Nachdem die ex vivo Aufnahme der explantierten Organe und Tumoren mit dem IVIS erfolgt war, wurden die Tumoren in einer AEBSF-Lösung aufgenommen. Dieser Protease-Inhibitor soll den Abbau der gebundenen Antikörpermoleküle bis zur Messung verhindern. Für die durchflusszytometrische Analyse war es notwendig, das Tumorparenchym in eine Einzelzellsuspension zu bringen. Dafür wurde der Tumor zunächst grob mit einer Schere zerkleinert und anschließend mit dem Stempel einer Kunststoffspritze durch ein Zellsieb (Cellstrainer) mit Poren von 70 µm gedrückt und in 10 ml PBS/BSA 2% aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch mikroskopische Zählung in der Neubauer improved-Zählkammer bestimmt, wie oben beschrieben. Je 1x10⁶ Zellen wurden für 15 Minuten bei 4 °C mit der Fc-Block-Mischung inkubiert, bestehend aus je 100 μl PBS/BSA 0,2%, 1 μl unkonjugiertem Antikörpermix aus α-msCD16/CD32 und 1µl NRS. Anschließend wurde der Überstand abzentrifugiert und verworfen. Die Zellen wurden erneut in 100 µl PBS/BSA 0,2% aufgenommen und mit 1 µg desselben Antikörperkonjugats inkubiert, welches bereits in vivo der Maus injiziert worden war, aus welcher der entsprechende Tumor explantiert worden war. Zusätzlich wurde zu jeder Probe 0,5 μg α-msCD45^{eFluor450} hinzugegeben, um Tumorzellen von anderen Zellen unterscheiden zu können. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C in 200 µl einer 1:1000 Verdünnung PacO in reinem PBS zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen inkubiert. Nach zwei erneuten Waschgängen wurden die Zellen in 150 µl PBS aufgenommen und im FACS gemessen.

2.2.16 Urin- und Serumanalyse

Zur Bestimmung der Biodistribution der Antikörperformate im Körper der Mäuse und der Ausscheidung über den Urin wurde bei allen Mäusen aus **Abbildung 3.9**. innerhalb der ersten 4 Stunden nach der intravenösen Injektion Urin gewonnen und nach 4 Stunden ca. 100 µl Blut abgenommen. Ebenso wurde direkt im Anschluss an die Tötung der Tiere nach 48 Stunden Urin und Blut gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gekühlt. Das Blut wurde jeweils mit 10 µl Heparin (100 IE) gemischt, um die Blutgerinnung zu unterbinden. Anschließend wurde das Blut für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Serum und Urin wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur FACS-Analyse wurden

die Proben aufgetaut und jeweils 10 μ l Serum oder Urin auf 1x10⁶ CD38+ oder CD38-YAC-Zellen aus Zellkultur in 90 μ l PBS gegeben um eine 1:10 Verdünnung herzustellen. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Proben zweimal gewaschen und anschließend erneut in 150 μ l PBS aufgenommen und im FACS gemessen.

2.2.17 Statistische Auswertung

Die Daten wurden jeweils als Mittelwert mit der Standardabweichung angegeben. Für die Berechnung der Signifikanzniveaus der quantifizierten in vivo Daten (**Abb. 3.12.**, **3.13**) wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two way Anova) durchgeführt und nach der Bonferroni-Methode korrigiert. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Für die statistische Auswertung wurden Prism 5 (GraphPad Software) und Excel (Microsoft) verwendet.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Etablierung eines Tumormodells für die intravitale NIRF-Bildgebung beschrieben. wurde nach Dabei zunächst humanen Lymphomzelllinien gesucht, die natürlicherweise das Enzym CD38 auf der Zelloberfläche exprimieren. Der Hintergrund dafür ist die bessere Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus den Experimenten auf den menschlichen Organismus. Zusätzlich wurde nach einer weiteren Lymphomzelllinie gesucht, die keine oder eine möglichst geringe Oberflächenexpression von CD38 aufweist, um diese als Negativkontrolle einzusetzen. Das sehr heterogene Wachstum der verschiedenen Zelllinien verhinderte jedoch die erfolgreiche Etablierung einer solchen humanen Vergleichslinie. Daher Zelllinie Schritt eine gute wurde im nächsten murine gewählt. deren Wachstumseigenschaften bereits bekannt waren. Die Gensequenz des humanen CD38 wurde mittels eines Trägervektors durch Elektroporation in das Genom der Zelllinien YAC-1 und DC27.10 transfiziert. Diese Zellen zeigten ein zuverlässiges und gleichmäßiges Wachstum in vivo und wurden daher für die Versuche zur intravitalen Bildgebung eingesetzt.

Der zweite Abschnitt behandelt die vergleichenden in vitro Bindungsanalysen von fluorophormarkierten CD38-spezifischen Nanobodies und konventionellen Antikörpern an Lymphomzellen. Der Nanobody MU1067 und der konventionelle Antikörper A10 binden beide an das humane Enzym CD38 und wurden für die in vitro, in vivo und ex vivo Analysen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 gekoppelt. Die Bindung an die CD38-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und IVIS nachgewiesen.

Im dritten Abschnitt wird die Anwendung der aus den in vitro Versuchen gewonnenen Erkenntnisse im Mausmodell in vivo beschrieben. Dafür wurden die mit humanem CD38 transfizierten murinen Lymphomzellen der Linie YAC-CD38 und untransfizierte YAC-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine spezifische Anreicherung der beiden Antikörperkonstrukte im CD38-positiven Tumor. Es ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der sonstigen Verteilung im Körper der Mäuse und der Ausscheidung der fluorophormarkierten Nanobodies und der konventionellen Antikörper.

3.1 Etablierung eines CD38-Allograft-Tumormodells mit Lymphomzellen für die intravitale Bildgebung

Das Ziel der Arbeit war, durch vergleichende in vivo Analysen über die Zeit neue Erkenntnisse über die unterschiedlichen Eigenschaften des Nanobodys MU1067 und des konventionellen Antikörpers A10 im Hinblick auf die diagnostische NIRF-Bildgebung zur spezifischen Tumorerkennung von CD38-positiven Tumoren zu gewinnen. Dafür war ein Tumormodell notwendig, dass in verlässlicher Weise in einem angemesssenen Zeitraum Tumoren in den athymischen Mäusen wachsen lässt. Um eine möglichst gute Übertragbarkeit der Erkenntnisse von dem Modell auf den Menschen zu ermöglichen, sollten für diesen Zweck humane Zelllinien verwendet werden. Da kein passendes Tumormodell verfügbar war, wurden verschiedene humane Lymphomzelllinien untersucht.

3.1.1 Drei von sechs humanen Lymphomlinien zeigen eine natürliche Oberflächenexpression von CD38

Lymphome weisen besonders häufig eine Überexpression von CD38 auf der Zelloberfläche auf und eignen sich dadurch besonders gut für die Bildgebung mit CD38-spezifischen Antikörperkonstrukten. Neben einer Zelllinie mit einer starken CD38-Expression wurde zusätzlich eine Negativkontrolle benötigt, also eine möglichst ähnliche Zelllinie, die kein oder nur sehr wenig CD38 exprimiert. Es wurden sechs verschiedene Linien auf ihre natürliche CD38-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht.



Abb. 3.1: Die humanen Lymphomzelllinien CA46, RPMI 8226 und Jijoye M13 exprimieren CD38 auf der Zelloberfläche.

Die Zellen wurden mit dem fluorophormarkierten anti-hCD38 Nanobody MU1067⁶⁸⁰ und LD PacO inkubiert und das Signal im FACS gemessen. Durch die Gating-Strategie wurden nur lebende Zellen (LDPacO-negativ) eingeschlossen. Die Ergebnisse wurden bei weiteren Messungen nach einer Anfärbung mit einem MU1067-Fc-Konstrukt und dem konventionellen anti-CD38 Antikörper AT13 bestätigt.

Die FACS-Plots aus **Abbildung 3.1** zeigen eine homogene starke Expression von CD38 auf den CA46-Zellen und den Jijoye M13-Zellen, eine eher inhomogene Population bei den RPMI 8226-Zellen und nur sehr schwache Signale auf den Zellen der Linien AG876, U266 und PA682. Aufgrund der gleichmäßig CD38-positiven Population erschienen besonders die Lymphomlinien CA46 und Jijoye M13 für das Tumormodell geeignet zu sein. Da Jijoye M13 auch bereits im ungefärbten Zustand ein leicht CD38-positives Signal aufwies, wurde die Lymphomzelllinie CA46 für die in vivo Testung ausgewählt. Für die Negativkontrolle kamen die Linien PA682, U266 und AG876 infrage. AG876 wird nicht weiter berücksichtigt, da sie eine inhomogene Population aufwiesen, die in den CD38-positiven Bereich hineinreichte. PA682 und U266 unterschieden sich nur geringfügig und hatten beide eine sehr geringe CD38-Expression. Aufgrund der deutlich schnelleren Teilungsrate in vitro wurde zunächst nur die Linie PA682 für die in vivo Testung ausgewählt.



Abb. 3.2: Beide getesteten Lymphomzelllinien führen in vivo im Mausmodell sechs Wochen nach subkutaner Injektion nur in 50% (PA682) bzw. 26% der Fälle zu einem erkennbaren Tumorwachstum.

Wechselnde Zellzahlen, gelöst in einem Mix aus 100 μ L RPMI Medium und 100 μ L Matrigel, wurden subkutan in die Region des rechten oder linken Vorderlaufs auf dem Rücken injiziert. Nach spätestens sechs Wochen wurden die Mäuse mit der Magnetresonanztomographie untersucht, um ein eventuelles Tumorwachstum festzustellen. Insgesamt wurden 48 subkutane Injektionen mit PA682 durchgeführt, die in 24 Fällen (=50%) zu einem erkennbaren Wachstum eines Tumors mit einem Durchmesser von mehr als 2 mm führte. Nach subkutaner Injektion von CA46 kam es lediglich in 10 von 39 Fällen (=26%) zu einem erkennbaren Tumorwachstum.

Die MRT-Kontrollen des Tumorwachstums nach sechs Wochen führten zu dem Ergebnis, dass nur in der Hälfte der Fälle nach der subkutanen Injektion von PA682 ein solider Tumor an der Injektionsstelle entstand. Nach Injektion von CA46 Zellen kam es sogar nur in etwas mehr als einem Viertel der Fälle zu einem erkennbaren Tumorwachstum. Dieser Anteil ist nicht ausreichend, um ein verlässliches Tumormodell zu etablieren, mit dem Reihenversuche durchgeführt werden können. Hinzu kam, dass es auch durch Variation der Zellzahl und des Injektionszeitpunktes nicht gelang, einen PA682 Tumor (CD38-negativ, Negativkontrolle) auf der linken Seite und einen CA46 Tumor (CD38-positiv) auf der rechten Seite in derselben Maus zu erzeugen. Das unzuverlässige und sehr heterogene Wachstum der humanen Lymphomzelllinien führte zu einem Umdenken in der Strategie zur Etablierung eines CD38-Tumormodells. Statt eines Xenograft-Modells mit humanen Zellen in einer Maus wurde deshalb ein Allograft-Modell mit Mauszellen etabliert.
3.1.2 Stabile Transfektion von murinen Lymphomzellen mit humanem CD38

Der Vorteil muriner Lymphomzellen ist das bekannte verlässliche Wachstum in vivo. Natürlicherweise exprimieren diese Zellen aber kein CD38 oder nur die murine Variante des Enzyms. Das ursprüngliche Studiendesign beruhte auf dem Nanobody MU1067 und dem konventionellen Antikörper A10, die beide spezifisch gegen die humane CD38-Variante gerichtet sind. Um diese Antikörperformate auch in der modifizierten Studie einsetzen zu können, musste eine Möglichkeit gefunden werden, dass die murinen Lymphomzellen die humane CD38-Variante auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Eine Transfektion der codierenden Gensequenz für humanes CD38 in die murinen Zellen ermöglicht die Integration des Gens in deren Genom und damit eine dauerhafte Produktion und Oberflächenpräsentation des Enzyms. Für die Transfektion wurde ein Trägervektor verwendet. Durch das Verfahren der Elektroporation sollte die Aufnahme dieses Vektors in die Zellen erleichtert werden.



Abb. 3.3: Die Transfektion von humanem CD38 in die murinen Zelllinien YAC-1 und DC27.10 führt zu einer homogenen Oberflächenexpression.

Dargestellt sind FACS-Messungen von jeweils 1x10⁶ Zellen nach 30-minütiger in vitro Inkubation mit dem Nanobody MU1067⁶⁸⁰ und LDPacO, bzw. mit MU1067-Fc⁶⁴⁷ (Cell-Sorting, dritte Spalte). Das Signal für AF680/APC (AF647) und damit für humanes CD38 ist auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse ist der Forward-Scatter aufgetragen. Durch die Gating-Strategie wurden nur lebende Zellen (LDPacO-negativ) eingeschlossen. Die erste Spalte der FACS-Plots zeigt die durchflusszytometrische Analyse auf humanes CD38. Zwei Wochen nach der Transfektion und nach Blasticidin-Selektion wurden die Zellen erneut auf ihre CD38-Expression untersucht (zweite Spalte). Es wurde ein Sorting auf CD38-positive Zellen vorgenommen (dritte Spalte) und die Zellen drei (vierte Spalte) und fünf (fünfte Spalte) Wochen nach der Transfektion erneut im FACS analysiert. Die jeweils oberen Populationen exprimieren hCD38 auf der Oberfläche.

Es wurden die beiden murinen Lymphomzelllinien YAC-1 und DC27.10 aufgrund ihrer beschriebenen guten Wachstumseigenschaften in vivo für die Transfektion ausgewählt.

Wie in **Abbildung 3.3** zu sehen ist, waren beide Linien vor der Transfektion hCD38negativ. Direkt im Anschluss an die Elektroporation erfolgte eine Blasticidin-Selektion, sodass nur die Zellen überleben sollten, die den Vektor erfolgreich aufgenommen haben und damit auch die Gensequenz für eine Blasticidin-Resistenz. Nach einer Transfektion der zweiwöchigen Erholungsphase nach hatten sich zwei Subpopulationen gebildet. Die obere Population produzierte nun das Enzym auf ihrer Zelloberfläche, wo es von fluorophormarkierten Antikörpern gebunden werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits mehr als 30% der YAC-Zellen und mehr als 50% der DC27.10-Zellen hCD38-positiv. Trotz der Blasticidin-Behandlung hatten jedoch auch viele Zellen überlebt, die nach wie vor kein hCD38 produzierten. Da eine möglichst homogene Population mit einer starken hCD38-Expression für das Tumormodell erforderlich ist, wurde ein Cell-Sorting durchgeführt. Dafür wurden nur hCD38-positive Zellen mit einer besonders hohen Expressionsstärke ausgewählt. Die anschließenden FACS-Analysen dieser Zellen zeigten, dass in beiden Fällen nur noch eine homogene Population mit einer hohen hCD38-Oberflächenexpression auf mehr als 99% der Zellen vorhanden ist. Fünf Wochen nach der Transfektion standen somit zwei verschiedene murine Lymphomzelllinien zur Verfügung, die beide kontinuierlich humanes CD38 auf der Oberfläche exprimierten. Zudem war mit den untransfizierten Zellen der beiden Zelllinien jeweils eine ideale Negativkontrolle vorhanden. Mit der Etablierung der hCD38-positiven Zelllinien YAC-1 und DC27.10 konnte die entscheidende Voraussetzung für die angestrebte in vivo Testung des murinen Tumormodells erfüllt werden.

3.1.3 Murine Lymphomzellen zeigen nach Transfektion mit humanem CD38 ein verlässliches und einheitliches Wachstum in vivo

Wie oben beschrieben, wurden Suspensionen der hCD38-transfizierten murinen Zellen jeweils subkutan in die rechte Schulterregion und entsprechende untransfizierte Zellen in die linke Schulterregion der Versuchstiere injiziert. Nach einigen Tagen waren bereits makroskopisch von außen tumorverdächtige Raumforderungen an den Injektionsstellen zu beobachten. Mit einem Kleintier-MRT wurden Schichtbilder der Körperregionen angefertigt, in denen Tumoren vermutet wurden. Mithilfe dieses Verfahrens war es möglich, entstandene Tumoren zu identifizieren und auszumessen. Gleichzeitig konnten damit solide Bereiche von umgebendem Gewebe unterschieden werden.



Abb. 3.4: CD38-transfizierte und untransfizierte YAC- und DC27.10-Zellen bilden nach sechs Tagen einen Tumor, der im MRT nachweisbar ist.

Die Mäuse wurden mit einem Isofluranvernebler betäubt und unter kontinuierlicher inhalativer Isofluran-Sedierung auf dem Versuchsschlitten platziert. Es handelt sich bei allen Aufnahmen um transversale Schnittbilder in T2-Wichtung auf Höhe des Brustkorbs, der Abgang der Vorderläufe ist teilweise zu erkennen. Der Rücken der Tiere ist unten im Bild angeordnet, der Bauch zeigt nach oben. Rechts und links sind aufgrund des standardisierten bildgebenden Verfahrens vertauscht. Links im Bild ist eine Maus zu sehen, der keine Tumorzellen injiziert wurden. Der mittleren Maus wurden rechts hCD38-positive (T+) und links untransfizierte hCD38-negative (T-) DC27.10 Zellen injiziert, der rechten Maus entsprechend (un-) transfizierte YAC-Zellen. Der maximale Durchmesser der jeweiligen Tumoren ist in roter Schrift angegeben.

Die MRT-Aufnahmen in T2-Wichtung zeigten im Transversalschnitt die Lage der soliden Tumoren im subkutanen Unterhautgewebe, die nach der Injektion der Tumorzellen dort gleichmäßig innerhalb von sechs bis acht Tagen bis auf eine Größe von etwa 7 mm im Durchmesser herangewachsen sind. Das ist im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen mit humanen Zelllinien deutlich schneller, zudem wuchsen CD38-positive Zellen und CD38-negative ungefähr gleich schnell. Dieses gleichmäßige Wachstum war die Voraussetzung, um über eine Bildgebung die Verteilung der injizierten Antikörperkonjugate in beiden Tumoren beurteilen und spezifisches von unspezifischem Bindungsverhalten unterscheiden zu können. Bei sehr ähnlichen Wachstumserfolgen in vivo fiel die Wahl auf die Linie YAC-CD38/untr. Alle weiteren in vitro, in vivo und ex vivo Experimente wurden daher nur noch mit YAC-Zellen durchgeführt und dargestellt.

3.2 Vergleichende Bindungsanalysen in vitro mit dem fluorophormarkierten hCD38-spezifischen Nanobody MU1067 und dem konventionellen Antikörper A10 an Lymphomzellen

Die Werkzeuge für die intravitale Bildgebung stellen, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, zwei verschiedene CD38-spezifische Antikörperformate dar - der konventionelle mAk A10 und der Nanobody MU1067. Als Grundlage für weiterführende Experimente in vivo war es zunächst notwendig das Bindungsverhalten der Antikörper in vitro zu untersuchen. Um das Bindungsverhalten der Antikörper an das Target-Enzym CD38 zu visualisieren, wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 680 (AF680) gekoppelt. Durch das emittierte Fluoreszenzsignal können Rückschlüsse auf Verteilung und Bindungsstärke der Antikörper sowie auf die Anzahl der gebundenen Epitope gezogen werden. Außerdem können die Fluoreszenzsignale computergestützt quantifiziert werden, wodurch eine objektive Vergleichbarkeit und die statistische Berechnung signifikanter Unterschiede ermöglicht werden.



Abb. 3.5: Nach Fluorophorkonjugation detektieren sowohl der Nanobody MU1067 als auch der konventionelle Antikörper A10 humanes CD38 auf der Zelloberfläche transfizierter YAC-Zellen.

a) SDS-PAGE Analyse nach Coomassie-Färbung von A10 (Spur 1, 2) und MU1067 (Spur 3, 4) Spur 5 enthält einen Supermarker. Überlagerung mit einer NIRF-Aufnahme desselben Gels. In Spur 1 und 3 sind jeweils 1 µg der unkonjugierten Antikörper aufgetragen, in Spur 2 und 4 1 µg der jeweiligen Antikörper nach Konjugation mit AF680 (gelbrotes Fluoreszenzsignal).
b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CD38-positiven (oben) und CD38-negativen (unten) YAC-Zellen nach Anfärbung mit MU1067⁶⁸⁰ (links) oder A10⁶⁸⁰ (rechts). Blau: DAPI (DNA-Färbung), Rot: Alexa Fluor 680 (hCD38).

Die SDS-PAGE-Analyse verdeutlicht die unterschiedlichen Strukturen der beiden Antikörperformate. A10 besteht wie alle konventionellen Antikörper der Klasse IgG aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die auf Höhe von 50kDa bzw. 25kDa zu finden sind. Der Nanobody MU1067 hingegen besteht nur aus der antigenbindenden Domäne einer schweren Kette (**Abb. 3.5**), woraus sich das deutliche geringere Molekulargewicht von ca. 15kDa gegenüber 150kDa eines konventionellen Antikörpers ergibt. Die sauberen Banden zeigen die Reinheit der Proben. Durch die Überlagerung des Fotos des SDS-PAGE-Gels mit der Fluoreszenzaufnahme desselben Gels, die mit dem IVIS aufgenommen wurde, konnte eine erfolgreiche Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes AF680 an die beiden Antikörper eindeutig nachgewiesen werden. Mithilfe der im Kopplungs-Kit gegebenen Formel wurde die Anzahl der Fluorophorpartikel pro Antikörper im Durchschnitt 4,4 Fluorophore gebunden hatte. Auf jeden MU1067-Nanobody kamen dagegen durchschnittlich nur 0,8 Fluorophore. Als nächster Schritt folgte die Testung der Bindung an das Target-Enzym auf den transfizierten Zellen in vitro. Dafür wurden CD38-transfizierte und untransfizierte YAC-Zellen mit MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ inkubiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Sowohl A10⁶⁸⁰ als auch MU1067⁶⁸⁰ binden das hCD38 auf den YAC-Zellen spezifisch, wobei das Signal der Nanobodies stärker ist als das der mAk (**Abb. 3.5 b**). Auch in der Durchflusszytometrie zeigt sich wie bereits in der Mikroskopie eine spezifische Bindung von A10⁶⁸⁰ und MU1067⁶⁸⁰ an die transfizierten YAC-Zellen. Ebenso wird das stärkere Signal der Nanobodies bestätigt. Besonders deutlich wird der Unterschied auf den IVIS-Aufnahmen (**Abb. 3.6**).





FACS-Analyse (a) und IVIS-Analyse (b) CD38-transfizierter (obere Zeile) und untransfizierter (untere Zeile) YAC-Zellen. Die Zellen wurden jeweils entweder mit MU1067⁶⁸⁰ (linke Spalte) oder A10⁶⁸⁰ (rechte Spalte) inkubiert. **a)** Histogramme der FACS-Analyse, auf der x-Achse ist die MFI der Zellen aufgetragen, auf der y-Achse die Zellzahl. Die grauen Histogramme stellen die gefärbten YAC-Zellen dar, die weißen Histogramme mit gestrichelter Linie die ungefärbten Zellen als Negativkontrolle. **b)** Dargestellt ist ein Ausschnitt einer 96-Wellplatte mit vier verschiedenen Proben. Rechts ist die Farbintensitätsskala im Bereich von 2x10⁶-2x10⁷ (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²) dargestellt.

Mit allen eingesetzten Techniken, also Fluoreszenzmikroskopie, FACS und IVIS werden die CD38-positiven (+) YAC-Zellen spezifisch von beiden Antikörperformaten detektiert, wohingegen die untransfizierten (-) Negativkontrollen keine Signalerhöhung aufweisen. Dabei ist jeweils ein etwas stärkeres Fluoreszenzsignal von den Proben ausgehend zu verzeichnen, die mit dem Nanobody MU1067 inkubiert wurden.

Nach der Untersuchung der Bindungseigenschaften der Antikörper in vitro unter idealen Bedingungen war es noch nötig, eventuell störende Faktoren zu untersuchen, die bei der in vivo Anwendung das Ergebnis beeinflussen könnten. Dazu gehört mechanischer Stress durch vielfaches Pipettieren und die intravenöse Injektion, sowie thermischer Stress durch die Körpertemperatur der Versuchstiere.



Abb. 3.7: Stress durch eine Inkubation bei 37 °C in vitro oder durch mehrfaches Pipettieren beeinflusst das Fluoreszenzsignal gebundener MU1067-Nanobodies und A10-Antikörper nur in geringem Maße.

FACS-Analyse in vitro von YAC-Zellen, nachdem diese mit 0,5 µg MU1067⁶⁸⁰ (obere Zeile) oder A10 (untere Zeile) gefärbt und anschließend verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt worden waren. Dabei wurden die Zellen nach der Inkubation 30x mit einer Pipette aufgezogen (1. Spalte v. l.), für eine Dauer von 30 Minuten (2. Spalte v. l.), 60 Minuten (3.Spalte v. l.) oder 120 Minuten (4. Spalte v. l.) bei 37 °C inkubiert. Die Histogramme stellen die Verteilung der ungefärbten Kontrollzellen (weiß, gestrichelte schwarze Linie), der gefärbten Kontrollzellen ohne Stresseinwirkung (weiß, schwarze Linie) und der gefärbten, gestressten Zellen (grau, graue Linie) dar. Die y-Achse zeigt die Zellzahl an, auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität des Alexa Fluor 680-Signals aufgetragen.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Stresssituationen in vitro simuliert **(Abb. 3.7)**. Dafür wurden CD38-transfizierte YAC-Zellen mit MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ gefärbt und anschließend entweder mechanischem Stress durch wiederholtes auf- und abpipettieren oder thermischem Stress durch Inkubation bei 37 °C ausgesetzt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse, um die durch diese Szenarien hervorgerufenen Auswirkungen auf die CD38-spezifische Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde jedes Szenario einzeln

dargestellt und jeweils ungefärbte und Zellen ohne Stresseinwirkung eingezeichnet. Dabei zeigte sich im Falle von MU1067 eine leichte Abschwächung des Fluoreszenzsignals durch das wiederholte Pipettieren, sowie mit zunehmender Dauer der Inkubation bei 37 °C. Auch bei A10 nahm die MFI durch eine längere Inkubation bei 37 °C ab, wohingegen der Pipettierstress keinen größeren Einfluss zu haben schien. Die Darstellung in Histogrammform lässt jedoch keine genauere Beurteilung dieser Einflüsse zu. Daher wurde eine Quantifizierung des spezifischen AlexaFluor680-Signals vorgenommen und in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab 3.1: Mechanischer und thermischer Stress führen zu einer Reduktion des spezifischen AF680-Signals von maximal 15,8% bei MU1067 und 11,2% bei A10. Ausgehend von einer Probe, die unter idealen Bedingungen mit minimalem Stress mit MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ gefärbt worden war, wurde die spezifische MFI von AF680 als Vergleichswert jeweils auf 100% festgesetzt. Die absolute MFI ist in jeder Zelle angegeben, dahinter ist in Klammern die prozentuale MFI im Vergleich zum Idealwert genannt.

Stressszenario	MU1067 MFI (% von "kein Stress")	A10 MFI (% von "kein Stress")
Kein Stress	27829 (100)	13472 (100)
30 min 37 °C	26641 (95,7)	12622 (93,7)
60 min 37 °C	25073 (90,1)	12208 (90,6)
120 min 37 °C	23417 (84,2)	11968 (88,8)
30x Pipettieren	23851 (85,7)	12413 (92,1)

Die Quantifizierung verdeutlicht, dass eine längere Inkubation bei 37 °C zu einer Abnahme des AF680-Signals führt. Das gilt für beide Antikörperformate, wobei sich MU1067 als etwas anfälliger erweist, mit einer maximalen Signalreduktion von 15,8% nach zwei Stunden Wärmebehandlung im Gegensatz zu 11,2% bei A10. Auch mechanischer Stress durch Pipettieren beeinflusst MU1067 mit einer Reduktion von 14,3% stärker als A10 mit 7,9%.

3.3 Intravitales Imaging von hCD38-positiven YAC-Zelllymphomen mit fluorophormarkierten Nanobodies und konventionellen Antikörpern

Nach der Etablierung des CD38-Allograftmodells mit murinen transfizierten Lymphomzellen und den vergleichenden Bindungsanalysen des AF680-konjugierten Nanobodies MU1067 und des konventionellen Antikörpers A10 wurden die intravitalen Bildgebungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein experimentelles Setup erstellt, welches auf den Erkenntnissen der Vorversuche basiert und in **Abbildung 3.8** schematisch skizziert ist.



Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der in vivo Imaging Experimente.

Der Zeitstrahl im oberen Teil skizziert den Ablauf der Experimente. An Tag 0 werden die Lymphomzellen subkutan injiziert (blaue Spritze). Die Mäuse werden alle zwei Tage untersucht und mit alfalfa-freiem Futter versorgt. Nach ca. 8 Tagen erfolgt die intravenöse Gabe von fluorophormarkierten Nanobodies oder konventionellen Antikörpern (rote Spritze). Anschließend werden im Zeitraum von 48 Stunden zu den angegebenen Zeitpunkten Aufnahmen mit dem IVIS gemacht. Nach der letzten Aufnahme erfolgt die Tötung der Mäuse, die Entnahme der Organe und Tumoren, sowie die weiteren IVIS und FACS Messungen ex vivo. Im unteren Teil ist rechts der technische Aufbau des IVIS 200 dargestellt, links als Ausschnittvergrößerung eine Maus während der Sedierung mit subkutanen Tumoren im Bereich des rechten und linken Vorderlaufs vor der intravenösen Injektion der Antikörper.

Die Aufnahmen der NIRF-IVIS-Messungen über den Zeitraum von 48 Stunden sind in den **Abbildungen 3.9** und **3.10** dargestellt. Ziel dieser Aufnahmen war es, die grundlegenden Unterschiede zwischen den beiden Antikörperformaten MU1067 und A10 für die intravitale Fluoreszenzbildgebung zu untersuchen. Dabei lag der besondere Fokus auf der Biodistribution, der Geschwindigkeit der spezifischen Anreicherung im CD38-positiven Tumor und der Ausscheidung der Antikörperformate. Mithilfe der speziell skalierten Aufnahmen und einer anschließenden Quantifizierung der Aufnahmen durch "regions of interest" (ROIs) sollte eine Aussage über den idealen Bildgebungszeitpunkt und die zu injizierende Antikörperdosis gemacht werden.



Abb. 3.9: Intravitale NIRF-Aufnahmen mit dem IVIS über 48 Stunden zeigen deutliche Unterschiede in der Biodistribution zwischen MU1067 und A10 auf. Den Mäusen 3975, 3977 und 3978 wurden nach der ersten Aufnahme (0 h) 50 μ g MU1067⁶⁸⁰ i.v. injiziert, den Mäusen 3979, 3980 und 3981 entsprechend 50 μ g A10⁶⁸⁰. Links ist die Farbintensitätsskala für alle Mäuse dargestellt, rechts die entsprechende Skala für die explantierten Organe (v. o. n. u. Muskel, CD38- Tumor (li), CD38+ Tumor (re), Milz, Lunge, Leber, Nieren, Magen, Dünndarm), jeweils in (p/sec/cm²/sr)/(μ W/cm²).

In **Abbildung 3.9** sind drei unterschiedliche Mäuse dargestellt, denen jeweils 50 µg Antikörperkonstrukt injiziert wurden. Alle Aufnahmen wurden mit der Livinglmage Software ausgewertet. Dabei wurde dieselbe Farbintensitätsskala für alle Mäuse verwendet, denen 50 µg entweder des Nanobodies oder des konventionellen Antikörpers injiziert worden waren, um eine direkte Vergleichbarkeit zu erreichen. Der untere Wert der Skalierung wurde so gewählt, dass bei der Leeraufnahme vor der Injektion fluoreszierender Proben keine Hintergrundsignale mehr sichtbar waren. Der obere Wert wurde so angepasst, dass die Unterschiede zwischen beiden Gruppen möglichst deutlich hervortreten. Eine Ausnahme stellen die Aufnahmen der explantierten Organe dar. Da nach 48 Stunden nur noch deutlich geringere Werte zu messen waren, wurde eine niedrigere Skalen-Einteilung gewählt, um die Unterschiede zwischen den Organen beziehungsweise den beiden Antikörperformaten zu verdeutlichen.

Nach der Injektion des Nanobodies MU1067⁶⁸⁰ zeigten sich bei allen drei Mäusen bereits nach einer Stunde hohe Fluoreszenzsignale. Die fluorophormarkierten Nanobodies zirkulierten im Blutkreislauf der Mäuse und sorgten für ein hohes Hintergrundsignal in fast allen Geweben. Dabei stachen jedoch einige Bereiche besonders hervor, vor allem die Nieren, die beiden Tumoren, bereits mit einer Betonung des CD38-positiven Tumors auf der rechten Seite, sowie injektionsbedingt die Schwänze der Tiere. Zwei Stunden nach Injektion zeigte sich bereits eine deutlich spezifischere Verteilung. Das allgemeine Hintergrundsignal war sichtbar zurückgegangen und es zeigte sich nun ein deutlicher Unterschied zwischen dem hell fluoreszierenden CD38-positiven Tumor rechtsseitig und dem Kontrolltumor auf der linken Seite, dessen Signalintensität erkennbar zurückging. Die Nierensignale stachen nach wie vor sehr stark heraus. Es fielen zudem Fluoreszenzsignale von den Fußsohlen der Tiere auf, welche durch die renale Ausscheidung des Nanobodies und den anschließenden Kontakt der Tiere mit dem eigenen Urin zu erklären sind. In den folgenden Stunden blieb dieses Bild bei insgesamt sinkenden Werten erhalten. Die Signale der Nieren, Füße und Schwänze nahmen nach und nach ab, wohingegen die hCD38-positiven Tumoren bis zum Zeitpunkt von zwölf Stunden nach Injektion nahezu konstante Signale aufwiesen. Einen bzw. zwei Tage nach der Injektion waren bis auf leichte Restsignale im CD38-positiven Tumor keinerlei Signale mehr zu erkennen. Nach der Explantation der Tumoren und Organe war jedoch, mit der entsprechenden Neueinstellung der Farbskala, nach wie vor eine spezifische Markierung der Nieren und des CD38-positiven Tumors eindeutig nachweisbar. Die Fluoreszenzwerte von Milz, Lunge, Leber, Magen, Dünndarm, Muskel und Kontrolltumor lagen unterhalb der gewählten Farbskala.

Wenn anstatt des Nanobodies MU1067680 der konventionelle Antikörper A10680 injiziert wurde, stellt sich ein anderes Bild dar. Direkt nach der Injektion ist zwar ebenfalls eine unspezifische Anreicherung in beiden Tumoren sowie an der Injektionsstelle zu beobachten. Das Niveau der Fluoreszenzintensität ist aber insgesamt niedriger, so wie es auch bereits in den vorbereitenden in vitro Versuchen zu beobachten war. Außerdem treten die Nieren nicht hervor, da die Antikörper die Blut-Harn-Schranke nicht passieren können. Entsprechend sind auch keine fluoreszierenden Urinreste an den Füßen der Mäuse zu finden. Die Verteilung der Antikörper im Körper der Mäuse konzentriert sich hauptsächlich auf die beiden artifiziell erzeugten subkutanen Tumoren. Eine spezifische Anreicherung im CD38-positiven Tumor, bei abnehmender Intensität des negativen Kontrolltumors, ist dabei erst nach vier bis zwölf Stunden erkennbar. Zwölf Stunden nach Injektion weist dieser in allen drei Mäusen eindeutig das stärkste Signal auf und behält dieses spezifische Signal bis zum Endpunkt der Studie nach 48 Stunden bei. Die explantierten Organe und Tumoren bestätigen dieses Bild mit deutlichen Fluoreszenzsignalen aus den CD38-positiven Tumoren und einem geringeren ausscheidungsbedingten Signal aus dem hepatobiliären System. Alle anderen Organe, sowie der Kontrolltumor und die Gewebeprobe aus dem Muskel erscheinen negativ.

Neben dem idealen Zeitpunkt für die diagnostische Bildgebung ist es auch notwendig, unterschiedliche Dosen der injizierten Proben zu testen, da diese das Verhältnis zwischen spezifischer Anreicherung und unspezifischen Hintergrundsignalen positiv oder negativ beeinflussen können. Besonders vor dem Hintergrund eventueller Nebenwirkungen ist es ebenfalls von hoher Bedeutung festzustellen, ob auch eine geringere Menge Nanobody bzw. Antikörper ausreichen, um einen Tumor spezifisch zu detektieren. Aus diesem Grund wurde die Versuchsreihe mit einer niedrigeren Dosis von 10 µg pro Maus wiederholt und die Aufnahmen nach dem gleichen Prinzip ausgewertet wie in **Abbildung 3.9**. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.10** dargestellt.



Abb. 3.10: Vergleichende intravitale NIRF-Aufnahmen nach Injektion von 10 μ g MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ zeigen mehrheitlich schwache und unspezifische Signale in vivo. Den Mäusen 4028, 4029 und 4031 wurden nach der ersten Aufnahme (0 h) 10 μ g MU1067⁶⁸⁰ i.v. injiziert, den Mäusen 3982, 3983 und 3984 entsprechend 10 μ g A10⁶⁸⁰. Links ist die Farbintensitätsskala für alle Mäuse dargestellt, rechts die entsprechende Skala für die explantierten Organe (v. o. n. u. Muskel, CD38- Tumor (li), CD38+ Tumor (re), Milz, Lunge, Leber, Nieren, Magen, Dünndarm), jeweils in (p/sec/cm²/sr)/(μ W/cm²).

Die niedrigere Dosis von 10 µg MU1067680 führt zunächst zu sehr ähnlichen Bildern wie nach der höheren Dosis von 50 µg, was durch die angepasste Farbintensitätsskala mit einem Minimum von 5x10⁷ und einem Maximum von 3x10⁸ bedingt ist. Auch in dieser Versuchsreihe färben die Nanobodies vor allem die Nieren und die Tumoren schnell an. Nach zwei bis sechs Stunden sind die Nierensignale größtenteils zurückgegangen und nur ein schwaches Signal aus dem CD38-positiven Tumor bleibt zurück. Durch die Ausscheidung über die Nieren leuchten auch bei zwei der drei Versuchstiere die Füße, nachdem sie mit dem ausgeschiedenen Urin in Kontakt gekommen sind. Das Signal des CD38-positiven Tumors bleibt bis zu 24 Stunden nach Injektion erkennbar, jedoch sind die Werte ebenso niedrig wie unspezifische Signale, welche aufgrund der niedrigen Skalierung der Farbintensitätsskala sichtbar werden. 48 Stunden nach der Injektion sind keinerlei Fluoreszenzsignale mehr zu sehen. Die Aufnahmen der explantierten Organe zeigen auch bei einer noch weiter abgesenkten Farbskala auf 3x10⁷ keine einheitlichen und aussagekräftigen spezifischen Signale in den CD38-positiven Tumoren oder den Nieren, so wie es bei den Experimenten mit 50 µg MU1067⁶⁸⁰ der Fall war.

Für die Gruppe der Mäuse, denen 10 µg A10 injiziert wurden, muss zunächst bemerkt werden, dass in der Maus mit der Nummer 3982 (**Abb. 3.10**, dritte Maus von unten) bei der Entnahme der Organe kein Kontrolltumor gefunden werden konnte. Die Aufnahmen dieser Maus sind daher nicht repräsentativ und die entsprechenden quantifizierten Werte des Kontrolltumors wurden nicht in die folgenden statistischen Berechnungen einbezogen. Die Aufnahmen ähneln denen der 50 µg A10 Gruppe. Die Signale sind allgemein wie erwartet schwächer und die Anreicherung beschränkt sich vor allem auf die beiden Tumoren und die Injektionsstelle. Dabei lässt sich zwischen einer und zwölf Stunden nach der Injektion kaum ein Unterschied bezüglich der Signalverteilung ausmachen. Erst 24 bis 48 Stunden später ist eine spezifische Anreicherung im CD38-positiven Tumor erkennbar, wobei die Werte kaum stärker als einige Artefakte erscheinen, die bereits vor der Injektion bestanden. Die ex vivo Aufnahmen der Organe beschreiben jedoch relativ deutlich die verbliebenen Antikörper in den Tumoren und der Gallenblase.

Die zur Visualisierung der schwachen Signale notwendige niedrige Skalierung führte bereits vor der Injektion fluorophorhaltiger Proben zu Artefakten. Dadurch waren nach der niedrigeren Dosierung von nur 10 µg spezifische Signale schwieriger als solche zu erkennen. Im Zeitrahmen bis 48 Stunden nach der Injektion konnte dabei für keines der beiden Antikörperkonstrukte ein geeigneter Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem durch NIRF-Aufnahmen eine für den CD38-positiven Tumor spezifische Bildgebung durchgeführt werden konnte. Vergleichend ist bei beiden Dosen die gegenläufige Dynamik der Fluoreszenzsignale im CD38-positiven Tumor auffällig. Nach der Injektion von MU1067⁶⁸⁰ treten an dieser Stelle schon früh starke Signale auf, die über die Zeit abfallen, während nach Injektion von A10⁶⁸⁰ eine langsame Steigerung des Signals über die Zeit zu beobachten ist.

3.4 Die Quantifizierung der intravitalen NIRF-Aufnahmen zeigt Vorteile von MU1067⁶⁸⁰ gegenüber A10⁶⁸⁰ zu frühen Zeitpunkten für die in vivo Bildgebung

Zur genaueren Beurteilung der NIRF-Aufnahmen wurden "regions of interest" (ROI) auf alle wichtigen Regionen gelegt und jeweils die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität in der markierten Region berechnet. Aus den Werten aller Mäuse einer Gruppe wurde jeweils wiederum der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden zunächst die Absolutwerte der Tumoren mit dem Hintergrundwert über die Zeit verglichen. Für eine direkte Vergleichbarkeit der beiden Dosen 50 µg und 10 µg wurde für alle Diagramme in Abbildung 3.11 die gleiche Skalierung gewählt. Das Ziel dieser Darstellung ist die Ermittlung der Maximalwerte von beiden Antikörperkonstrukten in den beiden Tumorregionen, sowie die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der spezifischen und unspezifischen Signale. Dabei liegt auch ein Fokus auf dem Hintergrundwert als Marker für die Ausscheidung von ungebundenen Antikörpermolekülen. Wie schon auf den NIRF-Aufnahmen zu erkennen war, liegen die Werte nach Injektion von 10 µg so niedrig, dass sie auch in dieser Darstellung nur sehr eingeschränkt beurteilbar sind. Der maximale MFI-Wert im CD38-positiven Tumor liegt für 10 µg MU1067⁶⁸⁰ nach einer Stunde bei 1,2x10⁸ und für 10 µg A10 nach 24 Stunden bei 1,7x10⁸. Es bestätigt sich damit das Bild, dass der Nanobody MU1067 nur direkt nach der Injektion zu einer kurzen Signalspitze in den Tumoren führt und schnell wieder abfällt, während sich der größere konventionelle Antikörper A10 langsamer anreichert und erst deutlich später den Maximalwert im CD38-positiven Tumor erreicht. Aufgrund der Nähe der Graphen zueinander ist keine konkrete Aussage über die Spezifität der Verteilung möglich. Diese Fragestellung wird aber mit der Berechnung der Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse in **Abbildung 3.12** wieder aufgegriffen.



Abb. 3.11: Die dargestellten quantifizierten Absolutwerte der ROIs verdeutlichen die unterschiedliche Dynamik der Anreicherung von MU1067⁶⁸⁰ und A10⁶⁸⁰ in den Tumoren.</sup> Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität, die aus den ROIs über den Tumoren (+/-) und dem rechten Hinterlauf (Hintergrund) berechnet wurden. Die vier Diagramme unterscheiden sich in der injizierten Dosis von 50 µg (obere Zeile) oder 10 µg (untere Zeile) und der injizierten Probe (MU1067⁶⁸⁰ = linke Spalte; A10 = rechte Spalte). Auf der x-Achse ist die Zeit nach der intravenösen Injektion in Stunden aufgezeichnet, die y-Achse bemisst die mittlere Fluoreszenzintensität der ROIs in (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²). Jedes Diagramm enthält einen Graphen für den CD38-positiven Tumor (schwarze Linie, Quadrate), den Kontrolltumor (schwarze Linie, Kreise) und den Hintergrund (gestrichelte Linie, Dreiecke).

Die Injektion von 50 µg führt zu deutlich aussagekräftigeren Werten. Es ist eine eindeutige Dynamik zu erkennen. Die fluorophormarkierten Nanobodies fluten innerhalb der ersten Stunde in den beiden Tumoren an und erreichen die maximalen Signalwerte, wobei der CD38-positive Tumor mit einem Wert von 1,1x10⁹ bereits zu

diesem Zeitpunkt ein stärkeres Signal aussendet als der Kontrolltumor mit 8,4x10⁸. Der Abstand zwischen den beiden Graphen nimmt in den folgenden Stunden noch zu, bedingt durch einen rasanten Signalabfall im Kontrolltumor, dessen Graph nahezu parallel zu dem der Hintergrundwerte verläuft. Dagegen fällt das Signal aus dem CD38-positiven Tumor erst nach zwölf Stunden deutlich ab.

Das unklare Bild nach Injektion von 50 µg A10⁶⁸⁰ bestätigt sich auch in dieser graphischen Darstellung. In den ersten Stunden zeigt sich eine unspezifische Signalerhöhung in beiden Tumoren ohne eine klare Tendenz in Richtung des CD38-positiven Tumors. Diese Tendenz kristallisiert sich erst im Verlauf heraus und ist nach zwölf Stunden eindeutig zu erkennen. Bis zu diesem Zeitpunkt steigt das mittlere Fluoreszenzsignal der CD38-positiven Tumoren kontinuierlich an und erreicht einen maximalen Wert von 7,4x10⁸. Im Gegensatz dazu erreicht das Signal aus dem Kontrolltumor den maximalen Wert von 5,7x10⁸ nach zwei Stunden, sinkt danach langsam ab und nähert sich dann den Hintergrundwerten an.

Die maximalen und minimalen Werte, sowie deren Entwicklung über die Zeit sind von ebenso entscheidender Bedeutung wie die Hintergrundsignale. Letztlich soll mit einer Messung so eindeutig wie möglich ein spezifisches Signal in einem potenziellen Tumor von unspezifischen Hintergrundsignalen unterschieden werden, um eine korrekte Diagnose stellen zu können. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, diese Parameter in ein Verhältnis zueinander zu setzen. Zu diesem Zweck wurde für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt ein Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis (T/H) gebildet. Das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis wurde aus der "Strahleneffizienz" (MFI) der Tumorbereiche und des Hintergrundwerts berechnet und als Funktion über die Zeit aufgetragen.

Beispiel: MFI [Tumor]: 5 MFI [Hintergrund]: 2 T/H: $\frac{5}{2} = 2,5$

Mithilfe dieser berechneten Werte lässt sich der ideale Zeitpunkt für eine Bildgebung bestimmen, definiert als maximales T/H-Verhältnis um hCD38-positive von negativen Tumoren oder körpereigenem gesundem Gewebe zu unterscheiden.

In **Abbildung 3.12** sind die vier Diagramme genau wie in **Abbildung 3.11** angeordnet. Sie unterscheiden sich lediglich in der y-Achse, welche nun das T/H-Verhältnis abbildet. Da die Hintergrundwerte nun bereits eingerechnet wurden, sind in jedem Diagramm nur noch zwei Graphen dargestellt. Sie sollen verdeutlichen, wie gut sich der CD38-positive Tumor im Vergleich zum Kontrolltumor vom Hintergrundsignal abhebt. Um diese Unterschiede so genau wie möglich einordnen zu können, wurde zusätzlich mithilfe statistischer Testverfahren berechnet, zu welchen Zeitpunkten die Unterschiede als signifikant zu bezeichnen sind. Als signifikant wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 festgelegt und mit einem Sternchen gekennzeichnet, höhere Signifikanzniveaus entsprechend mit zwei (p<0,01) oder drei Sternchen (p<0,001).



Abb. 3.12: Die Injektion von MU1067⁶⁸⁰ führt bereits deutlich früher zu einer spezifischen Differenzierbarkeit der Tumoren im Vergleich zu A10⁶⁸⁰.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der T/H-Verhältnisse mit Standardabweichungen, die aus den ROIs über den Tumoren (+/-) und dem rechten Hinterlauf (Hintergrund) berechnet wurden. Die vier Diagramme unterscheiden sich in der injizierten Dosis von 50 µg (obere Zeile) oder 10 µg (untere Zeile) und der injizierten Probe (MU1067⁶⁸⁰ = linke Spalte; A10 = rechte Spalte). Die Werte des CD38-positiven Tumors sind als Quadrate, die des Kontrolltumors als Kreise dargestellt. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der intravenösen Injektion in Stunden aufgezeichnet, auf der y-Achse ist das T/H-Verhältnis aufgetragen. Die Sternchen kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den T/H-Verhältnisse der Tumoren zum jeweiligen Zeitpunkt (*=p<0,05; ** =p<0,01; ***=p<0,001).

Die injizierte Dosis von 10 µg A10 führte nicht zu einer ausreichend spezifischen Anreicherung im CD38-positiven Tumor innerhalb von 48 Stunden. Bei relativ hohen T/H-Verhältnissen des Kontrolltumors von bis zu 4,5 im Durchschnitt nach zwölf Stunden, erreichen die etwas höheren CD38+ T/H-Verhältnisse von maximal 5,9 keinen signifikanten Unterschied zum Kontrolltumor. Eine Erhöhung der Einzeldosis auf 50 µg führt nach sechs Stunden zu einer kontinuierlichen Steigerung der Werte und sogar zu einer Verdreifachung des maximalen T/H-Verhältnisses nach 24 Stunden auf 18,9 und damit bei nahezu gleichbleibenden Kontrollwerten zu einem hohen signifikanten Unterschied. Dieser bleibt auch 48 Stunden nach Injektion noch bestehen. Die aussagekräftigsten Erkenntnisse für eine diagnostische Bildgebung nach intravenöser Injektion von A10⁶⁸⁰ können diesen Ergebnissen zufolge mit einer Injektionsdosis von 50 µg nach 24 Stunden erreicht werden. Bei MU1067⁶⁸⁰ bestehen schon nach Injektion von 10 µg signifikante Unterschiede zwischen den Graphen nach sechs, acht und zwölf Stunden mit einem maximalen mittleren T/H-Verhältnis von 7,1. Die Erhöhung der Dosis auf 50 µg erzeugt keine Steigerung der T/H-Verhältnisse im Bereich des Kontrolltumors. Dahingegen hebt sich bereits nach zwei Stunden der Graph des CD38-positiven Tumors deutlich ab und erreicht nach vier Stunden ein signifikant höheres mittleres T/H-Verhältnis als die Kontrollgruppe.

In den folgenden Stunden steigen die Werte weiter stark an, bis nach acht Stunden das höchste Signifikanzniveau erreicht wird und die Steigung abnimmt, jedoch bis 24 Stunden nach Injektion anhält und zu diesem Zeitpunkt ein maximales mittleres T/H-Verhältnis von 17,2 erzielt (Kontrolltumor bei 2,5). Anschließend fallen die Werte innerhalb von weiteren 24 Stunden wieder deutlich ab und erreichen nahezu das Niveau der Kontrollgruppe. Insgesamt sind besonders die früheren Zeitpunkte auffällig, zu denen eine spezifische Darstellung der CD38-positiven Tumore mittels injizierter Nanobodies möglich ist. Während A10⁶⁸⁰ erst nach 24 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen dem T/H-Verhältnis des CD38-positiven Tumors und des Kontrolltumors aufweist, ist dieser Zeitpunkt bereits vier bis sechs Stunden nach Injektion von MU1067⁶⁸⁰ erreicht und bleibt noch weitere 18 Stunden auf einem sehr hohen Niveau. Dadurch ist eine Bildgebung mit MU1067⁶⁸⁰ schon wenige Stunden nach der Injektion vorstellbar, kann aber durch das lange Zeitfenster auch erst nach 24 Stunden erfolgen.



Abb. 3.13: Das T/H-Verhältnis zeigt jeweils die größten signifikanten Unterschiede zwischen der injizierten Dosis 50 μ g und der Dosis 10 μ g MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ 24 Stunden nach der Injektion.

Die Balkendiagramme zeigen die Entwicklung der mittleren T/H-Verhältnisse der CD38positiven Tumoren über die Zeit, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Links werden die beiden Gruppen verglichen, denen MU1067⁶⁸⁰ injiziert wurde, rechts der entsprechende Vergleich für A10⁶⁸⁰. Das jeweils linke Balkendiagramm (weiß) steht für eine injizierte Dosis von 50 µg, das rechte Balkendiagramm (grau) für 10 µg. Auf der x-Achse sind die gemessenen Zeitpunkte in Stunden nach der Injektion aufgezeichnet, auf der y-Achse ist das T/H-Verhältnis aufgetragen. Die Sternchen zeigen das Signifikanzniveau des Unterschieds zwischen den beiden injizierten Dosen an (*=p<0,05; ** =p<0,01; ***=p<0,001).

Vergleichend führt sowohl bei MU1067⁶⁸⁰ als auch bei A10⁶⁸⁰ die höhere Dosis von 50 µg zu signifikanteren Unterschieden als bei der niedrigeren Dosis von 10 µg. Wie in **Abbildung 3.13** zu sehen ist, sind die Unterschiede in beiden Fällen nach 24 Stunden am größten, wobei das T/H-Verhältnis bei MU1067⁶⁸⁰ auch schon zu früheren Zeitpunkten mit 50 µg deutlich überlegen ist. Durch die große Standardabweichung lässt sich hier allerdings noch kein signifikanter Abstand zwischen den beiden Konzentrationen berechnen.

Zusammenfassend lassen sich durch die Ergebnisse der in vivo NIRF-Aufnahmen und die Auswertung der quantifizierten Fluoreszenzsignale folgende Aussagen treffen:

1. Das maximale Fluoreszenzsignal im CD38-positiven Tumor wird von 50 μg MU1067⁶⁸⁰ innerhalb der ersten Stunde nach Injektion erreicht und fällt anschließend langsam ab, während das Signal bei A10⁶⁸⁰ langsamer ansteigt und erst nach zwölf Stunden den Maximalwert erreicht.

2. Die Signale aus dem Kontrolltumor und Hintergrundbereich erreichen bei 50 μ g MU1067⁶⁸⁰ ebenfalls nach einer Stunde den Maximalwert, fallen danach aber sehr schnell auf ein niedriges Level ab, wohingegen das Signal des Kontrolltumors nach 50 μ g A10⁶⁸⁰-Injektion erst nach zwei Stunden abnimmt und deutlich langsamer sinkt.

3. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem T/H-Verhältnis im CD38-positiven YAC-Tumor im Vergleich zum Kontrolltumor wird von 50 μ g MU1067⁶⁸⁰ bereits nach 4 Stunden erreicht, von 50 μ g A10⁶⁸⁰ erst nach 24 Stunden. Das höchste Signifikanzniveau bezogen auf das T/H-Verhältnis wird von MU1067⁶⁸⁰ im Zeitraum von 8 bis 24 Stunden nach der Injektion von 50 μ g erreicht. Auch die Injektion von 50 μ g A10⁶⁸⁰ führt zum Erreichen dieses Signifikanzniveaus, allerdings erst nach einer Dauer von 24 bis 48 Stunden.

4. Die Verwendung der höheren Dosis 50 µg führt zu einer eindeutigen Steigerung der Signale in den CD38+ Tumoren bei beiden Antikörperformaten und damit zu einer deutlich stärkeren Steigerung der T/H-Verhältnisse, wodurch bei MU1067⁶⁸⁰deutlich stärkere und bei A10⁶⁸⁰ überhaupt erst signifikante Unterschiede entstehen.

3.5 Ergänzende ex vivo Analysen von YAC-Tumoren, Serum und Urin der zuvor im IVIS untersuchten Mäuse

Durch die intravitalen NIRF-Aufnahmen konnten bereits einige Erkenntnisse bezüglich der spezifischen Verteilung der beiden verglichenen Antikörper im Körper der Mäuse gewonnen werden. Daraus ließen sich Rückschlüsse auf die Anreicherung in den Geweben und die Ausscheidung aus dem Körper ziehen. So erreicht der Nanobody schneller hohe Signalwerte im CD38-positiven Tumor als der konventionelle Antikörper und führt zu schnell sinkenden Hintergrundwerten. Durch die Explantation der Tumoren und Organe, sowie die Entnahme von Blut und Urin sollten diese Beobachtungen untermauert werden. Zunächst sollte festgestellt werden, ob die Nanobodies tatsächlich schneller in das Tumorgewebe eindringen und dort spezifisch binden. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Signalabnahme über die Zeit durch das Abfallen und Ausscheiden der Antikörper inklusive der Fluorophore bedingt war, oder ob die Fluorophore von den Antikörpern abgespalten wurden, die ihrerseits weiterhin die Epitope an den Tumorzellen besetzten. Dafür wurden Tumoren vier Stunden und 48 Stunden nach der Injektion der Antikörper entnommen und in Einzelzellsuspension gebracht. Anschließend wurden diese Zellen im FACS untersucht und das AF680-Signal gemessen. Um zu testen, ob die CD38-Bindungsstellen auf der Oberfläche der transfizierten YAC-Zellen noch von intravenös injizierten Antikörpern oder Nanobodies besetzt waren, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit einer identischen Antikörperprobe nachgefärbt, um eine eventuelle Veränderung des Signals im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu überprüfen. Da vier Stunden nach Injektion von 50 µg MU1067680 der früheste signifikante Unterschied zwischen den T/H-Verhältnissen errechnet werden konnte, wurde dieser erste Zeitpunkt gewählt, um ihn mit dem späten Zeitpunkt nach 48 Stunden zu vergleichen.

In **Abbildung 3.14** sind die Ergebnisse der ex vivo FACS-Messungen dargestellt. Nach vier Stunden ist im Vergleich zu den untransfizierten CD38-negativen Tumorzellen eine gewisse Anreicherung des Nanobodies und des konventionellen Antikörpers erkennbar. Dabei weisen jedoch deutlich mehr Zellen eine Markierung durch A10⁶⁸⁰ auf als durch MU1067⁶⁸⁰. Diese Erkenntnis deckt sich nicht mit den Eindrücken aus den in vivo Aufnahmen, in denen besonders frühzeitig hohe AF680-Signale im CD38-positiven Tumor durch Nanobodies hervorgerufen worden waren. Nach 48 Stunden sind die Nanobodies nahezu komplett aus dem Tumorgewebe verschwunden und das Histogramm des CD38-positiven Tumors ist fast deckungsgleich mit dem der Kontrolltumorzellen. Auch das Signal der konventionellen Antikörper ist deutlich zurückgegangen, aber noch nicht auf das Niveau der Kontrollzellen abgesunken. In den Diagrammen nach 48 Stunden ist jeweils zusätzlich zu den explantierten unbehandelten Tumorzellen aus CD38-positivem und -negativem

Tumor noch eine weitere Population dargestellt. Dabei handelt es sich ebenfalls um explantierte CD38-positive Tumorzellen, die je nach Gruppe mit dem ursprünglich injizierten Antikörper ex vivo nachgefärbt wurden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die CD38-Epitope noch besetzt und die Signalabnahme durch die Abspaltung und die Ausscheidung der Fluorophore bedingt war oder ob die Antikörper komplett abgefallen waren und die Bindungsstellen freigegeben hatten. Die dunkelgrauen Histogramme zeigen in beiden Fällen eine deutliche Rechtsverschiebung auf der x-Achse, die mit einer deutlich verstärkten Bindung von AF680-markierten Antikörpern gleichzusetzen ist.



Abb. 3.14: Explantierte CD38-positive YAC-Lymphomzellen sind sowohl nach vier als auch nach 48 Stunden stärker durch A10⁶⁸⁰ markiert als durch MU1067⁶⁸⁰.

Einzelzellsuspensionen der explantierten Tumoren wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind jeweils die Zellen eines CD38-positiven Tumors 4 Stunden (obere Zeile) oder 48 Stunden (untere Zeile) nach Injektion von 50 µg MU1067⁶⁸⁰ (linke Spalte) oder A10⁶⁸⁰ (rechte Spalte). Auf der x-Achse ist die MFI von AF680 aufgetragen, auf der y-Achse die Zellzahl. Die hellgrauen Histogramme stellen die explantierten YAC-Zellen dar, die weißen Histogramme mit gestrichelter Linie die ungefärbten Zellen als Negativkontrolle. In den unteren beiden Diagrammen sind zusätzlich explantierte und mit MU1067⁶⁸⁰ oder A10⁶⁸⁰ nachgefärbte Zellen als dunkelgraue Histogramme gezeigt.

Der Großteil der Bindungsstellen ist demnach nach 48 Stunden wieder frei und kann durch ex vivo hinzugegebene Antikörper wiederbesetzt werden. Die Bindungsstärke von MU1067⁶⁸⁰ ist demnach schwächer als die von A10⁶⁸⁰. Ein weiterer Grund für die höheren Signale in der A10⁶⁸⁰-Gruppe nach 48 Stunden könnten im Blut zirkulierende A10-Antikörper sein, die nicht wie MU1067⁶⁸⁰ über die Niere ausgeschieden werden können. Für eine genauere Bestimmung der Zirkulationsdauer im Blutkreislauf und der Ausscheidung aus dem Körper wurde mehreren Mäusen nach vier und 48 Stunden Blut entnommen und der bis dahin ausgeschiedene Urin aufgefangen. Anschließend wurden CD38-positive YAC-Kulturzellen mit dem 1:10 mit PBS verdünnten Serum oder Urin inkubiert, um eine Bindung der enthaltenen MU1067⁶⁸⁰- oder A10⁶⁸⁰-Moleküle an die Zellen zu ermöglichen. Durch eine FACS-Messung der Zellen wurde auf die Konzentration der fluorophormarkierten Antikörper in Serum oder Urin geschlossen.

In Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse in Form von Histogrammen und Balkendiagrammen dargestellt. Nach vier Stunden verhalten sich die beiden Konstrukte gegensätzlich. Es fällt eine hohe Konzentration von A10⁶⁸⁰ im Serum sowie niedrige Konzentration im Urin nach vier Stunden auf, wohingegen MU1067680 aufgrund der Nierengängigkeit im Urin der ersten vier Stunden nach Injektion in großen Mengen nachweisbar ist und nur noch sehr geringe Serumkonzentrationen aufweist. Nach 48 Stunden liegen die Messwerte beider Konstrukte in Serum und Urin nur noch knapp über dem Hintergrundwert. Es bestätigt sich damit die Annahme, dass die Nanobodies deutlich schneller aus dem Körper ausgeschieden werden können als die größeren konventionellen Antikörper. Dadurch sind in der intravitalen Bildgebung die höheren Hintergrundwerte im gesamten Körper der Maus sowie die anhaltend hohen Werte in den stark durchbluteten Kontrolltumoren nach Injektion von A10⁶⁸⁰ zu erklären. Ebenso können wieder freiwerdende Bindungsstellen von zirkulierenden Antikörpern erneut besetzt werden. Durch die schnelle Eliminierung der ungebundenen Nanobodies aus dem Blutkreislauf ist eine erneute Bindung an CD38positive Tumorzellen nicht möglich.





Den Mäusen aus **Abb. 3.9** wurde vier (obere Zeile) und 48 Stunden (untere Zeile) nach intravenöser Antikörperinjektion Blut und Urin abgenommen. Mit dem 1:10 verdünnten Serum und Urin wurden CD38-positive YAC-Zellen inkubiert und im FACS gemessen. **a)** Histogramme zeigen die CD38-positiven Zellen, die mit verdünntem Serum (linke Spalte) oder Urin (rechte Spalte) von Mäusen inkubiert wurden, denen entweder MU1067⁶⁸⁰ (weiße Histogramme) oder A10⁶⁸⁰ (graue Histogramme) injiziert worden war. **b)** Balkendiagramme stellen vergleichend die mittleren MFI-Werte von CD38 der in a) gezeigten Histogramme dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die gestrichelte Linie zeigt den Hintergrundwert an, der an untransfizierten CD38-negativen YAC-Zellen bestimmt wurde.

3.6 Die ex vivo NIRF-Aufnahmen der explantierten Organe und Tumoren bestätigen die Ergebnisse der intravitalen Bildgebung

Neben der Quantifizierung der ROIs aus den Aufnahmen der intravitalen NIRF-Bildgebung und der Untersuchung von Serum und Urin gehört zur Untersuchung der Biodistribution auch die Auswertung der Fluoreszenzsignale in den weiteren Organen nach der Explantation nach 48 Stunden. Dafür wurden die in den **Abbildungen 3.9** und **3.10** jeweils am rechten Bildrand gezeigten Organaufnahmen (mit Ausnahme der Maus #3982 aufgrund des fehlenden Kontrolltumors) ebenfalls durch die Platzierung identischer ROIs hinsichtlich der mittleren Signalintensität ausgewertet. Dabei wurden wiederum die Absolutwerte verglichen sowie in diesem Fall ein Organ-zu-Hintergrund-Verhältnis (O/H-Verhältnis) berechnet. Als Referenzwert für den Hintergrund wurde ein explantiertes Stück Muskel verwendet. Die mittleren Absolutwerte sind in **Tabelle 3.2** und als Balkendiagramme in **Abbildung 3.16** dargestellt. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich die Mittelwerte zweier Mäuse dargestellt, denen als Negativkontrolle anstatt eines fluorophormarkierten Antikörpers nur PBS injiziert worden war.

	PBS	50 µg MU1067	50 µg A10	10 μg MU1067	10 µg A10
Muskel	0,4x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,4x10 ⁷	0,2x10 ⁷	0,2x10 ⁷
CD38- Tumor	0,9x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,9x10 ⁷	0,5x10 ⁷	0,6x10 ⁷
CD38+ Tumor	0,7x10 ⁷	15,7x10 ⁷	33,4x10 ⁷	1,5x10 ⁷	5,5x10 ⁷
Milz	1,2x10 ⁷	2,0x10 ⁷	2,5x10 ⁷	0,6x10 ⁷	1,1x10 ⁷
Lunge	0,7x10 ⁷	0,6x10 ⁷	1,0x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,5x10 ⁷
Leber	2,0x10 ⁷	2,7x10 ⁷	4,2x10 ⁷	1,6x10 ⁷	1,9x10 ⁷
Nieren	1,8x10 ⁷	11,9x10 ⁷	2,1x10 ⁷	2,5x10 ⁷	1,7x10 ⁷
Magen	0,6x10 ⁷	0,7x10 ⁷	1,4x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,2x10 ⁷
Darm	0,7x10 ⁷	0,6x10 ⁷	0,7x10 ⁷	0,2x10 ⁷	0,2x10 ⁷

Tabelle 3.2: Mittlere Absolutwerte der ROIs aus den NIRF-Aufnahmen der explantierten Organe 48 Stunden nach Antikörperinjektion.

Bei den mittleren Absolutwerten fallen besonders die bereits beschriebenen spezifisch erhöhten Werte in den CD38-positiven Tumoren auf, sowie das stärkere Signal aus den Nieren 48 Stunden nach MU1067⁶⁸⁰-Injektion. Bei 10 µg ist anzumerken, dass

A10⁶⁸⁰ bei den CD38-positiven Tumoren zu einer deutlich stärkeren Abhebung von der PBS-Kontrolle führt als MU1067⁶⁸⁰.



Abb. 3.16: Nach 48 Stunden sind die konjugierten Antikörper hauptsächlich in den CD38-positiven Tumoren, sowie MU1067 in den Nieren und A10 in der Leber zu finden. Die dargestellten Balkendiagramme zeigen die gemittelten absoluten MFI-Werte der 48 Stunden nach Injektion von 50 μ g (links) oder 10 μ g (rechts) MU1067⁶⁸⁰ (weiße Balken) oder A10⁶⁸⁰ (graue Balken) explantierten Organe und Tumoren. Als Kontrolle wurde stattdessen nur PBS injiziert (schwarze Balken). Auf der x-Achse sind die Organe bezeichnet, die y-Achse bemisst die mittleren Werte der gemessenen MFI der über den Organen platzierten ROIs und zeigt nur den Bereich von 10⁶-10⁹.

Darüber hinaus ist noch der Leberwert nach Injektion von 50 µg A10⁶⁸⁰ etwas erhöht, vermutlich bedingt durch die Ausscheidung über das hepatobiliäre System. Mit der Milz fällt zudem ein weiteres besonders gut durchblutetes Organ, genauso wie der Kontrolltumor, mit leicht erhöhten Werten auf. Trotz des Versuchs mittels PBS vor der Explantation der Organe das verbleibende Blut aus dem Kreislauf so gut wie möglich zu entfernen, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um Blutreste handelt, in denen noch fluorophormarkierte Antikörpermoleküle zurückgeblieben sind. Die restlichen Organe bewegen sich alle in einem engen Bereich und heben sich kaum von der PBS-Kontrolle ab. Etwas deutlicher werden die Unterschiede nach der Berechnung der O/H-Verhältnisse, welche in **Abbildung 3.17** dargestellt sind.

Dabei fallen zunächst besonders die extrem hohen CD38-positiven T/H-Werte nach Explantation auf, die für 50 µg A10⁶⁸⁰ bei 76,6 und für MU1067⁶⁸⁰ bei 56,0 liegen, sowie ein O/H-Verhältnis der Nieren für MU1067⁶⁸⁰ von 40,0. Bei einer injizierten Dosis von

10 µg hebt sich nur noch das T/H-Verhältnis des CD38-positiven Tumors bei A10⁶⁸⁰ und das O/H-Verhältnis der Nieren bei MU1067⁶⁸⁰ eindeutig von den Kontrollwerten und den anderen Organen ab. Die restlichen Organe wie Milz, Lunge, Leber, Magen und Darm heben sich kaum von den Kontrollwerten ab. Dies kann einerseits an einer ausgebliebenen Anreicherung in den Geweben liegen. Falls andererseits eine Anreicherung aufgetreten sein sollte, so war diese vermutlich durch verbleibendes Blut verursacht, wodurch sich die Werte kaum von den Hintergrundwerten unterscheiden. Aus den hier aufgetragenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass außer in den CD38-positiven Tumoren keine verstärkte Anreicherung in anderen Organgeweben stattfindet. Durch die renale Ausscheidung der konjugierten Nanobodies kommt es zu einem verstärkten absoluten Signal und O/H-Verhältnis in den Nieren. Bei A10⁶⁸⁰ führt die hepatobiliäre Exkretion nur zu moderat erhöhten absoluten Signalen in der Leber, das O/H-Verhältnis liegt nur unwesentlich über dem der PBS-Kontrolle.



Abb. 3.17: Auch nach 48 Stunden ist mit beiden Konstrukten in den CD38-positiven Tumoren ex vivo noch ein spezifisches NIRF-Signal im Vergleich zum Hintergrund zu berechnen.

Die dargestellten Balkendiagramme zeigen die gemittelten O/H-Verhältnisse der 48 Stunden nach Injektion von 50 μ g (links) oder 10 μ g (rechts) MU1067⁶⁸⁰ (weiße Balken) oder A10⁶⁸⁰ (graue Balken) explantierten Organe und Tumoren. Als Kontrolle wurde stattdessen nur PBS injiziert (schwarze Balken). Auf der x-Achse sind die Organe bezeichnet, die y-Achse bemisst die mittleren Werte der berechneten O/H-Verhältnisse. Die Skalierung wurde an die jeweiligen Maximalwerte angepasst und unterscheidet sich daher in den abgebildeten Diagrammen.

Prinzipiell bestätigen auch die Quantifizierungen der ex vivo NIRF-Aufnahmen die vorherigen Ergebnisse aus den intravitalen Messungen. Es fällt allerdings auf, dass die CD38-positiven Tumoren nach Explantation nach wie vor sehr hohe Fluoreszenzsignale in der NIRF-Bildgebung aufweisen, wobei dieselben Zellen in der anschließenden FACS-Analyse nur noch eine sehr schwache oder gar keine erhöhten Werte im Vergleich zum Kontrolltumor zeigen. Ein Erklärungsansatz wäre, dass die noch gebundenen Antikörpermoleküle durch die Präparation zur FACS-Messung von den Zellen abfallen und weggewaschen werden.

4. Diskussion

Die in jüngster Zeit erzielten Fortschritte bei der Entwicklung neuer Verfahren zur Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen basieren unter anderem auf der frühen und präzisen Erkennung von Tumorherden. Diese bildet auch die Grundlage für eine schnelle und möglichst kurative Therapie. Dafür ist die exakte Bestimmung der Tumorlokalisationen notwendig. Antikörper ermöglichen eine selektive Darstellung durch die Bindung an spezifische Oberflächenstrukturen der Zielzellen. Dabei ist der Kontrast zwischen malignem und körpereigenem Gewebe entscheidend. Durch die Entdeckung und Weiterentwicklung von Nanobodies konnten einige der Schwächen von konventionellen mAk, wie die lange Verweildauer im Blutkreislauf und die unspezifische Akkumulierung beispielsweise in der Leber reduziert werden (Huang et al. 2010, Vaneycken et al. 2011b). Es existieren jedoch bisher nur wenige Studien zum direkten Vergleich dieser beiden Formate für die nicht-invasive Fluoreszenzbildgebung in vivo (Bannas et al. 2012, Oliveira et al. 2012, Bannas et al. 2015).

Daher erschien die direkte vergleichende Untersuchung dieser beiden Formate besonders interessant, um ihre Eignung für die diagnostische Anwendung zu beurteilen. Diese Arbeit sollte daher am Beispiel von humanem CD38 einordnen, welche Unterschiede zwischen dem konventionellen Antikörper A10 und dem deutlich kleineren Nanobody MU1067 nach der intravenösen Injektion bestehen und wie sich diese auf die spezifische Fluoreszenzbildgebung von CD38-positiven Tumoren auswirken. Durch wiederholte Aufnahmen sollte anhand des maximalen Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisses der ideale Zeitpunkt für eine diagnostische NIRF-Bildgebung eines CD38-positiven Lymphoms ermittelt werden. Außerdem wurden zwei verschiedene Dosen (10 µg und 50 µg) verglichen, welche in vorigen Studien die besten Ergebnisse für diese Formate erzielten (Kijanka et al 2013, Bannas et al. 2015).

4.1 Murine YAC-Lymphomzellen können mit humanem CD38 transfiziert werden und als Allograft-Tumormodell eingesetzt werden.

Die Untersuchung der beiden Antikörperformate in vivo erforderte die Etablierung eines hCD38-Tumormodells. Idealerweise sollten dabei jeweils der Zieltumor und der Kontrolltumor im selben Tier wachsen, um einen direkten Vergleich ohne interindividuelle Einflussfaktoren zu ermöglichen. Da es nicht gelang, ein solches Modell mit zwei humanen Lymphomzelllinien zu etablieren, wurden murine YAC-Lymphomzellen mit der humanen Variante des Enzyms CD38 transfiziert. Die ektodermale Mutation der NMRI Nude-Foxn1/nu-Mäuse führt einerseits dazu, dass den Tieren keine Haare wachsen und andererseits, dass kein Thymus ausgebildet wird. Da bei diesem Stamm das Immunsystem nur mit einer kleinen Population reifer T-Zellen ausgestattet ist, werden reflektorisch natürliche Killerzellen (NK) verstärkt produziert, die maßgeblich an Abstoßungsreaktionen beteiligt sind. Diese NK waren mit großer Wahrscheinlichkeit für die schlechten Ergebnisse der in vivo Wachstumstests mit humanen Lymphomzellen verantwortlich. Um dieses Problem zu lösen, wurden murine Lymphomzelllinien verwendet, bei denen es deutlich seltener zu Abstoßungsreaktionen kommt. Die murinen Zellen wurden mit der humanen Variante des CD38 transfiziert und die untransfizierten Zellen als Negativkontrolle verwendet. Der Vorteil dieses Modells liegt neben fast identischen Wachstumseigenschaften darin, dass sich die beiden Zelllinien einzig durch das zusätzlich auf der Oberfläche exprimierte humane CD38 unterscheiden und damit ideal für die vergleichende Bildgebung von CD38-spezifischen Markern geeignet sind.

Bei früheren Studien, die ebenfalls die spezifische Bildgebung von Tumoren untersucht hatten, sorgte der *"enhanced permeability and retention effect"* (EPR) für eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der spezifischen Anreicherung (Matsumura und Maeda 1986, Stylianopoulos und Jain 2015). Dieser Effekt beschreibt die unspezifische Anreicherung von Substanzen in Tumorgewebe. Aufgrund der ungeordneten Neovaskularisation entstehen in Tumoren Kapillaren mit ungewöhnlich durchlässigem Endothel (erhöhte Permeabilität), sodass auch größere Moleküle wie beispielsweise Antikörper schneller in das Gewebe eintreten können. Durch das ebenfalls fehlerhaft angelegte Lymphsystem können diese jedoch nur sehr schlecht wieder abtransportiert werden (erhöhte Retention), was zu einer unspezifischen Anreicherung im Tumorgewebe führt. Durch die Implantation sowohl eines CD38positiven Zieltumors als auch eines CD38-negativen Kontrolltumors in jedem Versuchstier konnte in der hier vorgelegten Studie der Einfluss des EPR auf die Spezifität der Antikörperbindung durch die Gegenüberstellung der beiden Tumore vernachlässigt werden.

4.2 Vergleichende in vitro Analysen von MU1067 und A10

Die beiden zu vergleichenden Antikörperformate MU1067 und A10 banden in vitro spezifisch an humanes zellgebundenes CD38, wobei keine unspezifische Färbung CD38-negativer Tumorzellen auftrat. Diese spezifische Bindung konnte durch Fluoreszenzbildgebung mittels FACS, Mikroskopie und IVIS eindeutig belegt werden (Abb. 3.5, 3.6). Während die hier beschriebene CD38-Spezifität des mAk A10 zuvor bereits mehrfach berichtet worden war (Funaro et al. 1990, Malavasi et al. 1994, Sun et al. 1999), existierten entsprechende Studien zur Spezifität des neueren Nanobodies MU1067 noch nicht. Bei der jeweils gleichen eingesetzten Dosis zeigte MU1067⁶⁸⁰ stärkere Fluoreszenzsignale als A10⁶⁸⁰. Bei der Bewertung dieser Beobachtung muss bedacht werden, dass MU1067 nur ein Zehntel der relativen Molmasse wie A10 aufweist, also bei gleicher Dosis zehnmal mehr Nanobodies injiziert wurden. Andererseits binden bei der Kopplung aufgrund der geringeren Anzahl verfügbarer nukleophiler Lysin-Einheiten weniger Fluorophore an einem MU1067-Molekül (Ø 0,8) als an einem A10-Molekül (Ø 4,4). Zudem ist es möglich, dass einige der A10-Moleküle mit beiden antigenbindenden Domänen jeweils ein CD38-Molekül binden und damit zwei Bindungsstellen besetzen, während MU1067 jede Bindungsstelle mit einem einzelnen fluorophormarkierten Molekül besetzen kann. Denkbar ist außerdem, dass sich die großen mAk A10-Moleküle gegenseitig an der Bindung nah beieinanderliegender CD38-Moleküle hindern und dadurch Bindungsstellen unbesetzt bleiben. All diese Faktoren liefern gemeinsam eine Erklärung für das stärkere Fluoreszenzsignal des Nanobodies in vitro.

Der Stresstest hat gezeigt, dass mechanische und thermische Einflüsse die Fluoreszenzsignale abschwächen können. Dieser Signalverlust muss bei der Interpretation der Ergebnisse der in vivo Messungen beachtet werden.

4.3 Spezifische in vivo NIRF-Bildgebung von CD38-positiven Lymphomen

Die Annahme, dass Nanobodies aufgrund der niedrigeren Molekülmasse schneller ins Tumorgewebe eindringen, wurde durch die in vivo NIRF-Aufnahmen bestätigt (**Abb. 3.9, 3.11**). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die renale Elimination der überschüssigen Nanobodies sehr schnell zu einem Absinken der Konzentration im Blut führt (**Abb. 3.15**). Diese beiden Hauptfaktoren ergaben bereits in den ersten Stunden nach der intravenösen Injektion hohe T/H-Verhältnisse. Die Beobachtung aus den in vitro Versuchen, dass bei gleicher eingesetzter Menge ein deutlich stärkeres Signal von der Probe ausging, die den Nanobody MU1067 enthält (**Abb. 3.5, 3.6**) wurde durch die Ergebnisse der in vivo Experimente bestätigt. Obwohl an den mAk A10 etwa vier- bis fünfmal so viele Fluorophore gebunden waren, führte die in der einheitlich applizierten Dosis von 50 µg enthaltene zehnfach höhere Stoffmenge des Nanobodies bei diesem zu einer wesentlich höheren Konzentration fluoreszierender Gruppen. Dadurch ergab sich die scheinbar unspezifischere Verteilung der Nanobodies in den ersten Stunden, da das Hintergrundsignal von A10 unterhalb der Intensitätsskala lag und daher nicht dargestellt wurde.

Durch die schnelle renale Ausscheidung sank jedoch auch das MU1067-Hintergrundsignal innerhalb der ersten Stunden wieder unter die Grenze von 3x10⁸. Die weitere Verteilung der Proben konzentrierte sich auf die gut durchbluteten Tumoren, wobei MU1067 deutlich schneller wieder aus dem Kontrolltumor verschwand als A10.

Ein Grund für diese unspezifischere Anreicherung auch im Kontrolltumor des mAk A10 könnte der bereits zuvor erwähnte EPR-Effekt sein. Dieser Effekt betrifft den größeren Antikörper A10 stärker als den kleineren Nanobody. Durch die unspezifische Anreicherung verschiebt sich der Zeitpunkt, an dem eine eindeutige Differenzierung zwischen CD38-positivem Tumor und Kontrolltumor möglich ist, nach hinten.

Ein signifikanter Unterschied zwischen dem CD38-positiven Tumor und dem Kontrolltumor bestand bei MU1067 ab einem zeitlichen Abstand von 4 Stunden nach Injektion. Der größte Unterschied bestand 8 bis 24 Stunden nach Injektion. Damit könnte bei Verwendung des Nanobodies eine diagnostische Bildgebung bereits nach 4 Stunden erwogen werden, idealerweise sollte sie nach 8 Stunden durchgeführt werden. In jedem Fall wäre damit eine Untersuchung noch am Tag der intravenösen Injektion möglich. Dieser günstige Umstand ist vor allem durch das schnelle Absinken des Hintergrundwertes zu erklären. Aufgrund seiner niedrigeren molekularen Masse kann der Nanobody im Gegensatz zum Antikörper die renale Filtrationsbarriere passieren. Bereits nach vier Stunden ist der Nanobody deshalb im Urin, aber kaum noch im Serum der Mäuse nachweisbar. Diese Erkenntnisse bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Studien (Oliveira 2012, Kijanka 2013, Bannas 2015) und lassen den Nanobody MU1067 als geeignetes Werkzeug zur in vivo NIRF-Bildgebung von Tumoren erscheinen.

Zwei der bereits veröffentlichten Untersuchungen ergaben ebenfalls 50 µg als ideale Nanobody-Dosis pro Versuchstier und zeigten einen Unterschied zwischen Nanobody und Antikörper ab 4 Stunden nach Injektion. Dabei handelt es sich einerseit um den anti-HER2 Nanobody 11A4-IR (Kijanka 2013) und andererseits um den anti- ART2 Nanobody s+16a (Bannas 2015). In der hier vorgelegten Arbeit stellte sich auch für den konventionellen Antikörper A10 die Dosis von 50 µg pro Versuchstier als überlegen gegenüber 10 µg heraus. Diese Erkenntnis stimmt allerdings nicht mit den Versuchsergebnissen von Bannas et al. 2015 überein, welche ergaben, dass eine Dosisreduktion auf 10 µg A10 zu einer Steigerung des T/H-Verhältnisses führt. Dort führte die Dosissteigerung von 10 auf 50 µg A10 bei erhöhten Absolutwerten der Fluoreszenzintensität im Tumor zu einer noch stärkeren Erhöhung der Hintergrundwerte, wodurch das T/H-Verhältnis bei der höheren A10-Dosierung sank. Die langsamere Eliminierung überschüssiger A10-Antikörper aus dem Blutkreislauf führte in der hier vorgelegten Studie dazu, dass signifikante Unterschiede zwischen den T/H-Verhältnissen aus CD38-positivem Tumor und Kontrolltumor erst nach 24 Stunden gemessen werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt sind immer noch hohe Werte im CD38-positiven Tumor nachweisbar.

Aufgrund des hier verwendeten Versuchsaufbaus ist es grundsätzlich denkbar, dass auch mit A10 ein signifikanter Unterschied zwischen CD38-positivem Tumor und dem Kontrolltumor bereits nach 12 und 24 Stunden erreicht wird. Jedoch ist in jedem Fall der zeitliche Abstand zur Injektion bis zum Erreichen eines aussagekräftigen Wertes deutlich größer als bei Verwendung des Nanobodys MU1067, wodurch eine diagnostische Bildgebung am selben Tag nach Applikation von A10 in der klinischen Praxis schwer umsetzbar sein dürfte. Es lässt sich demnach feststellen, dass beide Antikörperformate das maximale T/H-Verhältnis 24 Stunden nach Injektion erreichen. Bei dem verwendeten Nanobody MU1067 führt die schnellere Eliminierung überschüssiger Moleküle aus dem Blut jedoch deutlich früher zu signifikanten Unterschieden des Fluoreszenzsignals zwischen hCD38-positivem und Kontrolltumor.

Die langfristige Persistenz der mAk im Tumor könnte einen Vorteil für therapeutische Ansätze darstellen. Für eine zeitnahe diagnostische Bildgebung nach der Injektion der Probe wäre der Nanobody besser geeignet.

4.4 Ex vivo Analysen

Ergänzend wurde einerseits durch die ex vivo Analyse von explantierten Tumorzellen per FACS und andererseits durch weitere NIRF-Aufnahmen der explantierten Organe ermittelt, ob die gewonnen Daten die Ergebnisse der in vivo NIRF-Aufnahmen unterstützen. Außerdem wurden dabei weitere Erkenntnisse über die Biodistribution der injizierten Antikörper im Körper der Versuchstiere gewonnen.

Bei Mäusen, die 4 Stunden nach Injektion getötet wurden, ergab die durchflusszytometrische Analyse explantierter Tumorzellen ein schwächeres CD38mittels AF680-markierter Nanobodies Oberflächensignal im Veraleich zu konventionellen Antikörpern. Dieses Resultat steht im Kontrast zu den in der hier vorgelegten Studie generierten in vivo NIRF-Aufnahmen und früheren Studien (Bannas et al. 2015). Die Ursache für diese Diskrepanz könnte in einem Bindungsverlust zwischen Nanobody und Antigen oder zwischen Nanobody und Fluorophor liegen. Es konnte jedoch durch die erneute Inkubation der explantierten Tumorzellen mit dem Nanobody ex vivo gezeigt werden, dass viele Bindungsstellen zum Zeitpunkt der Messung direkt nach der Explantation nicht besetzt waren. Diese Beobachtung spricht gegen eine Lösung der Bindung zwischen Nanobody und Fluorophor, da in diesem Fall die meisten anderen Bindungsstellen von unmarkierten Nanobody-Molekülen besetzt sein müssten. Eine unspezifische Anreicherung im Tumor ohne eine Bindung der Nanobodies an die CD38-positiven Tumorzellen kann als Ursache durch den direkten Vergleich mit dem Kontrolltumor ausgeschlossen werden.

Möglicherweise besteht im Vergleich zum konventionellen Antikörper eine geringere Bindungsstärke zwischen Nanobody und CD38. Hinweise dafür sind einerseits das verbleibende, wenn auch schwache, Signal in der FACS-Analyse aus explantierten CD38-positiven Tumorzellen 48 Stunden nach Injektion von A10 (**Abb. 3.14**). Weiterhin zeigen sowohl in vivo als auch ex vivo NIRF-Aufnahmen noch sehr starke spezifische Signale im CD38-positiven Tumor. Nichtsdestotrotz sind ex vivo auch 48 Stunden nach Injektion von 50 µg MU1067 noch starke spezifische Signale im CD38positiven Tumor und in den Nieren nachweisbar, obwohl bereits wenige Stunden nach Injektion das Signal besonders der Nieren rapide abgefallen war (**Abb. 3.9**).

Kijanka et al. haben die ex vivo NIRF-Aufnahmen zu den Zeitpunkten der maximalen T/H-Verhältnisse vorgenommen um die Organ-zu-Hintergrund-Verhältnisse (O/H-
Verhältnisse) zu berechnen (Kijanka et al. 2013). Stattdessen wurden in der hier vorgelegten Arbeit die Tiere aller Gruppen zum gleichen Zeitpunkt, d.h. 48 Stunden nach Injektion, getötet und NIRF-Aufnahmen der explantierten Organe angefertigt. Dadurch ist ein direkter optischer Vergleich der Ergebnisse mit beiden Konstrukten möglich. Deshalb wurden auch für alle in vivo NIRF-Aufnahmen der Versuchstiere, denen dieselben Dosen A10 oder MU1067 injiziert wurden, dieselben optischen Einstellungen und Farbskalen gewählt. Die Aufnahmen sollen dabei lediglich verdeutlichen, was die numerischen Messwerte belegen. Die idealisierte individuelle optische Darstellung der einzelnen Gruppen könnte den Eindruck entstehen lassen, dass eines der Konstrukte dem anderen überlegen ist. Tatsächlich beschränken sich die signifikanten Unterschiede bei genauerer Betrachtung der Messwerte jedoch nur auf einzelne Zeitpunkte.

Die genaue Betrachtung der mittleren Absolutwerte der explantierten Organe (Tab. 3.2, Abb. 3.16) bestätigt die Ergebnisse aus den in vivo NIRF-Aufnahmen. Die höchsten Absolutwerte ergeben sich aus den Messwerten der explantierten CD38positiven Tumoren, wobei A10 bei einer Dosis von 50 µg verglichen mit MU1067 doppelt so hohe Absolutwerte erzielt. Die Kontrolltumoren zeigen zwar leicht erhöhte Werte im Vergleich mit der PBS-Kontrolle, jedoch sind diese den jeweiligen Hintergrundwerten gegenüber nur unwesentlich erhöht. Dementsprechend ergeben sich T/H-Verhältnisse, die kaum über denen der PBS-Kontrolle liegen (Abb. 3.17). Zum Zeitpunkt der Explantation lag also keine unspezifische Anreicherung von MU1067 oder A10 in den Kontrolltumoren vor, was zu den Ergebnissen der ex vivo FACS-Analyse passt (Abb. 3.14). Die T/H-Verhältnisse der CD38-positiven Tumoren von A10 und MU1067 liegen sehr viel näher beieinander als die Absolutwerte. Der Grund dafür sind wiederum die Hintergrundwerte, die auch 48 Stunden nach Injektion von A10 höher sind als die von MU1067. Die T/H-Verhältnisse der CD38-positiven Tumoren beider Antikörperformate liegen deutlich höher als die aller explantierten Organe. MU1067-Moleküle reichern sich aufgrund der renalen Filtration besonders stark in den Nieren an und sind auch nach 48 Stunden noch dort zu finden, was durch das hohe O/H-Verhältnis der Nieren gezeigt wird. Das O/H-Verhältnis der Nieren nach Injektion von A10 entspricht der der PBS-Kontrollgruppe. Es findet demnach keine renale Filtration statt, wie bereits durch die FACS-Analyse mittels Urins gezeigt werden konnte (Abb. 3.15). Nanobodies und konventionelle Antikörper verursachen zudem leicht erhöhte Signale und O/H-Verhältnisse in Leber und Gallenblase, sodass davon auszugehen ist, dass zumindest eine partielle Sekretion über das hepatobiliäre System erfolgt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen aus bereits publizierten Studien überein (Kijanka et al. 2013, Bannas et al. 2015). Nach einer kurzen Phase der unspezifischen Anflutung auch im Kontrolltumor beschränkt sich die Biodistribution der Nanobodies auf den CD38-positiven Tumor und die Nieren. Die überschüssigen ungebundenen Moleküle werden rasch über die Nieren ausgeschieden. Die konventionellen Antikörpermoleküle zirkulieren deutlich länger im Blutkreislauf. Wie die Nanobodies reichern sie sich im CD38-positiven Tumor an. Die überschüssigen Moleküle verteilen sich, vermutlich aufgrund der Durchblutung, in ähnlichem Umfang auf die Nieren, den Kontrolltumor und die sonstigen Organe. Das O/H-Verhältnis der Leber ist bei dem konventionellen Antiköper A10 ebenso wie bei MU1067 leicht erhöht (**Abb. 3.17**).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die meisten Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtungen vorangegangener Studien bestätigen. Eine Ausnahme stellt die Erkenntnis zur idealen Dosierung des konventionellen Antikörpers dar, zu der in der Literatur unterschiedliche Befunde existieren (Oliveira et al. 2012, Kijanka et al. 2013, Bannas et al. 2015). Im Einklang mit bereits publizierten Untersuchungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Format des Antikörpers die Verteilung im Gewebe und die Ausscheidung aus dem Körper entscheidend beeinflusst. Daraus ergeben sich die Unterschiede der Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse und entsprechend der idealen Bildgebungszeitpunkte. Die hier berichteten Ergebnisse legen nahe, dass fluorophormarkierte Nanobodies eine spezifische Bildgebung bereits am Tag der Applikation ermöglichen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Nanobodies eine Dosiserhöhung zur Signalintensivierung möglich ist, ohne an Selektivität gegenüber dem umliegenden Gewebe zu verlieren.

4.5 Limitationen der Arbeit

Jede wissenschaftliche Studie weist Grenzen auf, die die Aussagekraft der erzielten Resultate einschränken und die bei deren Interpretation zu berücksichtigen sind. Diese Einschränkungen bei der Beurteilung der Ergebnisse sind zum einen auf das gewählte Versuchsdesign und zum anderen auf die verwendeten Methoden zurückführen.

4.5.1 Grenzen der Anwendbarkeit aufgrund des Versuchsdesigns

Zum Vergleich des Nanobodys MU1067 und des konventionellen Antikörpers A10 wurden zwei verschiedene Dosen ausgewählt, deren spezifische Verteilung im Körper der Versuchstiere in regelmäßigen Abständen nach der Injektion durch in vivo NIRF-Aufnahmen untersucht werden sollte. Diese Dosen und Zeitpunkte wurden aufgrund von Erkenntnissen aus zurückliegenden Studien ausgewählt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die höhere Dosis von 50 µg sowohl für MU1067 als auch für A10 zu besseren Ergebnissen führt. In früheren Studien (Bannas et al. 2015) wurden darüber hinaus andere Dosen eingesetzt. Eine Erweiterung der in dieser Arbeit verwendeten Dosen hätte möglicherweise eine weitere Erhöhung der T/H-Verhältnisse ergeben. Hierauf wurde aufgrund begrenzter Ressourcen jedoch verzichtet.

Die hier eingesetzten Dosen wurden standardmäßig für alle Tiere eingesetzt. Es fand keine gewichtsadaptierte Dosierung statt. Eine solche Adaptation könnte die Genauigkeit der Ergebnisse weiter erhöhen.

Die Genauigkeit der Ergebnisse hätte auch durch eine andere Injektionstechnik, bsw. durch die Verwendung von peripheren Venenkathetern zur Vermeidung von Paravasaten, erhöht werden können.

Die Erweiterung des Versuchsdesigns um weitere Messzeitpunkte hätte noch höhere T/H-Verhältnisse ergeben können. Interessant wäre insbesondere eine genauere Untersuchung des Zeitraumes um 24 Stunden nach Injektion, da hier die höchsten Werte ermittelt wurden.

Eine weitere Limitation besteht in dem gewählten Verfahren zur Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes an die Antikörper. Bei dem hier eingesetzten Verfahren erfolgt eine zufällige Bindung der Fluorophore an primäre Aminogruppen der Antikörper. Auf eine optimierte ortsspezifische Kopplung wurde verzichtet. Hierdurch ließe sich möglicherweise die Bindungsaffinität der markierten Antikörper erhöhen, wie von Kijanka et al. 2013 beschrieben.

Durch die deutlichen Größenunterschiede von Nanobodies und konventionellen Antikörpern kommt es zudem auch zu deutlichen Unterschieden der gebundenen Fluorophore pro Protein. Dadurch kommt es zu Differenzen der Fluoreszenzsignalstärke. Jedes injizierte konventionelle Antikörpermolekül hatte durchschnittlich 4,4 Fluorophore gebunden, jeder Nanobody nur 0,8. Es wäre denkbar, die injizierte Dosis an die gebundene Anzahl von Fluorophoren pro Antikörper anzupassen, um einen auf die Fluorophoranzahl bezogenen Vergleich zu erreichen. Die entsprechende Fragestellung erscheint jedoch weniger anwendungsrelevant für praktische diagnostische Verfahren. Ähnliche Betrachtungen könnten für die Anpassung der eingesetzten Dosierungen an die Stoffmengen der injizierten Moleküle oder der antigenbindenden Domänen angestellt werden.

Schließlich muss erwähnt werden, dass alle Untersuchungen an biologischen Systemen hohen statistischen Schwankungen unterliegen, was auch für alle Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit gilt. Durch eine Erhöhung der Zahl der Experimente kann die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind auch unter diesem Aspekt zu bewerten, wobei das Verhältnis von Erkenntnisgewinn und zusätzlichem zeitlichen und finanziellem Aufwand weitere Untersuchungen nicht zuließ.

4.5.2 Grenzen der Anwendbarkeit aufgrund der Methode

Die gute Nierengängigkeit der Nanobodies führt zu starken Signalen aus den Nieren, welche die spezifischen Signale in der Nähe befindlicher Tumoren überlagern können. Die Anreicherung der Nanobodies in den Nieren kann durch die zusätzliche Verabreichung von Reagenzien wie Lysin reduziert werden. (Gainkam et al. 2011). Dennoch ist auch unter diesen Bedingungen zumindest in den ersten Stunden nach der Injektion mit einer hohen Signalintensität aus den ableitenden Harnwegen zu rechnen, was die Diagnostik in diesem Zeitraum erschwert. Die Tumordiagnostik beschränkte sich in der vorgelegten Studie auf oberflächliche solide Tumoren. Für die Diagnostik hämatologischer Tumorerkrankungen, welche nicht durch einen Primarius auffallen, erscheint die hier untersuchte Methode nicht geeignet. Zwar zeichnen sich auch einige leukämische Formen durch eine Überproduktion von CD38 aus, jedoch wird dieses Oberflächenantigen auch von nicht entarteten Leukozyten exprimiert, was eine Differenzierung zwischen malignen und gesunden Zellen erschwert.

Hinzu kommt, dass die NIRF-Technik nur eine sehr begrenzte Eindringtiefe von 7-10 mm im Gewebe aufweist. Dadurch beschränkt sich der diagnostische Nutzen auf subkutane Tumoren. Für die Diagnostik tiefer liegender Tumoren ist die Technik nicht geeignet. In diesem Punkt ist die NIRF-Technik der Bildgebung mit isotopenmarkierten Antikörpern deutlich unterlegen, welche eine deutlich höhere räumliche Auflösung ohne nennenswerte Verluste durch tieferliegende Marker ermöglicht. Ein Vorteil der Technik besteht darin, dass eine anschließende ex vivo Validierung der markierten Tumorzellen per FACS-Analyse durchgeführt werden kann. Eine ergänzende Bildgebung mittels FACS oder Mikroskopie ist bei der Verwendung radioaktiver Isotope nicht möglich. Dafür ermöglicht deren Einsatz eine höhere räumliche Auflösung, wofür jedoch ein hoher Produktionsaufwand und hohe Sicherheitsmaßnahmen bei der experimentellen Verwendung der Radionuklide in Kauf genommen werden müssen.

Die verglichenen Antikörperformate MU1067 und A10 binden spezifisch an die humane Variante des CD38-Proteins. Dabei erkennen sie aber jeweils verschiedene Epitope des Antigens. Dies könnte sich unterschiedlich auf die Internalisierung der Antikörper in die Zielzellen oder auf die Aufnahme durch Phagozyten auswirken und so auch die jeweilige Halbwertszeit der Formate im Blut beeinflussen. Außerdem ist besonders die Fc-Region monomerer Antikörper anfällig für die unspezifische Bindung an andere Strukturen, vor allem über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), welcher unter anderem auf antigenpräsentierenden Leukozyten, wie dendritischen Zellen oder neutrophilen Granulozyten, vorkommt (Kuo et al. 2010, Olafsen und Wu, 2011).

Bei tierexperimentellen Studien stellt sich generell die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Zur Beantwortung dieser Frage müssen mehrere Punkte beachtet werden. Die Methode der NIRF-Bildgebung wäre generell auch für die Anwendung beim Menschen geeignet, jedoch ist der klinische Nutzen in der hier untersuchten Form besonders aufgrund der geringen Eindringtiefe des Fluoreszenzlichts sehr begrenzt. Konventionelle Antikörper sind bereits seit einiger Zeit im klinischen Einsatz angekommen. Nanobodies werden noch nicht routinemäßig verwendet. Die Firma Ablynx testet derzeit acht Nanobodies für die klinische Anwendung (www.ablynx.com; clinicaltrials.gov). Generell gelten Nanobodies als wenig immunogen, sie sind sehr stabil und dazu kostengünstig zu produzieren (Huang et al. 2007, Wesolowski et al. 2009, Gonzalez-Sapienza et al. 2017). Es ist zu erwarten, dass die hier beschriebenen Vorteile, wie beispielsweise die schnelle renale Exkretion überschüssiger Moleküle, auch bei der Anwendung am Menschen zutreffen. Die in dieser Studie verwendeten Nanobodies detektieren die humane CD38-Variante. Nanobodies könnten prinzipiell auch beim Menschen eingesetzt werden, um Tumorzellen zu erkennen, die CD38 überproduzieren und aus körpereigenen humanen Zellen hervorgegangen sind.

Eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen ist nicht möglich. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich Nanobodies aufgrund ihrer Eigenschaften als Sonden sehr gut für die diagnostische Bildgebung eignen.

4.6 Ausblick

Die Verwendung von Nanobodies birgt noch großes Potential für verschiedene Anwendungsbereiche der Medizin. Neben der in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Methode der diagnostischen Bildgebung zur frühzeitigen Erkennung von Tumoren werden bereits viele weitere Ansätze erforscht. Dazu gehört der intraoperative Einsatz von fluorophormarkierten Sonden (u.a. Nanobodies) zur Markierung der zu entfernenden malignen Tumorzellen (Kijanka et al. 2013). Dabei werden beispielsweise spezifische Nanobodies intravenös verabreicht und während der Operation Bilder mit einer fluoreszenzoptischen Kamera angefertigt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit dem Operationssitus ermöglicht eine präzisere Entfernung des Tumorgewebes, wodurch der Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe besser abgeschätzt werden kann. Kleine Herde oder Metastasen, die makroskopisch nicht von umliegendem Gewebe zu unterscheiden sind, können zusätzlich erkannt werden und sensible anatomische Strukturen geschont werden (Newton et al. 2016, Handgraaf et al. 2017).

Eine Alternative zur reinen Fluoreszenzbildgebung ist die "Multispektrale optoakustische Tomographie" (MSOT), welche zusätzlich Ultraschallwellen Dabei wird das bei der hier verwendeten verwendet. Versuchstier, wie Fluoreszenzbildgebung, nichtinvasiv aus einer externen Lichtquelle mit Fluoreszenzlicht bestrahlt. Die exponierten Gewebe oder Fluorophore werden durch die Laserenergie angeregt, dehnen sich bei der Absorption aus und senden daraufhin ein akustisches Signal in Form von Ultraschallwellen aus, welches von einem entsprechenden Detektor gemessen und im Anschluss in ein Computerbild umgerechnet wird. Dabei können mehrere verschiedene Proben oder Gewebetypen gleichzeitig gemessen werden, die sich durch unterschiedliche Absorptionsspektren unterscheiden und anschließend in einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden. (McNally et al. 2016). Einer der Vorteile gegenüber der Fluoreszenzbildgebung besteht darin, dass die Limitation der begrenzten Eindringtiefe durch den starken Signalverlust des Fluoreszenzlichtes im Gewebe nur für den Hinweg gilt. Zudem ist eine Echtzeitmessung während der Injektion der Sonden möglich, wodurch die genaue Verteilung und Anreicherung im Körper über die Zeit beobachtet werden kann.

Weitere Möglichkeiten der klinischen Anwendung von Nanobodies ergeben sich aus der Verbindung des diagnostischen mit einem therapeutischen Ansatz. Dabei werden unter anderem Nanobodies erforscht, welche durch die Blockade von VEGF-Rezeptoren die Ausbildung von Kapillaren in Tumoren, in denen diese überexprimiert werden, blockieren (Kijanka et al. 2015). Des Weiteren kann das Prinzip der Antikörper vermittelten Zytotoxizität genutzt werden, um spezifisch Tumorzellen abzutöten. Zu diesem Zweck werden bereits mAk wie Elotuzumab oder Daratumumab in der Therapie des Multiplen Myeloms verwendet (FDA News Release 2015, Sherbenou et al. 2017). Ergänzend zu diesen bestehenden Werkzeugen wird versucht, die antigenbindenden Domänen der Antikörper durch CD38-spezifische Nanobodies zu ersetzen, wobei die Fc-Domäne des humanen IgG1 erhalten bleibt. Diese Fusionsproteine sollen im Anschluss in vitro sowie in vivo hinsichtlich der Pharmakokinetik und Effektivität bei der Tumortherapie mit den konventionellen Antikörpern vergleichen werden, um weitere Alternativen zur Therapie des Multiplen Myeloms zu entwickeln. Erste Studien zeigen, dass die Nanobody-basierten Fusionsproteine in vivo sogar eine stärkere Tumorreduktion als Daratumumab bewirken (Fumey et al. 2017).

Diese Entwicklungen belegen das große Potential der klinischen Anwendungsmöglichkeiten von Nanobodies unter Verwendung der Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung sowie weiterer Methoden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, in der Zukunft mithilfe von Nanobodies die Diagnostik und Therapie von onkologischen Erkrankungen zu verbessern.

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurden vielfältige medizinische Anwendungsmöglichkeiten für Antikörper etabliert, u.a. für die Diagnostik von Tumorerkrankungen. Die lange Verweildauer monoklonaler Antikörper (mAk) im Blutkreislauf ist bei deren Anwendung zur spezifischen Tumorbildgebung ein Nachteil, da sie zu hohen Hintergrundwerten niedrigen Tumor-zu-Hintergrundverhältnis (T/H-Verhältnis) und einem führt. Nanobodies stellen die antigenbindende Domäne von Schwere-Ketten-Antikörpern dar und sind zehnmal kleiner als mAk. Sie werden renal filtriert, weshalb überschüssige, nicht an Zielzellen gebundene Moleküle schneller eliminiert werden. Für die bildgebende Diagnostik stellen Nanobodies deshalb eine interessante Alternative zu mAk dar. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des mAk A10 mit denen des Nanobodies MU1067 bei der in vivo Bildgebung von Lymphomen verglichen. Beide Antikörperformate binden spezifisch an das humane Oberflächenantigen CD38, welches von bestimmten Lymphomzellreihen überexprimiert wird. Der Nanobody und der mAk wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF680 markiert, um im Anschluss Nahinfrarot-Fluoreszenz- (NIRF-) Aufnahmen anzufertigen. Das Gen für humanes CD38 wurde in murine Lymphomzellen eingebracht, sodass diese humanes CD38 auf der Oberfläche exprimierten. Vor den in vivo Experimenten wurde die spezifische Bindung beider Antikörperformate in vitro per Durchflusszytometrie (FACS) und im In Vivo Imaging System (IVIS) nachgewiesen. In vivo NIRF-Aufnahmen im IVIS an tumortragenden Mäusen zeigten, dass MU1067-Nanobodies schneller im Tumorgewebe akkumulieren als die größeren konventionellen A10-Antikörper. Während mit dem MU1067-Nanobody signifikante Signalintensitätsunterschiede zwischen Ziel- und Kontrolltumor bereits 4 Stunden nach Injektion gefunden wurden, wurde erst 24 Stunden nach Injektion von A10 ein signifikanter Kontrast erreicht. Dabei führte eine höhere Dosis MU1067 von 50 µg gegenüber 10 µg zu einer Steigerung der Absolutwerte im Zieltumor, während die Hintergrundwerte in geringerem Maße stiegen, was in höheren T/H-Verhältnissen resultierte. Dieser Effekt fiel in der A10-Gruppe deutlich geringer aus. Die schnelle Eliminierung von MU1067 einerseits und die längere Verweildauer von A10 im Blutkreislauf andererseits konnte durch Serum- und Urinanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion gezeigt werden. Ex vivo Analysen bestätigten die Resultate aus den in vivo Aufnahmen. Die Ergebnisse legen nahe, dass mit beiden Antikörperformaten eine in vivo Bildgebung möglich ist, jedoch nur die Applikation von MU1067 aussagekräftige Aufnahmen am Tag der Injektion zulässt. Sie könnten dazu beitragen, die spezifische diagnostische Bildgebung onkologischer Erkrankungen in der Zukunft zu verbessern.

Abstract

Over the last decades numerous medical applications using antibodies have been established, amongst others diagnostic tools for the detection of tumors. Monoclonal antibodies (mAb) typically have a long retention time in the bloodstream leading to high background levels and resulting in low tumor-to-background ratios (TBR) when used for tumor imaging. In contrast, nanobodies consist of only the antigen binding domain of a heavy-chain-only antibody and are ten times smaller than mAb. Therefore, excessive non-bound molecules can be renally excreted rapidly. For this reason, nanobodies can be a promising alternative to mAb for diagnostic imaging.

The aim of this study was to compare the characteristics of mAb A10 and nanobody MU1067 for in vivo imaging of lymphomas, both of which specifically bind to human CD38. CD38 is a surface antigen that is overexpressed by particular lymphoma strains. The nanobody and the mAb were loaded with the fluorescence dye AF680 to perform near-infrared fluorescence (NIRF) imaging. The genetic code for human CD38 was transferred to murine lymphoma cells causing expression of human CD38 on their cell surface. Prior to in vivo experiments, the specific binding of both antibodies was shown in vitro using flow cytometry (FACS) analysis and an in vivo imaging system (IVIS). In vivo NIRF images of tumor-bearing mice showed a faster accumulation of MU1067 nanobodies in the tumor than the bigger conventional mAb A10.

Regarding the signal intensity between target tumor and control tumor, the nanobody MU1067 showed significant divergence already 4 hours after the injection. In contrast, when using mAb A10, it took 24 hours until a significant level of contrast was reached. The same experiments revealed that the use of a higher MU1067 dose of 50 µg compared to 10 µg leads to higher absolute signal values in the target tumor while the background levels rise to a lesser extent, resulting in higher TBRs. This effect was less significant when A10 was used. The faster clearance of MU1067 as well as the longer retention time in the blood stream of A10 were verified by analysis of blood and urine samples of the tumor-bearing mice taken at various points of time after the injection. The in vivo findings were confirmed by ex vivo analyses. These results suggest a suitability of both antibodies for in vivo imaging in general. However, of the two entities, only the nanobody MU1067 allows reliable same-day in vivo imaging. Thus, these nanobodies could contribute to the improvement of future specific diagnostic imaging techniques in oncology.

Literaturverzeichnis

Zeitschriften

- Bannas P, Lenz A, Kunick V, Well L, Fumey W, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Schütze K, Eichhoff A, Trepel M, Adam G, Ittrich H and Koch-Nolte F (2015) Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. Contrast Media Mol Imaging, 10:367–378.
- Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Hochgräfe K, Trepel M, Adam G, Ittrich H, Koch-Nolte F (2014) In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. Contrast Media Mol Imaging 9:135–142.
- Berthelier V, Tixier J-M, Muller-Steffner H, Schuber F, Deterre P (1998) Human CD38 is an authentic NAD(P)+ glycohydrolase. Biochem J 330:1383– 1390.
- 4. Blow N (2009) In vivo molecular imaging: the inside job. Nat Methods 6:465-469.
- 5. Bruce VJ, Ta AN, McNaughton BR (2016) Minimalist Antibodies and Mimetics: An Update and Recent Applications. ChemBioChem 17:1892–1899.
- 6. Chakravarty R, Goel S, Cai W (2014) Nanobody: The "Magic Bullet" for Molecular Imaging? Theranostics 4(4):386-398.
- Chillemi A, Zaccarello G, Quarona V, Ferracin M, Ghimenti C, Massaia M, Horenstein AL, Malavasi F (2013) Anti-CD38 Antibody Therapy: Windows of Opportunity Yielded by the Functional Characteristics of the Target Molecule. Mol Med 19:99-108.
- 8. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh GG, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, de Baetselier P, Revets H (2002) Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. Int J Cancer 98:456–62.
- Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, Revets H (2004) Efficient cancer therapy with a nanobodybased conjugate. Cancer Res 64:2853–2857.
- 10. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop J-H, Hammel A, Bergmann P, Schwarz N, Assunção J, Rotthier W, Haag F, Tolosa E, Bannas P, Boué-Grabot E, MagnusT, Laeremans T, Stortelers C, Koch-Nolte F (2016) Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. Sci Transl Med 8:366ra162.

- 11. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst HM, van de Winkel JG, Parren PW (2011) Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. J Immunol 186:1840–1848.
- 12. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallée F, Zhou-Liu Q, Ferrari P, Pouzieux S, Lahoute C, Dumontet C, Plesa A, Chiron M, Lejeune P, Chittenden T, Park PU, Blanc V (2014) SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. Clin Cancer Res 20:4574–4583.
- 13. Diehl V, M. Schaadl, M. Pfreundschuh (1986) Klinische Relevanz der Immunphänotypisierung maligner Lymphome. Onkologie 9:114-117.
- 14. Foss, H-D, Coupland SE, Stein H (2000) Klinisch-pathologische Formen peripherer T- und NK-Zell-Lymphome. Pathologe 21:137–146.
- 15. Frangioni JV (2008) New technologies for human cancer imaging. J Clin Oncol 26(24):4012–4021.
- 16. Fumey W, Koenigsdorf J, Kunick V, Menzel S, Schütze K, Unger M, Schriewer L, Haag F, Adam G, Oberle A, Binder M, Fliegert R, Guse A, Zhao YJ, Cheung Lee H, Malavasi F, Goldbaum F, van Hegelsom R, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F (2017) Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. Sci Rep 7:14289.
- 17. Gainkam LO, Caveliers V, Devoogdt N, Vanhove C, Xavier C, Boerman O, Muyldermans S, Bossuyt A, Lahoutte T (2011) Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. Contrast Media Mol Imaging 6(2):85–92.
- 18.Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S (2017) Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. Front Immunol 8:977.
- 19. Grenier N, Brader P (2011) Principles and basic concepts of molecular imaging. Pediatr Radiol 41:144–160.
- 20. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, Nature 363:446–448.

- 21. Handgraaf HJM, Boonstra MC, Prevoo HAJM, Kuil J, Bordo MW, Boogerd LSF, Sibinga Mulder BG, Sier CFM, Vinkenburg-van Slooten ML, Valentijn ARPM, Burggraaf J, van de Velde CJH, Frangioni JV, Vahrmeijer AL (2017) Real-time near-infrared fluorescence imaging using cRGD- ZW800-1 for intraoperative visualization of multiple cancer types. Oncotarget 8(13):21054-21066.
- Harmsen MM, de Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 77:13– 22.
- 23. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S (2013) Nanobodies and their potential applications. Nanomedicine 8(6):1013–1026.
- 24. Hersher R (2012) Companies wager high on CD38-targeting drugs for blood cancer. Nat Med 18:1446.
- 25. Hoffman JM, Gambhir SS (2007) Molecular Imaging: The Vision and Opportunity for Radiology in the Future. Radiology 244:39–47.
- 26. Huang L, Muyldermans S (2010) Saerens D. Nanobodies®: proficient tools in diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 10(6):777–785.
- 27. Jackson SE, Chester JD (2015) Personalised cancer medicine. Int J Cancer 137:262–266.
- 28. Kaur S, Venktaraman G, Jain M, Senapati S, Garg PK, Batra SK (2012) Recent trends in antibody-based oncologic imaging. Cancer Lett 315(2):97– 111.
- 29. Kijanka M, Warnders FJ, El Khattabi M, Lub-de Hooge M, van Dam GM, Ntziachristos V, de Vries L, Oliveira S,van Bergen en Henegouwen PMP (2013) Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. Eur J Nucl Med Mol Imaging 40:1718–29.
- 30. Kijanka M, Bram Dorresteijn, Sabrina Oliveira, Paul MP van Bergen en Henegouwen (2015) Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. Nanomedicine 10(1):161–174.
- Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao S-W, Aveson VG, Lencer WI, Blumberg RS (2010) Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics. J Clin Immunol 30:777–789.

- 32. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K (1994) Human CD38: a glycoprotein in search of a function. Immunol Today 15:95– 97.
- 33. Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. Cancer Res 46:6387–92.
- 34. McNally LR, Mezera M, Morgan DE, Frederick PJ, Yang ES, Eltoum I-E, Grizzle WE (2016) Current and Emerging Clinical Applications of Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) in Oncology. Clin Cancer Res 22(14):3432–3439.
- 35. Monnet C, Jorieux S, Souyris N, Zaki O, Jacquet A, Fournier N, Crozet F, de Romeuf C, Bouayadi K, Urbain R, Behrens CK, Mondon P, Fontayne A (2014) Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody. mAbs 6:2, 422–436.
- 36. Muyldermans S (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. Annu Rev Biochem 82:775–97.
- 37. Newton AD, Kennedy GT, Predina JD, Low PS, Singhal S (2016) Intraoperative molecular imaging to identify lung adenocarcinomas, J Thorac Dis 8(Suppl 9):S697-S704.
- 38.Olafsen T, Wu AM (2010) Novel Antibody Vectors for Imaging. Semin Nucl Med 40(3):167–181.
- 39. Oliveira S, Van Dongen GAMS, Stigter-Van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, Van Diest PJ, Van Bergen En Henegouwen PMP (2012) Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. Mol Imaging 11(1):33-46.
- 40. Oliveira S, Heukers R, Sornkom J, Kok RJ, van Bergen En Henegouwen PMP (2013) Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. J Controlled Release 172(3):607–617.
- 41. Reichert JM (2017) Antibodies to watch in 2017. mAbs 9(2):167–181.
- 42. Sherbenou DW, Mark TM, Forsberg P (2017) Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma: A New Wave of the Future. Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk 17(9):545-54.
- 43. Stylianopoulos T, Jain RK (2015) Design considerations for nanotherapeutics in oncology. Nanomedicine 11(8):1893–1907.

- 44. Sun L, Adebanjo OA, Moonga BS, Corisdeo S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Arakawa T, Hakeda Y, Koval A, Sodam B, Bevis PJ, Moser AJ, Lai FA, Epstein S, Troen BR, Kumegawa M, Zaidi M (1999) CD38/ADP-Ribosyl Cyclase: A New Role in the Regulation of Osteoclastic Bone Resorption. J Cell Biol 146(5):1161–1171.
- 45. Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V (2011a) Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J 25(7):2433–2446.
- 46. Vaneycken I, D'huyvetter M, Hernot S, De Vos J, Xavier C, Devoogdt N, Caveliers V, Lahoutte T (2011b) Immuno-imaging using nanobodies. Curr Opin Biotechnol 22:877–881.
- 47. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol 198:157–174.
- 48. Weissleder R, Mahmood U (2001) Molecular imaging. Radiology 219:316– 333.
- 49. Weissleder R (2006) Molecular Imaging in Cancer. Science 312:1168-1171.
- 50. Weissleder R, Pittet MJ (2008) Imaging in the era of molecular oncology. Nature 452(7187):580–589.
- 51. Wu AM, Olafsen T (2008) Antibodies for molecular imaging of cancer. Cancer J 14(3):191–197.

Hochschulschriften

Unger M (2012) Klonierung und molekulare Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern gegen das membranständige Ekto-Enzym CD38 aus Homo sapiens und gegen Toxine aus C. difficile. Biol. Dissertation, Universität Hamburg.

Internetquellen

FDA approves Darzalex for patients with previously treated multiple myeloma. FDA News Release, November 16, 2015.

URL:

https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm472875.htm (Stand 01.10.2017).

URL: http://www.ablynx.com/rd-portfolio/clinical-programmes/ (Stand 14.09.2017)

URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ablynx (Stand 14.09.2017)

URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1648.aspx?geo_country=de (Stand 27.10.2018)

URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-155.aspx (Stand 27.10.2018)

URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-196.aspx (Stand 27.10.2018)

URL: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_C539 (Stand 27.10.2018)

URL: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_A422 (Stand 27.10.2018)

URL: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_2244 (Stand 27.10.2018)

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Liste der Vorveröffentlichungen aus dieser Arbeit

Fumey W, Koenigsdorf J, Kunick V, Menzel S, Schütze K, Unger M, Schriewer L, Haag F, Adam G, Oberle A, Binder M, Fliegert R, Guse A, Zhao YJ, Cheung Lee H, Malavasi F, Goldbaum F, van Hegelsom R, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F (2017) Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. Sci Rep 7:14289.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Gerhard Adam, meinem Doktorvater, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die konstruktive Begleitung meiner Arbeit mit Anregungen, Ideen und Kritik, sowie die Anleitung zum eigenständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Außerdem danke ich ihm für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für meine Experimente im Institut für Immunologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Peter Bannas, der mir den Zugang zu diesem Thema ermöglicht hat und mich über die gesamte Zeit dieser Arbeit intensiv unterstützt hat. Ohne unseren freundschaftlichen Austausch und seine unzähligen Ratschläge wäre der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dem Graduiertenkolleg "Entzündung und Regeneration" unter Leitung von Frau Prof. Dr. Gisa Tiegs danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Dr. Lennart Well danke ich für die thematische und methodische Einführung zu Beginn meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Alexander Lenz für den regen freundschaftlichen Austausch und die unermüdliche Unterstützung bei meinen Experimenten. Unsere gemeinsame Arbeit und die Reisen zu Kongressen haben mir viel Spaß gemacht und ich bin froh, dass sich daraus eine echte Freundschaft entwickelt hat.

Ganz herzlich bedanken für die Unterstützung bei den Experimenten und den hilfreichen Austausch möchte ich mich bei Herrn Dr. Welbeck Danquah, Frau Dr. Mandy Unger, Herrn Dr. Stephan Menzel, Herrn Dr. Björn Rissiek, Frau Dr. Nicole Schwarz, sowie bei William Fumey und Julia Königsdorf.

Mein Dank für die tatkräftige Unterstützung im Labor gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Marion Nissen, Fabienne Seyfried, Gudrun Dubberke und insbesondere Joanna Schmid für ihren großen Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft.

Thula Koops, Fabian Kunick und insbesondere meinem Vater Conrad Kunick danke ich für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Elke und Conrad Kunick, die mich immer unterstützt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

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: