

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und
Nuklearmedizin

Prof. Dr. med. Gerhard Adam

Therapeutisches Potential von CD38-spezifischen Schwere-Ketten- Antikörpern und Nanobody-Dimeren beim Multiplen Myelom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Niklas Schuster
aus Münster

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
27.05.2021**

**Datum der Disputation:
01.11.2021**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Walter Fiedler**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. Nicolaus Kröger**

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. CD38 | 6 |
| 1.1.1. Aufbau und Funktion | 6 |
| 1.1.2. Die Rolle von CD38 in malignen Erkrankungen | 9 |
| 1.2. Antikörpertherapie | 12 |
| 1.2.1. Entwicklung der Antikörpertherapie | 12 |
| 1.2.2. Effektorfunktionen eines Antikörpers | 13 |
| 1.2.3. CD38-spezifische Antikörpertherapie | 17 |
| 1.3. Schwere-Ketten-Antikörper | 19 |
| 1.4. Ziele der Arbeit | 23 |
| 2. Materialien | 24 |
| 2.1. Laborgeräte | 24 |
| 2.2. Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.3. Reagenzsysteme (Kits) | 26 |
| 2.4. Chemikalien | 26 |
| 2.5. Medien | 28 |
| 2.6. Puffer | 28 |
| 2.7. Antikörper | 29 |
| 2.8. Enzyme | 30 |
| 2.9. Zelllinien | 30 |
| 2.10. Mauslinien | 30 |
| 2.11. DNA- und Protein-Standards | 31 |
| 2.12. Plasmide | 31 |
| 2.13. Oligonukleotide | 31 |
| 3. Methoden | 32 |
| 3.1. Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 3.1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 32 |
| 3.1.2. Restriktionsverdau von DNA | 33 |
| 3.1.3. Dephosphorylierung von Vektoren | 33 |
| 3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung | 34 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1.5. | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 34 |
| 3.1.6. | DNA-Sequenzierung | 34 |
| 3.2. | Proteinbiochemische Methoden..... | 35 |
| 3.2.1. | Produktion von Nanobody-Dimeren | 35 |
| 3.2.2. | Aufreinigung von Nanobody-Dimeren | 36 |
| 3.2.3. | SDS-PAGE..... | 36 |
| 3.2.4. | Coomassie-Färbung..... | 37 |
| 3.3. | Zellbiologische Methoden | 38 |
| 3.3.1. | Zellkultur..... | 38 |
| 3.3.2. | Zellzahlen..... | 38 |
| 3.3.3. | Transformation von E. coli..... | 38 |
| 3.3.4. | Kultivierung der Bakterien und DNA-Aufreinigung | 39 |
| 3.3.5. | Transfektion von HEK293-6E-Zellen..... | 39 |
| 3.4. | Immunologische Methoden | 40 |
| 3.4.1. | Durchflusszytometrie (FACS)..... | 40 |
| 3.4.2. | Affinitäts-Assays..... | 41 |
| 3.4.3. | Nachweis von Antikörpern im Serum | 41 |
| 3.4.4. | CDC-Assays..... | 42 |
| 3.4.5. | ADCC-Assays | 43 |
| 3.5. | Tierversuche..... | 44 |
| 3.5.1. | Tumor-Xenograft-Modell | 44 |
| 3.5.2. | IVIS-Biolumineszenzmessungen | 45 |
| 3.5.3. | Ex-vivo-Organanalysen | 45 |
| 4. | Ergebnisse | 47 |
| 4.1. | Effektivität von CD38-spezifischen hcAbs in vitro und in vivo | 47 |
| 4.1.1. | CD38-spezifische Antikörper induzieren ADCC | 48 |
| 4.1.2. | Kombinationen CD38-spezifischer Antikörper und Daratumumab lösen potente CDC aus | 50 |
| 4.1.3. | Maus-Tumor-Xenograft CD38+ Burkitt-Lymphom-Zellen..... | 52 |
| 4.1.3.1. | Behandlung von Mäusen mit CD38-spezifischen Antikörpern hemmt Tumorwachstum | 52 |
| 4.1.3.2. | CD38-spezifische mAbs verlängern Überleben im Tierversuch | 56 |
| 4.1.3.3. | Ex-vivo-Organanalysen zeigen keine gebundenen CD38- Antikörper auf Tumorzellen..... | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.2. CD38-spezifische Nanobody-Dimere..... | 61 |
| 4.2.1. Produktion und Aufreinigung von bivalenten Nanobody-Dimeren..... | 61 |
| 4.2.2. Charakterisierung von bivalenten Nanobody-Dimeren | 64 |
| 4.2.3. Kein Nachweis von Antikörpern gegen Nanobody-Dimere in verwendetem humanen Serum..... | 66 |
| 4.2.4. Nanobody-Dimere in Kombination mit Daratumumab oder hcAbs weisen hohe CDC-Effektivität auf | 68 |
| 4.2.5. Nanobody-Dimere in Kombination mit hcAbs unterschiedlicher Spezifität induzieren potente CDC bei nicht-überlappenden Epitopen..... | 72 |
| 5. Diskussion..... | 75 |
| 5.1. Überblick der Ergebnisse | 75 |
| 5.2. CDC-Aktivierung | 76 |
| 5.3. In-vivo-Effektivität..... | 81 |
| 5.4. Ausblick für Schwere-Ketten-Antikörper und Nanobodies in der Therapie von Tumoren | 83 |
| 6. Kurzfassung | 85 |
| 7. Abstract | 86 |
| 8. Anhang | 87 |
| 8.1. Plasmidkarten | 87 |
| 8.2. Sequenzen der Nanobody-Dimere..... | 88 |
| 8.3. Abkürzungsverzeichnis | 90 |
| 9. Literaturverzeichnis..... | 93 |
| 10. Danksagung | 100 |
| 11. Lebenslauf (entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen) | 101 |
| 12. Eidesstattliche Versicherung..... | 102 |

1. Einleitung

1.1. CD38

1.1.1. Aufbau und Funktion

Humanes CD38, das aus einer einzelnen 300 Aminosäuren (AS) langen Kette besteht, ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. N-terminal besitzt es einen 21 AS langen, zytoplasmatischen Schwanz, mittig eine 23 AS lange Singlepass-Transmembrandomäne und eine extrazelluläre C-terminale Domäne von 256 AS (Jackson and Bell, 1990, Itoh et al., 1994).

Es gehört zu einer Enzymfamilie, dessen Mitglieder den Prozess der Zyklisierung von NAD zu cADPR katalysieren. Die beiden Verwandten des Enzyms CD38 sind CD157 und die *Aplysia* ADP-Ribosyl-Cyclase (Lee and Aarhus, 1991, Itoh et al., 1994). Im Bereich des N-Terminus ist das Protein hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut, wohingegen es c-terminal eher aus β -Faltblättern besteht. Ein Teil des aktiven Zentrums des Enzyms ist innerhalb der Enzymfamilie hoch konserviert und zeichnet sich durch ein TLEDTL-Motiv aus, welches in einer tiefen Tasche des Proteins liegt. Als essentiell für die Enzymfunktion hat sich die Glutaminsäure (Glu) an Position 226 in der katalytischen Domäne herausgestellt (Munshi et al., 2000). Daneben erscheinen auch Glu146 und Thr221 (Threonin) eine Rolle bei der Hydrolyse sowie Zyklisierung seiner Substrate zu spielen (Graeff et al., 2001). In ähnlicher Weise konserviert wie das aktive Zentrum sind 12 Cysteine, die durch Ausbildung von 6 Disulfidbrücken dem Enzym Stabilität verleihen. CD38 ist ein Ektoenzym und wurde zuerst außen auf der Zellmembran beschrieben. Es befindet sich jedoch nicht nur auf äußeren Plasmamembranen, sondern auch auf denen des endoplasmatischen Retikulums und Membranen der Zellkerne (Sun et al., 2002).

Bei CD38 handelt es sich um ein Protein, das erstmals 1970 auf T-Zellen und Thymozyten entdeckt wurde. Es stellte sich jedoch heraus, dass CD38 auf einer Vielzahl von Hämozyten, wie T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Thrombozyten, Erythrozyten und vielen ihrer Vorläuferzellen zu finden ist. Auf T- und B-Zellen findet sich ein charakteristisches Expressionsmuster von CD38: der Großteil der Progenitorzellen ist CD38-positiv, ausgereifte, jedoch inaktive T- und B-Zellen

exprimieren weniger CD38 und aktivierte T- und B-Zellen wiederum deutlich mehr CD38 (Malavasi et al., 1994). Neben den Zellen des Blutes wird es außerdem auf der Oberfläche von Purkinje-Zellen, Zellen im Bereich des Glomerulums, Betazellen in den Langerhans-Inseln oder auf Osteoklasten exprimiert. (Quarona et al., 2013). Die höchsten Expressionsdichten von CD38 finden sich auf Plasmazellen und deren malignem Gegenstück, den Myelomzellen (Malavasi et al., 2008).

CD38 ist ein multifunktionales Ektoenzym, welches unter neutralen bzw. alkalischen pH-Bedingungen die Katalysierung der Zyklisierung von Nikotinamidadenin-dinukleotid (NAD) zu zyklischer ADP-Ribose (cADPR) vornimmt (**Abb. 1.1.**). Allerdings wird nur ein Teil des NAD zyklisiert, wobei das meiste zu ADP-Ribose (ADPR) weiterhydrolysiert wird. Das bedeutet, dass cADPR nicht nur Produkt der enzymatischen Funktion von CD38 ist, sondern auch dessen Substrat, das in ADPR umgewandelt wird (Howard et al., 1993, Lee, 2006). Die Konversion zu cADPR führt zur Bindung dessen an FK506 binding protein 12.6, wodurch sich dieses von Calciumionenkanälen, den sogenannten Ryanodin-Rezeptoren, löst. Dies führt wiederum zur Aktivierung dieser Kanäle, welche einen Calciumeinstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol bewirken (Noguchi et al., 1997, Sun et al., 2002). Im Gegensatz zu cADPR wirkt ADPR agonistisch am TRPM (*transient receptor potential cation channel, melastatin subfamily, member 2*). Dabei handelt es sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal in der Plasmamembran, der über Calciuminflux an der Sekretion von Insulin und Oxytocin beteiligt ist (Togashi et al., 2006, Liu et al., 2016).

Ein weiteres Substrat von CD38 ist NADP (**Abb. 1.1.**). In Gegenwart von Nikotinsäure und unter sauren pH-Bedingungen bewirkt das Enzym durch einen nukleophilen Angriff den Basenaustausch von Nikotinamid mit der Nikotinsäure, woraus NAADP entsteht. Ebenso wie bei der Reaktion unter alkalischen Bedingungen kann CD38 wieder das Produkt als Substrat verwenden und unter Abspaltung der Nikotinsäure NAADP zu ADP-Ribose-2'-Phosphat (ADPRP) hydrolysieren (Lee, 2006, Wei et al., 2014). NAADP ist ebenfalls Akteur im Calciumstoffwechsel, jedoch mobilisiert es im Gegensatz zu cADPR keine Calciumreserven aus dem endoplasmatischen Retikulum, sondern aus Lysosom-verbundenen Organellen (Churchill et al., 2002).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass CD38 mit NAADP und cADPR Calcium-mobilisierende Purinnukleotide synthetisieren kann, die durch Einstrom aus Zell-

organellen die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen, es jedoch auch für deren Degradation verantwortlich ist. Diese doppelte Enzymfunktion hat den Vorteil, dass die Second Messenger an der Lokalisation, an der sie gebildet wurden, nach erfüllter Aufgabe wieder vom gleichen Enzym abgebaut werden können (Lee, 2006).

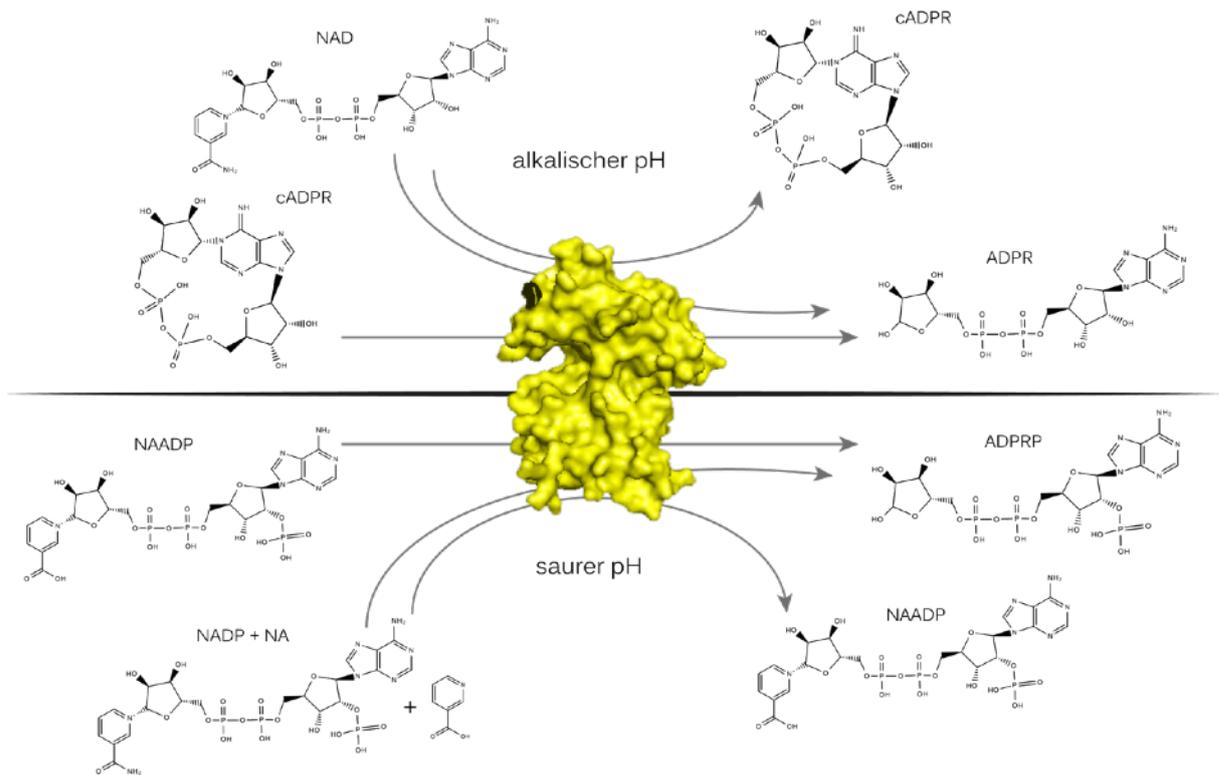


Abb. 1.1.: Enzymatische Aktivität von CD38. Die Abbildung stellt die von CD38 katalysierten Prozesse im sauren und alkalischen Milieu dar. Veranschaulicht wird, dass CD38 unter beiden pH-Bedingungen mit cADPR und NAADP ein Produkt wieder als Substrat verwenden kann. Außerdem wird deutlich, dass sich die Substrate im Wesentlichen durch die Phosphatgruppe, an den an Adenin gebundenen Fünfring unterscheiden. Die Abkürzungen stehen für: Nikotinamidadenindinucleotid (NAD), zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR), Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR), Nikotinsäureadenindinucleotidphosphat (NAADP), Adenosindiphosphoribosephosphat (ADPRP), Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP), Nikotinsäure (NA). Die Kristallstruktur von CD38 wurde mittels PyMOL erstellt. Die chemischen Strukturen wurden mittels ChemSpider Editor erstellt.

Neben der Funktion als Enzym fungiert CD38 des Weiteren als Rezeptor für seinen Liganden CD31 (Deaglio et al., 2001). Bei CD31, auch PECAM-1 genannt, handelt es sich um ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, welches auf Hämocyten und Endothelzellen zu finden ist und zu dessen Funktionen unter anderem die Beteiligung an transendothelialer Migration von Leukozyten gehört (Newman, 1999). Durch die Bindung von CD38 an CD31 kommt es zur Adhäsion der beteiligten Zellen und schließlich zum Durchtreten der Immunzellen durch das Endothel. Weiterhin

führt die Bindung zur Aktivierung der CD38⁺ Zellen, was in T-Zellen beispielsweise durch einen Anstieg von mRNA-Leveln von IL-6, IL-10, GM-CSF und IFN- γ beobachtet werden konnte (Deaglio et al., 1998).

In B-Lymphozyten wurde beobachtet, dass mit fortschreitender Reifung der Zellen von der Pro-B-Zelle zur Plasmazelle die Expression von CD38 ansteigt. Ergebnisse aus Mausmodellen lassen vermuten, dass in frühen Stadien der Zellentwicklung CD38 eine Rolle als Regulator von Apoptose spielt und somit zur Hemmung der Lymphopoese beiträgt (Romero-Ramírez et al., 2015). Demgegenüber stehen andere Ergebnisse aus In-vitro-Untersuchungen an reifen B-Zellen aus tonsillären Keimzentren, in denen durch Ligation mit einem monoklonalen Antikörper eine Induktion der Apoptose unterdrückt werden konnte, was allerdings mit anderen mAbs nicht gelang (Zupo et al., 1994). Indes kann wie bei T-Zellen davon gesprochen werden, dass die Ligation von CD38 zu Proliferation von B-Zellen beiträgt sowie zur Zellaktivierung, was sich durch einen Anstieg in mRNA von CD25, HLA-Klasse-II und IL-1 α , IL-2, IL-4 und IL-6 niederschlägt (Funaro et al., 1997). Auch in NK-Zellen konnte durch Ligation von CD38 eine verstärkte Expression von CD25, HLA-Klasse-II und überdies mRNA von IFN- γ und GM-CSF beobachtet werden. (Mallone et al., 2001, Malavasi et al., 2008).

In Osteoklasten führt cADPR zur Öffnung von zwei verschiedenen Ryanodinrezeptoren. Der resultierende Calciumeinstrom retrahiert die Zelle, reduziert die Säuresekretion und hemmt somit die osteolytische Aktivität (Sun et al., 1999). Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration bedingt allerdings auch die Ausschüttung von IL-6, was der Hemmung der Resorption entgegenwirkt. Somit scheint CD38 maßgeblich am Gleichgewicht der Aktivität von Osteoklasten beteiligt zu sein (Adebanjo et al., 1998).

1.1.2. Die Rolle von CD38 in malignen Erkrankungen

CD38 wird auf einer auf einer Vielzahl von Zellen insbesondere T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und deren Progenitoren exprimiert und hat diverse Funktionen in der Homöostase von jenen Zellen. Durch diese wichtige Rolle von CD38 im Zellhaushalt, kann seine Überexpression im Zuge mancher Krankheiten an ihrer Entstehung oder dem Verlauf beteiligt sein.

Bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) kommt es zu einer Lymphozytose von reifen, kleinen, jedoch weitgehend funktionslosen B-Zellen, die sich im peripheren Blut, im Knochenmark und in den Lymphknoten abspielt, weshalb sie heutzutage zu den Lymphomen zählt. Vor allem in den Lymphknoten finden sich viele CD38⁺ Lymphomzellnester, die sich ihr eigenes proliferatives Tumormikromilieu schaffen. Auf Stromazellen und den sogenannten nerselike cells (NLCs) findet sich das CXCL12. Durch Interaktion mit seinem Rezeptor CXCR4, der sich auf den Lymphomzellen befindet, kommt es zur Rekrutierung der Zellen ins Mikromilieu des Lymphknoten. CD38 erhöht die Empfänglichkeit der durch CXCL12 hervorgerufenen Chemotaxis (Burger et al., 2000, Vaisitti et al., 2010). Zusätzlich trägt ZAP-70, eine Tyrosinkinase, welche durch Ligandation von CD38 phosphoryliert und somit aktiviert wird, dazu bei, das migratorische Potential der Zellen und die Sensibilität gegenüber CXCL12 weiter zu erhöhen und dient überdies als Proliferationssignal (Deaglio et al., 2007, Malavasi et al., 2011).

Weiterhin exprimieren Stromazellen in den Keimzentren der Lymphknoten CD31. Der Kontakt von CD38⁺ Lymphomzellen mit seinem Liganden CD31 auf transduzierten Mausfibroblasten führte zur Proliferation der Population. Ferner erbrachte die Interaktion die Hochregulation von CD100, einem Aktivierungs- und Überlebensmarker in B-Zellen (Deaglio et al., 2005).

Dies alles führt über einen positiven Feedback-Mechanismus, der CD38⁺ Zellen in die Proliferationszentren bringt, ihnen dort einen Überlebensvorteil verschafft und somit andere funktionsfähige Lymphozyten verdrängt. Aus diesen Gründen sind eine hohe CD38- sowie ZAP-70-Expression, besonders bei simultaner Expression, prognostisch schlechte Marker für den Krankheitsverlauf einer CLL (Deaglio et al., 2007).

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung, die sich in den Plasmazellen manifestiert. Bei der Krankheit kommt es zur Vermehrung der Myelomzellen im Knochenmark und darauf folgend zur massiven Produktion von monoklonalen Antikörpern oder funktionslosen Leichtketten. Dadurch erklärt sich auch die Symptomkonstellation der Patienten, welche unter Nierenschädigungen, Osteolysen und dadurch bedingter Hypercalcämie sowie einer Verdrängung der Blutbildung leiden.

Ihr Altersgipfel liegt zwischen 71 und 73 Jahren und macht 1 % aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Jedes Jahr erkranken pro 100.000 Einwohnern etwa 7 Menschen (Kortüm et al., 2013). Das mittlere Überleben bei Diagnosestellung hat sich durch neuere Therapien und eine deutliche Steigerung in der Durchführung von Stammzelltransplantationen in den letzten 20 Jahren auf 7-8 Jahre verdoppelt (Anderson, 2012).

Myelomzellen zeigen eine gesteigerte Expression von CD38 (Malavasi et al., 2008, Quarona et al., 2013). Auch eine erhöhte Expression von CD38 in Osteoklasten, vor allem während der Osteoklastogenese, scheint eine Rolle bei der Erkrankung zu spielen. Durch ihre Aktivierung konnte eine reziproke Hemmung von zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden, was wiederum ein immunsuppressives Mikromilieu im Knochenmark schafft. In Ex-vivo-Versuchen konnte die T-Zell-Funktionalität durch Inkubation mit einem CD38-spezifischen mAb wieder hergestellt werden (An et al., 2016).

Durch CD38 synthetisiertes cADPR spielt eine Rolle in der Hemmung des Knochenabbaus. Im Einklang damit konnte in CD38-KO-Mäusen eine eingeschränkte Funktion von Osteoklasten festgestellt werden, was in den Mäusen eine ausgeprägte Osteoporose hervorrief (Sun et al., 2003). Allerdings kommt es bei Multiplen-Myelom-Patienten zu ausgeprägten Osteolysen, die hierbei durch Überexpression von CD38 unterstützt wird. Dementsprechend zeigten Versuche mit dem monoklonalen CD38-spezifischen Antikörper Daratumumab eine Hemmung der Osteoklastogenese nach In-vitro-Behandlung der Zellen. Dieser inhibitorische Effekt in der Zellentwicklung konnte durch die Koinkubation von ATRA und Daratumumab noch verstärkt werden, wobei er auch bei ATRA-Monotherapie deutlich sichtbar war (Costa et al., 2017). Bei ATRA oder all-trans-Retinsäure handelt es sich um eine dem Vitamin-A₁-verwandte Struktur, die die CD38-Expression hochreguliert, besonders in malignen Zellen (Drach et al., 1994). Dies zeigt, dass es durch Überexpression, aber auch Unterexpression von CD38 zu einem Ungleichgewicht von Knochenbildung und Knochenresorption kommt, was in beiden Fällen zu einer Osteopathie, entweder in Form von Osteoporose oder Osteolyse führt.

Weiterhin konnte in vielen Fällen in Myelomzellen eine Koexpression von CD38 und seinem Liganden CD31 detektiert werden, was ihnen möglicherweise einen zusätzlichen Überlebensvorteil erbringt (Vallario et al., 1999).

1.2. Antikörpertherapie

1.2.1. Entwicklung der Antikörpertherapie

Der erste im Labor hergestellte monoklonale Antikörper (mAb) wurde 1975 entwickelt. Durchgeführt wurde dies mit der sogenannten Hybridom-Technik, bei welcher B-Zellen von immunisierten Mäusen mit einer Myelomzelllinie gekreuzt wurden. Somit wurde die Fähigkeit der einen Zelle, den geeigneten Antikörper zu produzieren, und die Immortalität der anderen ausgenutzt, wodurch die entstehenden Klone des Hybridoms eine unerschöpfliche Menge an Antikörpern produzieren konnten (Köhler and Milstein, 2005). Diese murinen Antikörper haben allerdings den Nachteil, dass sie körperfremd sind und potentiell schwerere Nebenwirkungen als gänzlich humane mAbs verursachen. Eine Weiterentwicklung hierzu stellt die Fusion der variablen Domäne der leichten Kette (V_L) und die der schweren Kette (V_H) einer Maus mit der Fc-Region eines Menschen dar. Die meisten in der Klinik erhältlichen Antikörper bestehen heutzutage aus einer Fusion der humanen Fc-Region mit einer murinen Antigen-bindenden Domäne, was als humanisierter Antikörper bezeichnet wird (Hansel et al., 2010).

Im Jahre 1986 wurde mit Muromonab der erste monoklonale Antikörper für therapeutische Zwecke von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassen. Seitdem wurden bis Mai 2021 insgesamt 99 weitere mAbs für den Einsatz am Menschen zugelassen (Mullard, 2021). Im Jahr 2019 wurden über \$115 Mrd. mit ihrer Vermarktung weltweit generiert (Lu et. al, 2020). Aufgrund der Tatsache, dass viele dieser Antikörper in einen alternativlosen therapeutischen Raum eingebracht werden, sind die Regularien für ihre Einführung in die klinische Testphase oft vergleichsweise geringer, worauf schneller eine Zulassung folgen kann. Hinzu kommt, dass durch eine immer älter werdende Bevölkerung die Nachfrage nach Therapeutika gegen Krankheiten des hohen Lebensalters weiter steigen wird (Liu, 2013, Ecker et al., 2015).

1.2.2. Effektorfunktionen eines Antikörpers

Antikörper haben vielfältige immunologische Effektormechanismen.

An erster Stelle steht die direkte Antikörperwirkung, die stark abhängig von dem angesteuerten Antigen ist. Durch Ligation mit dem Antikörper kann eine antagonistische bzw. agonistische Signalwirkung des betroffenen Enzyms oder Rezeptors erfolgen. Somit vermittelt beispielsweise der als Therapie beim Mammakarzinom eingesetzte mAb Trastuzumab einen direkten hemmenden Einfluss auf sein Antigen, HER2, ein Protein, das zu den EGF-Rezeptoren (*epidermal growth factor*) zählt. Eine antiapoptotische und proliferative Signaltransduktion wird unterdrückt und es kommt zum Arrest oder Zelltod (Spector and Blackwell, 2009).

Ein weiterer Effektormechanismus ist die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, abgekürzt ADCC (**Abb. 1.2.**). Darin zusammengefasst sind zytolytische Wirkungen von NK-Zellen, Makrophagen oder Granulozyten, die durch einen gebundenen mAb erzeugt werden. Als wichtigste Effektoren tragen die NK-Zellen eine Vielzahl aktivierender Rezeptoren wie dem FcγRIIIa (Fcγ-Rezeptor IIIa, CD16a) sowie inhibitorischer Rezeptoren wie dem KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Rezeptor) auf ihrer Zelloberfläche. Die Funktion jener Rezeptoren ist es zwischen Pathogenen und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. In ihrem Zellinneren befinden sich mit Perforinen und Granzymen gefüllte Vesikel. Kommt es zu einem Übergewicht an aktivierenden gegenüber hemmenden Signalen im Extrazellularraum, formt sich eine immunologische Synapse zwischen Target- und NK-Zelle und die lytischen Enzyme werden ausgeschüttet, was zum Zelltod der Zielzelle führt (Wang et al., 2015).

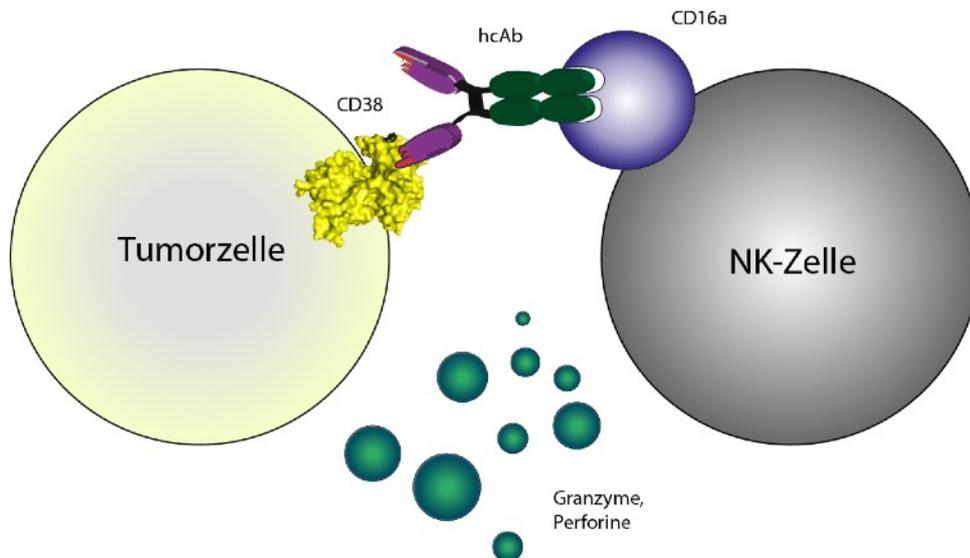


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung von ADCC. Nachdem ein Schwere-Ketten-Antikörper an ein CD38-Molekül einer Tumorzelle gebunden hat, kann sich eine NK-Zelle über ihr CD16a an diesen gebundenen Antikörper anlagern. Durch intrazelluläre Signalwege in der NK-Zelle werden als Folge dieser Bindung Vesikel mit Granzymen und Perforinen ausgeschüttet. Diese Enzyme führen zu einer Lyse der Tumorzelle.

Zellunabhängig funktioniert die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) (**Abb. 1.3.**). Diese Reaktion wird durch das im Blutplasma befindliche oder teils membrangebundene Komplementsystem durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein aus über 30 verschiedenen Proteinen bestehendes System, an dessen Ende diverse Wirkungen wie Apoptose oder Chemotaxis stehen. Viele der Proteine sind inaktive Zymogene, welche durch proteolytische Spaltung in einer Kaskade nacheinander aktiviert werden. Bekannt sind drei Wege, über die das Komplementsystem seine Wirkung entfalten kann: der alternative Weg, der Lektin-Weg und der klassische Weg, auf den hier hauptsächlich eingegangen wird (Sarma and Ward, 2011).

Der klassische Weg beginnt, wenn der C1-Komplex, bestehend aus zwei C1r-, zwei C1s- und einem C1q-Molekül, an mindestens zwei Fc-Regionen mehrerer IgG- bzw. IgM-Immunkomplexe bindet (**Abb.1.3.**). Die Fc-bindende Komponente des Komplexes ist das C1q, welches aus 3 Y-förmigen Armen besteht und eine einzelne Fc-Region nur mit niedriger Affinität bindet. Ferner ist eine einzelne Bindung nicht suffizient, um die weitere Aktivierung des klassischen Weges zu gewährleisten, weshalb ein IgG-Molekül allein nicht in der Lage ist, den C1-Komplex zu aktivieren, ein IgM jedoch durchaus. C1q besitzt 6 Bindungsstellen für Fc-Regionen. Eine maximale Aktivierung wird durch die Hexamerisierung von sechs Fc-Regionen mehrerer IgGs erlangt (Michaelsen et al., 2006, Diebolder et al., 2014). Durch die

C1q-Bindung erfolgt die Aktivierung von C1r und C1s, welche C2 und C4 spalten. Die Spaltprodukte wiederum fügen sich zusammen zu der C3-Konvertase, C4bC2a. Der nächste Schritt der Kaskade ist die Spaltung von C3 via C3-Konvertase, wodurch die Produkte C3a und C3b entstehen. Letzteres lagert sich an die C3-Konvertase C4bC2a an, aus der nun die C5-Konvertase C4bC2aC3b entsteht. Durch sie wird C5 in C5a und C5b zerlegt. C5a und das zuvor gebildete C3a fungieren in vivo als potente Anaphylotoxine, dessen Aufgaben die Mediation von Entzündung, das Anlocken und Aktivieren von Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen ist (Klos et al., 2009). C5b hingegen fügt sich an Komponente C6 und dann C7 an. Bei dieser Anlagerung durchgeht C7 eine Konfigurationsänderung, auf welche Weise ein hydrophober Teil des Proteins freigelegt wird, der dem C5bC6C7-Komplex die Insertion in eine Zellmembran ermöglicht. Dort findet die Anlagerung von C8 und dem ersten Molekül C9 statt. Nach der Bindung von C9 durchläuft diese Komplementkomponente eine Konfigurationsänderung, auf welche der zylindrische Zusammenschluss vieler C9-Moleküle folgt. Eine hydrophile Pore, der sogenannte Membranangriffskomplex (MAC), wird in der Plasmamembran gebildet. Durch den MAC können Elektrolyte und Flüssigkeit sich frei zwischen Intra- und Extrazellularräum bewegen, was aufgrund der höheren intrazellulären Osmolalität zum Einstrom von Wasser führt und die Zelle platzen lässt (Würzner, 2000, Sarma and Ward, 2011).

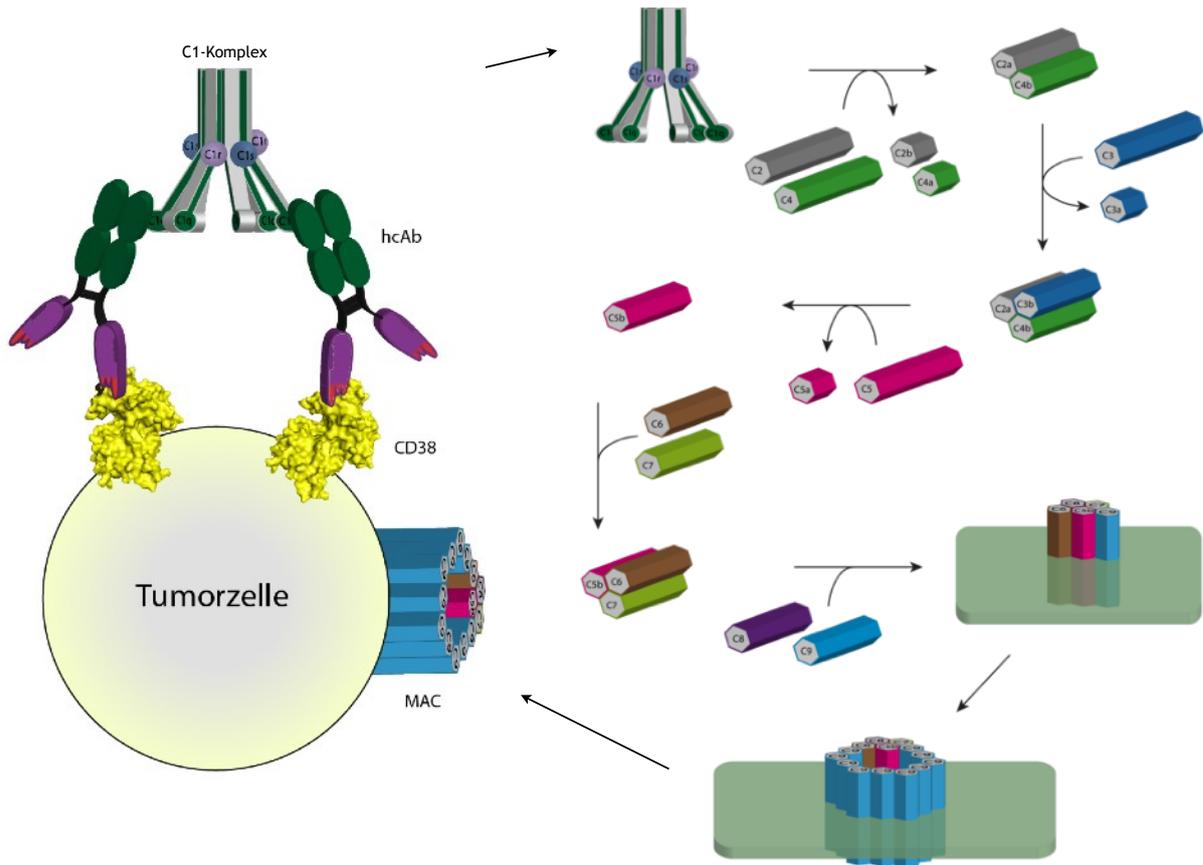


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung von CDC und klassischem Weg des Komplement-systems. Durch die Anlagerung von zwei Schwere-Ketten-Antikörpern an zwei CD38-Moleküle einer Tumorzelle kann ein C1-Komplex, der aus dem sechsköpfigen C1q und je zwei C1r und C1s aufgebaut ist, an die Fc-Domänen jener Antikörper binden und die Komplementkaskade in Gang setzen. Beginnend mit der Spaltung von C2 und C4 durch den C1-Komplex entsteht die C3-Konvertase C4bC2a. Diese aktiviert C3 wonach sich C3a an C4bC2a anlagert, wodurch die C5-Konvertase C4bC2aC3b gebildet wird. Diese spaltet C5 in C5a und C5b, welches sich mit C6 und schließlich mit C7 zusammenfügt und in die Zellmembran inseriert wird. Dort folgen die Anlagerung von C8 und C9, welche als Anker des Membranangriffskomplex (MAC) fungieren. Weitere C9-Moleküle folgen und bilden letztendlich den MAC, welcher als wasserundurchlässige Pore in der Zellmembran für das Anschwellen und Platzen der Tumorzelle verantwortlich ist.

Häufig vernachlässigt, jedoch ebenfalls wichtig in der Immunantwort auf einen gebundenen Antikörper, sind Makrophagen und die von ihnen vermittelte antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP). Anders als NK-Zellen besitzen Makrophagen alle Arten von FcγRs. Interagieren sie mit der Fc-Region eines Antikörpers, kommt es zur Phosphorylierung des intrazellulären Aktin-Myosin-Skeletts, die eine Kontraktion des Makrophagen und somit die Phagozytose zur Folge hat. Inhibitorisch auf diese Kaskade wirkt die Bindung des auf den Makrophagen befindlichen SIRPα an CD47 auf einer Zielzelle. Dieses Oberflächenmolekül wird oft als „don't eat me“-Signal bezeichnet, da es eine Dephosphorylierungskaskade auslöst und eine gebundene Zelle so vor der

Phagozytose bewahrt. Manche Tumoren überexprimieren CD47, um so dem Immunsystem zu entkommen. Die ADCP wird in der Forschung oft außer Acht gelassen, da Makrophagen im Gegensatz zu anderen Effektorzellen nicht aus dem peripheren Blut gewonnen werden können, sondern sich aus ex-vivo-stimulierten Monozyten differenzieren. Überdies ist die Analyse eines ADCP-Assays schwieriger und ungenauer, als dies bei CDC- oder ADCC-Assays der Fall ist (Weiskopf and Weissman, 2015, Dheilily et al., 2017).

1.2.3. CD38-spezifische Antikörpertherapie

CD38 wird in der Entstehung und dem Verlauf des bisher unheilbaren MMs eine wesentliche Rolle zugesprochen. Zusätzlich wird es auf Myelomzellen so stark exprimiert wie auf keiner anderen Zelle. Dies macht CD38 zu einem attraktiven Target für eine antikörperbasierte Immuntherapie mit CD38-spezifischen Antikörpern (Malavasi et al., 2008).

Der monoklonale CD38-spezifische Antikörper Daratumumab wurde 2015 von der FDA für die Therapie des MMs zugelassen. Er stammt aus immunisierten, transgenen Mäusen und ist vollständig human (van de Donk et al., 2016). Präklinisch konnte nachgewiesen werden, dass Daratumumab CDC, ADCC, ADCP und auch Apoptose durch Fc-Region-Kreuzvernetzung des Antikörpers mit Unterstützung von anti-human-IgG-Antikörpern in Zielzellen induziert (Nijhof et al., 2015, Overdijk et al., 2015, Overdijk et al., 2016).

Bevor Daratumumab auf den Markt kam, gehörten zum Standardtherapieschema für das MM einerseits Lenalidomid, ein Medikament aus der Klasse der Immunmodulatoren mit antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkung, andererseits Bortezomib, einem proapoptotisch wirkenden Proteasom-Inhibitor (Kortüm et al., 2013).

Seit seiner Zulassung wurde Daratumumab in zahlreichen klinischen Studien bei therapierefraktärem und rückfälligem MM evaluiert. Zuerst wurde in zwei Monotherapiestudien (GEN501 und SIRIUS) eine Menge von 16 mg/kg Körpergewicht als vorteilhaft zwischen Wirk- und Nebenwirkungsprofil eruiert. Hierbei konnte ein partielles Ansprechen bei 29-36 % aller Patienten beobachtet werden (Usmani et al., 2016).

Anschließend wurde es auf seine Wirksamkeit in Kombination mit Dexamethason und Lenalidomid getestet. In der POLLUX-Studie, einer Phase-III-Studie, ergab sich in der Gruppe, die zusätzlich mit Daratumumab behandelt wurde, eine Ansprechrate von 81 % (Dimopoulos et al., 2016). Auch in Kombination mit Bortezomib lag das Gesamtansprechen in der Daratumumabgruppe mit 83 % um 20 % höher als in der Kontrollgruppe, die nur mit Bortezomib und Dexamethason behandelt wurde (Palumbo et al., 2016).

Häufige Nebenwirkungen von Daratumumab, wie auch bei vielen anderen mAbs, sind infusionsbedingte Reaktionen vom Grad 1 und 2. Dazu zählen Rhinitis, Husten, Dyspnoe oder Fieber. Durch die große Vielfalt an myeloiden und lymphoiden Zellen sowie deren Progenitoren, auf denen CD38 exprimiert wird, kann es durch die Behandlung mit Daratumumab zu teils schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen. Zu diesen zählen unter anderem Anämien, Thrombozytopenien und Leukopenien, insbesondere Neutropenien (Lokhorst et al., 2015).

Zur Zeit scheint die beste Behandlung von rückfälligen Multiplen Myelomen, die auf bewährte Therapien nicht ansprechen, eine Kombinationstherapie aus Lenalidomid, Dexamethason und Daratumumab mit einem progressionsfreiem Überleben (PFS) von 22,6 Monaten zu sein. Für Patienten mit frühen Rückfällen ist die Studienlage dürftig. Experten gehen davon aus, dass Daratumumab in den nächsten Jahren in die Erstlinientherapie aufgenommen wird (van de Donk et al., 2018).

1.3. Schwere-Ketten-Antikörper

In der Evolution haben sich nicht nur anatomische Verhältnisse zwischen verschiedenen Lebewesen verändert, sondern auch teilweise ihr Immunsystem. So wurde 1993 eine besondere Eigenart in einem Teil der Antikörper von Dromedaren festgestellt. Neben dem „normalen“ IgG1-Anteil im Serum der Tiere wurden die sogenannten Schwere-Ketten-Antikörper (hcAb) entdeckt (**Abb. 1.4.**). Bald nach der Entdeckung konnte außerdem gezeigt werden, dass hcAbs nicht ausschließlich in Dromedaren vorkommen, sondern auch in anderen Kameliden wie Lamas und Alpakas. Generiert werden können hcAbs, indem man einem immunisierten Tier Lymphozyten entnimmt, die mRNA der V_HH-Domäne in cDNA umschreibt, sie mittels PCR amplifiziert und via Phage-Display selektiert (Arbabi Ghahroudi et al., 1997).

Im Gegensatz zu einem IgG1-Antikörper (150 kDa), der aus zwei schweren Ketten (je 50 kDa) und zwei leichten Ketten (je 25 kDa) zusammengesetzt ist, besteht ein solcher Schwere-Ketten-Antikörper (80 kDa) lediglich aus zwei schweren Ketten zu je 40 kDa ohne eine CH1-Region (**Abb. 1.4.**) (Hamers-Casterman et al., 1993). Die V_HH (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*) oder auch als „Nanobody“ bezeichnete Domäne ist das Paratop, also die Antigen-bindende Domäne eines hcAbs. Sie ist nur 15 kDa groß und besitzt drei CDRs (*complementarity determining region*), im Vergleich zu den sechs CDRs eines konventionellen Antikörperarms. Eine weitere Eigenart ist die Länge der CDR3-Schleife, die bei einem Nanobody bis zu 28 Aminosäuren lang sein kann, bei einem konventionellen Antikörper hingegen maximal 15 Aminosäuren umfasst (Wesolowski et al., 2009). Durch ihre geringe Größe und lange CDR3-Schleife können einige Nanobodies in das aktive Zentrum eines Enzyms binden und dessen enzymatische Aktivität modulieren (De Genst et al., 2006). Ein weiterer Vorteil, der sich aus der geringen Größe ergibt, ist die bessere Gewebepenetration und die schnelle renale Eliminierung, da Nanobodies deutlich unter der Größengrenze der Filtrationsbarriere der Niere von etwa 65 kDa liegen. Somit sind Nanobodies ebenfalls hervorragend in der Diagnostik einsetzbar, da ungebundene Antikörper einfach wieder ausgeschieden werden (Chakravarty et al., 2014). Nanobodies bieten überdies eine einfache, gentechnische Handhabung, denn sie können von einer Vielzahl von Zellen produziert werden. Dies liegt daran, dass die Faltung und Zusammensetzung eines Nanobodies bedeutend simpler ist als die eines konventionellen Antikörpers, weil es

in der V_HH -Domäne nur eine einzelne Disulfidbrücke gibt, wohingegen in einem IgG1 multiple Domänen auf diese Weise miteinander verknüpft sind (Arbabi-Ghahroudi, 2017). Die Fusion eines Nanobodies mit der Gelenkregion einer humanen Fc-Region resultiert in einem chimärischen hcAb (Unger et al., 2015).

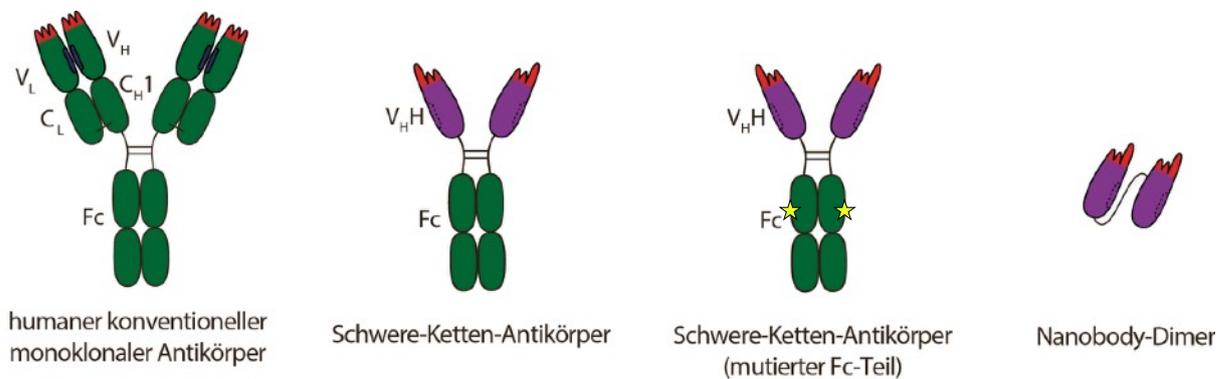


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung von verschiedenen Antikörpertypen. Rechts ist ein konventioneller, humaner monoklonaler Antikörper (mAb) dargestellt, wie beispielsweise Daratumumab. Ein solcher Antikörper besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die zusammen eine Masse von 150 kD ausmachen. Verbunden sind leichte und schwere Kette durch eine Disulfidbrücke zwischen ihren konstanten Domänen C_L und C_{H1} . Die Hinge-Region verknüpft den Fc-Teil mit dem Fab-Teil und hält beide Hälften des Antikörpers durch zwei Disulfidbrücken zusammen. Die dunklen Schattierungen in der variablen Domäne des mAb illustrieren die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen V_L und V_H . Die CDR-Regionen der variablen Domänen sind durch fingerartige, rote Strukturen dargestellt. Der Schwere-Ketten-Antikörper (hcAb) besteht nur aus zwei schweren Ketten und ist dementsprechend nur 80 kD schwer. Es besteht kein Unterschied in Fc- oder Hinge-Region. Die variable Domäne des hcAbs wird als V_{HH} oder auch Nanobody bezeichnet. Diese ist mit 15 kD wesentlich leichter als eine Fab-Region eines konventionellen mAbs mit 50 kD. Die CDR3-Schleife ist größer. Die V_{HH} besitzt an ihren Seiten eine hydrophile Region, die ihr eine verbesserte Löslichkeit einbringt (gestrichelte Linie). Neben dem Schwere-Ketten-Antikörper ist ein weiterer hcAb mit mutiertem Fc-Teil dargestellt. Die Mutationen werden durch die Sternchen in CH2-Domäne verdeutlicht. Der Nanobody-Dimer ist eine mit GS-Linker verknüpfte Struktur aus zwei V_{HH} s. Die Abbildung wurde von Julia Hambach angefertigt und teilweise verändert (Schütze et al., 2018).

Durch die Fusion zweier Nanobodies, verbunden durch einen genetischen Peptidlinker aus Aminosäuren wie Glycin und Serin, entsteht ein bivalenter Nanobody-Dimer (**Abb.1.4.**). Es gilt hierbei zwischen einem biparatopischen und einem bispezifischen Dimer zu unterscheiden. Bispezifisch bedeutet, dass ein Antikörper an zwei unterschiedliche Antigene binden kann. Ein biparatopischer Dimer, eine Unterform des bispezifischen Antikörpers, zeichnet sich durch zwei Nanobodies aus, die an nicht-überlappende Epitope des gleichen Antigens binden. Sie weisen eine hohe Spezifität und niedrige Off-Target-Bindung auf (Bannas et al., 2017). Ferner entstehen bei der Zusammensetzung solcher bispezifischer Nanobody-Dimere nicht die Probleme, die beispielsweise bei der Paarung von leichter und schwerer Kette

eines scFvs auftreten, was Nanobodies zu optimalen Bausteinen für kleine Adapter oder Linker macht (Els Conrath et al., 2001). Zuletzt konnte im Falle eines biparatopischen Nanobody-Dimers gegen einen EGFR ein anti-proliferativer Effekt nachgewiesen werden, der die Wirkung der einzelnen verwendeten V_HHs überstieg (Roovers et al., 2011).

Die Auswahl der Aminosäuren, welche für den Linker zwischen den V_HHs verwendet werden, beeinflusst die Eigenschaften des entstehenden Fusionsproteins. Polare Aminosäuren, wie Serin Threonin, Lysin oder Glutaminsäure haben den Vorteil, durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässriger Lösung die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Als vorteilhaft erweist sich die kleinste unpolare Aminosäure Glycin aufgrund ihrer geringen Größe, was für Flexibilität sorgt und eine geringe Angriffsfläche für proteolytische Enzyme bietet. Die am häufigsten verwendeten Linker in Fusionsproteinen bestehen aus einer Kombination aus Glycin und Serin in einer Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Sequenz unbestimmter Länge (Chen et al., 2013). Diese Komposition eines Glycin-Serin-Linkers in dreifacher Ausführung hat sich bereits in der Verknüpfung von V_L und V_H eines scFvs etabliert (Huston et al., 1988).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bereits einige CD38-spezifische hcAbs aus immunisierten Lamas gewonnen. Sie wurden auf ihre enzymmodulatorischen Fähigkeiten und auf ihre Bindungsstellen am CD38-Molekül getestet. Dabei zeigte sich, dass die generierten Nanobodies an drei nicht-überlappende Epitope binden (**Abb. 1.5.**) (Fumey et al., 2017).

Im Ergebnisteil wurden neben den konventionellen Schwere-Ketten-Antikörpern weiterhin zwei hcAbs verwendet, die sich im Gegensatz zu ihnen durch spezifische Mutationen in der CH2-Domäne auszeichnen. Der im Folgenden als WF211 +/+ hcAb bezeichnete Antikörper besitzt eine Mutation einer Glutaminsäure zu einem Arginin an Position 345 (E345R) in der CH2-Domäne. Diese führt zu einer besseren C1q-Bindung und somit stärkerer Aktivierung des CDC aufgrund vereinfachter Hexamerisierung der Immunglobuline (Diebolder et al., 2014). Weiterhin weist die Fc-Region drei Mutationen in der CH2-Domäne auf, welche zu einer verstärkten NK-Zell-Aktivierung durch eine verbesserte Bindung an den FcγRIIIa führt: Glycin zu Alanin an Position 236 (G236A), Serin zu Asparaginsäure an Position 239 (S239D) und Isoleucin zu Glutaminsäure an Position 332 (I332E) (Saxena and Wu, 2016).

Das im Namen verwendete „+/-“ steht für die Verstärkung von CDC und ADCC. Die WF211 -/- hcAb Mutante besitzt ein Prolin für ein Glycin (P329G) in der CH2-Domäne, was zu einer Abschwächung von CDC- und ADCC-Effektivität führt (Schlothauer et al., 2016). Beide Antikörper wurden von William Fumey kloniert, produziert und für die Versuche bereitgestellt.

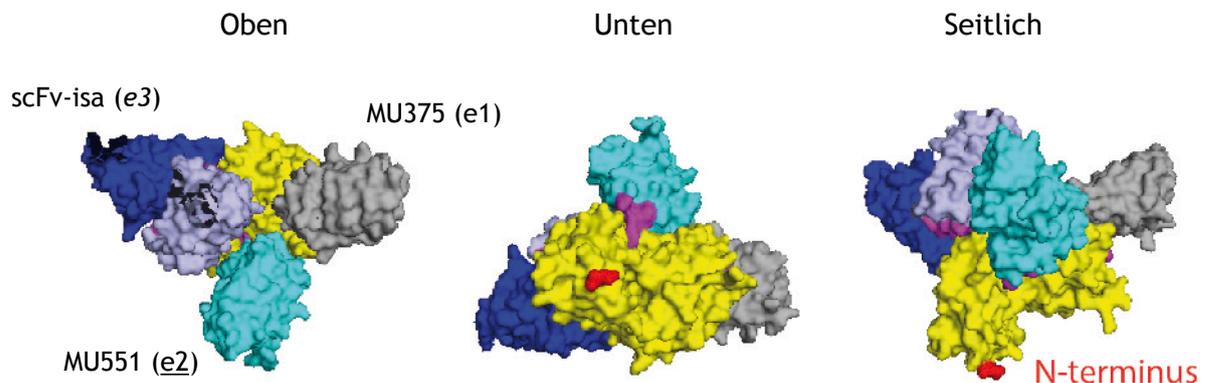


Abb. 1.5.: Nicht-überlappende Bindungsstellen von CD38. Die Darstellung zeigt ein CD38-Molekül (gelb) in seiner Kristallstruktur mit drei verschiedenen Antikörpern, die an ihre jeweiligen Epitope binden. Die dargestellten Antikörper werden nicht in dieser Arbeit verwendet, verkörpern allerdings die entsprechenden Gruppen von Antikörpern, die sich an Epitop e1, Epitop e2 und Epitop *e3* anlagern. In grau dargestellt ist MU375, welcher an Epitop e1 bindet, in türkis MU551 bindet an Epitop e2 und scFv-isa in dunkelblau-helllila bindet an Epitop *e3*. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Antikörper jeweils distinkt voneinander binden, es also zu keinerlei Überlappung kommt. Die Abbildung entstammt der Arbeit von Julia Hambach und wurde teilweise verändert (Hambach et al., 2020).

Da im Ergebnisteil dieser Arbeit das Augenmerk oft darauf liegt, an welches Epitop einer der Schwere-Ketten-Antikörper bindet, werden die Epitope durch die Schriftauszeichnung, in der die Antikörper notiert sind, deutlich gemacht. Antikörper, die an Epitop e1 binden, werden ohne Veränderung dargestellt; jene die an Epitop e2 binden, werden unterstrichen dargestellt und jene, die an Epitop *e3* binden, werden kursiv geschrieben. Im Falle von bivalenten Nanobody-Dimeren wird der Name zweigeteilt dargestellt. Beispielhaft sieht dies so aus: WF211 (e1), JK2 (e2), *MU1105* (*e3*), NiS2 (e2-*e3*).

In **Tab. 1.1.** sind die essentiellen Nanobodies, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, aufgeführt.

Tab. 1.1.: Eingesetzte Nanobodies für In-vivo-Versuche und Dimerisierung.

| Nanobody | CDR3 | Epitop |
|---------------|--------------------------------|-----------|
| WF211 | RLRGWITTRKPNEYDY | e1 |
| WF211 +/+ | RLRGWITTRKPNEYDY | e1 |
| WF211 -/- | RLRGWITTRKPNEYDY | e1 |
| <u>JK2</u> | WHYAAGR DY | <u>e2</u> |
| <i>JK36</i> | DHTFAGVY | e3 |
| <i>MU1105</i> | DVTLNPF TGWDTRSGPMYRYEYDY | e3 |
| Daratumumab | V _H : DKILWFGEPVFDY | e1 |

Die in der Tabelle aufgeführten Nanobodies WF211, WF211 +/+, WF211 -/-, JK2 und *MU1105* wurden in den im Ergebnisteil folgenden Tierversuche eingesetzt, um festzustellen, ob Mäuse durch Behandlung eines injizierten Tumors einen Überlebensvorteil erlangen. Die hcAbs mit einem Wildtyp Fc-Teil wurden sowohl als Monotherapie sowie als Kombination mit Daratumumab eingesetzt. Die Auswahl basierte auf Ergebnissen der Arbeitsgruppe, bei denen sich die Antikörper als therapeutisch vielversprechend herausstellten. Weiterhin wurden JK2 und *JK36* als Nanobodies ausgewählt, um sie zu Homo- und Heterodimeren zu klonieren und zu produzieren. Diese Kombination aus zwei Antikörpern, die die Fähigkeit hatten unabhängig von Daratumumab zu binden, sollte eine gemeinsame Anwendung mit dem konventionellen Antikörper ermöglichen.

1.4. Ziele der Arbeit

CD38 hat sich als stark exprimiertes Antigen in hämatologischen Erkrankungen wie dem unheilbaren Multiplen Myelom in den letzten Jahren als potentiell Target einer antikörperbasierten Immuntherapie herauskristallisiert. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Kombinationen von chimären CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern mit dem klinisch etablierten monoklonalen Antikörper Daratumumab teilweise die Induktion zytotoxischer Immunantworten verstärken.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung neuer Kombinationen von Antikörpern und ihrer Fähigkeit CDC und ADCC in Tumorzellen auszulösen. Ferner soll geklärt werden, ob das Überleben von Mäusen mit einem humanen Tumor-Xenograft mit eben jenen Antikörperkombinationen verlängert werden kann oder, ob eine vollständige Tumoreradikation möglich ist.

Der zweite Teil der Arbeit besteht aus der Klonierung und Produktion von bivalenten, teils biparatopischen CD38-spezifischen Nanobody-Dimeren. Es soll analysiert werden, ob diese Dimere die Effektivität von Daratumumab oder von Schwere-Ketten-Antikörpern im Hinblick auf ADCC oder CDC erhöhen können.

2. Materialien

2.1. Laborgeräte

| Gerät | Modell | Firma |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| Autoklav | Evo 130 | MediTech |
| DNA Gelelektrophoresekammer | 40-0708 | Peqlab Biotechnologie |
| Durchflusszytometer | FACSCantoll | BD Biosciences |
| | FACSCelesta | BD Biosciences |
| Heizblock | Thermomixer 5436 | Eppendorf |
| Homogenisator | Gentlemax | Miltenyi Biotec |
| Inkubationsschüttler | HT INFORS | Unitron |
| Inkubator | MCO-20AIC | Sanyo |
| In-vivo-Dokumentaionssystem | IVIS SpektrumBL | PerkinElmer |
| Lichtmikroskop | Axiovert 25 | Zeiss |
| Mikrowelle | M 637 EC | Miele |
| Mikrotiterplattenleser | VICTOR2 D | Perkin-Elmer |
| Zählkammer | Neubauer | Marienfeld |
| Photometer | Nanodrop 2000c | Peqlab Biotechnologie |
| Pipetten | Research-Line | Eppendorf |
| Pipettierhilfe | Pipettboy | Integra Biosciences |
| PCR-Maschine | T3 Thermocycler | Biometra |
| Reagenzschüttler | Reax1 | Heidolph |
| Scanner | CanonScan 9800F | Canon |
| SDS-PAGE-Kammer | Xcell II MiniCell | Invitrogen |
| Spannungsgeräte | BIO105 LVD | Biometra |
| | Power Pac 200 | BioRad |
| Sterile Werkbänke | HeraSafe | Heraeus |
| UV-Transilluminator | Biovision 3026 | Peqlab Biotechnologie |
| Waage | Scout Pro | OHAUS |
| Wasserbäder | WTE var 3185 | Assistent |
| | 1002 | GFL |
| Zentrifugen | Rotanta 460 R | Hettich |
| | 5424 | Eppendorf |

2.2. Verbrauchsmaterialien

| Material | Name/Art | Firma |
|----------------------------|-------------------------|-------------------|
| Aktivkohlebeutel | Destaining Bags | AMRESKO |
| Cellulosefolien | Dry Ease | Invitrogen |
| DNA-Sequenzierungsgefäße | Genomics | Eurofins |
| Einmalhandschuhe | Dermagrip | WRP |
| Einwegpipetten steril | Serological Pipette | Sarstedt |
| | Advantage | Falcon |
| FACS-Röhrchen | 5 ml Rundbodenröhrchen | Falcon |
| Gelfiltrationssäulen | PD-10 | GE Healthcare |
| Homogenisatorröhrchen | Gentlemacs C Tubes | SteriClin |
| Kulturflaschen | T75,T175 | Nunc |
| Kulturschalen | 10 cm; 25 cm | Greiner |
| Mikrotiterplatten 96-Well | Nunclon Delta Surface U | Thermo Scientific |
| Mikrotiterplatten 96-Well | Nunclon Delta Surface F | Thermo Scientific |
| Mikrotiterplatten 96-Well | Optiplate | PerkinElmer |
| Chromatographie-Säulen | Econo-Pac | Bio-Rad |
| Pipettenspitzen | Tip StackPack | Sarstedt |
| SDS-Gele | Novex BIS-TRIS 12% | Invitrogen |
| Serumröhrchen | S-Monovette | Sarstedt |
| Spritzen | Omnican F 1 ml | Braun |
| Polypropylenröhrchen | 13 ml | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße | 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml | Sarstedt |
| Ultrazentrifugationsfilter | Amicon Ultra 10000 MWCO | Millipore |
| Vakuum-Filtrationssystem | Durapore 0.22 µm | Millipore |
| Verschlussfilm | Parafilm M | Bemis |
| Zellsieb | Cell Strainer 70 µm | Falcon |
| Zentrifugationsröhrchen | 15 ml; 50 ml | Greiner |

2.3. Reagenzsysteme (Kits)

| Material | Name | Firma |
|---------------------|----------------------------------|-------------------|
| Gelextraktion | Nucleospin Gel and PCR Clean- up | Macherey-Nagel |
| Plasmid-Präparation | QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| | Endofree Plasmid Maxi Kit | Qiagen |
| BCA-Kit | Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific |

2.4. Chemikalien

| Chemikalie | Firma |
|---------------------------------|-----------------|
| Agarose | Invitrogen |
| Aqua ad iniectabilia | Braun |
| Antarktische Phosphatase Puffer | NEB |
| BSA | Sigma-Aldrich |
| Carbenicillin | Gibco |
| Cutsmart-Puffer | NEB |
| D-Luciferin | Biosynth AG |
| DNA Loading Dye 6x | Fermentas |
| dNTPs | Invitrogen |
| DTT | Invitrogen |
| EDTA | Roth |
| Ethanol, vergällt | Walter CMP GmbH |
| FCS | Biochrom |
| Freestyle Medium | Gibco |
| Gel Drying Solution | Invitrogen |
| GeneRuler 1 kb DNA-Ladder | Thermo Fischer |
| Glukose | Sigma |
| Hefeextrakt | Gibco BRL |
| InstantBlue | Expedeon |
| Isofluran | Abbott |
| JetPEI | Polyplus |
| KCl | Roth |
| KHCO ₃ | Merck |

| Chemikalie | Firma |
|-----------------------------|--------------|
| KOD-Puffer | Novagen |
| LB Agar | BD/Difco |
| LB Medium | BD/Difco |
| MgCl ₂ | Fluka |
| MgSO ₄ | Novagen |
| MEM Alpha Medium | Gibco |
| MES 20x SDS Running Buffer | Invitrogen |
| NaCl 0,9 % Lösung | Braun |
| Natriumpyruvat | Gibco |
| NH ₄ Cl | Merck |
| Nickel-NTA | Sigma |
| NuPage LDS sample buffer 4x | Invitrogen |
| PBS | Gibco |
| Pferdeserum | Gibco |
| Propiumiodid | Invitrogen |
| Puromycin | InvivoGen |
| Q5 High GC Enhancer | NEB |
| Q5 Reaktionspuffer | NEB |
| Roti-Safe | Roth |
| RPMI 1640 | Gibco |
| TAE 50x | Invitrogen |
| Trypton | Gibco BRL |
| 3.1 Puffer | NEB |

2.5. Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|--------------------------|---|
| α -MEM | 400 ml MEM Alpha Medium 50 ml FCS 50 ml Pferdeserum 5 ml L-Glutamin 25 μ l IL-2 |
| Freestyle Feeding Medium | Freestyle Medium 20 % Trypton |
| LB Medium | 25 g/l in dH ₂ O |
| LB Agar | 30,5 g/l in dH ₂ O |
| RPMI Kompletmedium | 500 ml RPMI Medium 1640 25 ml FCS 5 ml L-Glutamin 5 ml Natriumpyruvat |
| SOC Medium | 0,5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose |

2.6. Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|------------------------|--|
| Erythrozytenlysepuffer | in dH ₂ O 155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 100 μ M EDTA |
| Ni-NTA Elutionspuffer | in PBS -/- 250 mM Imidazol |
| Ni-NTA Lagerungspuffer | in PBS -/- 20 % Ethanol |

2.7. Antikörper

| Antigen | Klon | Fluorochrom | Firma |
|--------------|-------------|---------------|---------------------------|
| CD38 | Daratumumab | - | Janssen |
| CD38 | JK2 | AlexaFluor647 | AG Nolte |
| CD38 | JK2 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK19 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK22 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK28 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK29 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK36 | - | AG Nolte |
| CD38 | JK44 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU274 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU370 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU415 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU523 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU738 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU1058 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU1067 | - | AG Nolte |
| CD38 | MU1068 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF9 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF14 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF42 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF100 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF121 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF141 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF211 | - | AG Nolte |
| CD38 | WF211 +/- | - | AG Nolte |
| CD38 | WF211 -/- | - | AG Nolte |
| c-Myc | 9E10 | APC | AG Nolte |
| hulgG1 | - | PE | Jackson ImmunoResearch |
| hulgG1 | G17-1 | Biotin | BD |
| CDTa | L-15 | - | AG Nolte |
| P2X4 | 271 | - | AG Nolte |
| Streptavidin | - | PE | BD |

2.8. Enzyme

| Antigen | Firma |
|--------------------------|---------|
| Antarktische Phosphatase | NEB |
| BamHI | NEB |
| KOD Hot Start Polymerase | Novagen |
| NcoI | NEB |
| NotI | NEB |
| PciI | NEB |
| Q5-Polymerase | NEB |
| T4 Ligase | NEB |

2.9. Zelllinien

| Zelllinie | Firma |
|--|------------|
| <i>prokaryotische Zellen</i> | |
| XL-1 Blue <i>E. coli</i> | AG Nolte |
| XL-10 Gold <i>E. coli</i> | Stratagene |
| <i>eukaryotische Zellen</i> | |
| CA46 | AG Nolte |
| CA46 luc | AG Nolte |
| Daudi | AG Nolte |
| Daudi luc | AG Nolte |
| HEK293-6E | AG Nolte |
| HEK293-6E ^{CD38} | AG Nolte |
| NK-92-Zellen ^{huCD16 CD38 KO} | AG Nolte |

2.10. Mauslinien

| Linie | Firma |
|---|----------------|
| CB17/lcr-Prkdc ^{scid} /lcrIcoCrI | Charles Rivers |

2.11. DNA- und Protein-Standards

| Standard | Zusammensetzung | Firma |
|-----------------------------|--|----------------|
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | - | Thermo Fischer |
| Supermarker 1x SM (Protein) | 100 µg/ml BSA 75 µg/ml IgG 10 µg/ml Lysozyme | AG Nolte |

2.12. Plasmide

| beinhaltendes Gen | Vektor | Firma |
|-------------------|-----------------|----------|
| JK2 | pCSE2.5_hulgG | AG Nolte |
| JK36 | pCSE2.5_hulgG | AG Nolte |
| JK36 | pCSE2.5_HIS_myc | AG Nolte |

2.13. Oligonukleotide

| Name | Sequenz | Firma |
|-------------|---|-------|
| 36 pci | TCCGACATGTCCCAGGTGCAACTG | Sigma |
| for 36 5GS | TCTTGGATCCGGCGGCGGTGGATCAATGGCGCAGGTGCAAGTG | Sigma |
| for 36 15GS | TCTTGGATCCGGCGGGGGAGGTAGTGGGGGTGGGGGCTCAGGTGG CGGCGGCTCAATGGCGCAGGTGCAACTG | Sigma |
| 36 r 3GS | GCGAGGATCCTCCCCCGCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC | Sigma |
| 36 r 8GS | GCGAGGATCCCCACCCCCACTACCTCCCCCGCCTGAGGAGACGG TGACCTGGGTCCC | Sigma |
| 36 r 18GS | GCGAGGATCCGCCGCCACCGCTGCCGCCGCCACCTGAGCCCCAC CCCCACTACCTCCCCCGCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC | Sigma |
| CH2 rev | TCCACCACCACGCATGTGACC | Sigma |
| CMV | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG | Sigma |
| BGH | TAGAAGGCACAGTCGAGG | Sigma |

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten. Für PCRs wurden als DNA-Polymerase entweder KOD Hot Start Polymerase oder Q5-Polymerase mit den jeweiligen im Kit enthaltenen Puffern und Reagenzien eingesetzt. Die Primerauswahl wurde entsprechend der Linkerlängen und zu amplifizierenden Nanobodies getroffen. Bei jedem Ansatz wurden 10 ng der Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Die einzelnen Bestandteile, Schritte und Temperaturen sind in **Tab. 3.1.** und **Tab. 3.2.** aufgelistet.

Tab. 3.1.: PCR zur Amplifikation von Nanobodies mit GS-Linker mittels KOD-Polymerase

| | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-----|
| Plasmid DNA (10 ng/ μ l) | 1 μ l | 95 °C | 2' | |
| forward Primer | 2 μ l | 95 °C | 20'' | 10x |
| reverse Primer | 2 μ l | 58 °C | 20'' | |
| dNTPs | 5 μ l | 70 °C | 30'' | |
| KOD-Puffer (10x) | 5 μ l | 95 °C | 20'' | 20x |
| MgSO ₄ | 2 μ l | 70 °C | 50'' | |
| KOD Hot Start Polymerase | 1 μ l | 70 °C | 10' | |
| H ₂ O | <u>32 μl</u> | 4 °C | Pause | |
| | 50 μ l | | | |

Tab. 3.2.: PCR zur Amplifikation von Nanobodies mit GS-Linker mittels Q5-Polymerase

| | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-----|
| Plasmid DNA (10 ng/ μ l) | 1 μ l | 98 °C | 30'' | |
| forward Primer | 2,5 μ l | 98 °C | 10'' | 39x |
| reverse Primer | 2,5 μ l | 60 °C | 20'' | |
| dNTPs | 5 μ l | 72 °C | 30'' | |
| Q5 Reaktionspuffer (5x) | 10 μ l | 72 °C | 2' | |
| Q5 High GC Enhancer (5x) | 10 μ l | 4 °C | Pause | |
| Q5-Polymerase | 0,5 μ l | | | |
| H ₂ O | <u>18,5 μl</u> | | | |
| | 50 μ l | | | |

3.1.2. Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau ist das spezifische Schneiden von doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen, welche an Palindromsequenzen binden und je nach Enzym glatte oder überstehende Enden hinterlassen. Der Verdau von den PCR-Amplifikaten und den Plasmiden erfolgte durch die entsprechenden Restriktionsenzyme. Die geeigneten Puffer wurden mittels Double Digest Finder (NEB) ermittelt. Für die Klonierungen wurden die in **Tab. 3.3.** aufgelisteten Kombinationen aus Restriktionsenzymen verwendet.

Tab. 3.3.: Restriktionsverdau der DNA mit entsprechenden Enzymen

| DNA | Enzym 1 | Enzym 2 | Temperatur | Dauer |
|----------------|---------|---------|------------|-------|
| Nanobody 1 | PciI | BamHI | 37 °C | 5h |
| Nanobody 2 | BamHI | NotI | 37 °C | 5h |
| pCSE2.5-Vektor | NcoI | NotI | 37 °C | 5h |

3.1.3. Dephosphorylierung von Vektoren

Um einer spontanen Religation der durch den Restriktionsverdau linearisierten Plasmid-DNA vorzubeugen, wurde sie mithilfe von antarktischer Phosphatase dephosphoryliert. Bei der Dephosphorylierung wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde mit 1 µl Antarktischer Phosphatase, 3,5 µl Antarktischer Phosphatase Puffer und 2 µg verdauter Plasmid-DNA in 35 µl Reaktionsansatz für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Antarktische Phosphatase wurde anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladungen in Richtung der Anode und wird durch die Polymermatrix der Agarose abgebremst. Das bedeutet, je kürzer der DNA-Strang, desto weiter wandert er im Gel. In dieser Arbeit wurden stets 1 % Agarose in 1x TAE Puffer verwendet und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach kurzem Abkühlen wurden 0,5 µg/ml Roti-GelStain hinzugefügt und das Gel gegossen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit 1x TAE Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit passender Menge 6x Loading Dye versetzt und in die Taschen des Geles pipettiert. Anschließend wurde für 40 min eine Spannung von 120 V angelegt. Mittels eines UV-Transilluminators wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht, für die Dokumentation fotografiert und danach ausgeschnitten.

Die nachfolgende Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Nucleospin Kit gemäß den Herstellerangaben. Allerdings erfolgte die Elution stets in dH₂O anstelle von TE Puffer.

3.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation, das kovalente Verknüpfen von DNA-Fragmenten, fand mittels 1 µl T4-Ligase und 1 µl T4-Ligase Puffer in 10 µl Reaktionsansätzen statt. Es handelte sich stets um eine Drei-Wege-Ligation, dementsprechend wurden zwei Inserts und ein Vektor ligiert. Die Menge der Inserts betrug jeweils 30 ng und die Menge des Vektors 100 ng. Die Ansätze wurden für 16 h bei 16 °C ligiert und die Ligase anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

3.1.6. DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden zwischen 50-150 ng DNA Plasmid-DNA verwendet. 2 µl der entsprechenden Primer wurden zu 15 µl DNA in destilliertem Wasser hinzugefügt. Die Sequenzierung wurde von Eurofins durchgeführt. Mithilfe von 4Peaks von Nucleobytes (Version 1.7.2) wurde die DNA analysiert.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Produktion von Nanobody-Dimeren

Die DNA der einzelnen Nanobodies, welche später als Homo- bzw. Heterodimere geklont und produziert wurden, lagen bereits auf pCSE2.5-Vektoren vor. Bei den Nanobodies handelte es sich um JK2 (FS#833) und JK36 (FS#832). Sie wurden in den Konstellationen JK2-JK2, JK2-JK36, JK36-JK2 und JK36-JK36 mit jeweils einem 15GS-, 25GS- bzw. 35GS-Linker kloniert. Die DNA der Nanobodies wurde mittels PCR amplifiziert. Bei der PCR wurden durch die Auswahl der Primer zu den Nanobodies an erster Stelle noch eine PciI-Schnittstelle und eine GS-Linker-Hälfte inklusive BamHI-Schnittstelle amplifiziert. Beim Nanobody an zweiter Stelle kamen eine BamHI-Schnittstelle plus GS-Linker und eine NotI-Schnittstelle hinzu. Die Amplifikate wurde mittels der Restriktionsenzyme PciI und BamHI bzw. BamHI und NotI geschnitten. Als Zielvektor wurde ein einen His-Myc-Tag beinhaltenden pCSE2.5-Vektor (FS#817) ausgewählt. Dieser Vektor wurde mit NcoI und NotI verdaut und anschließend dephosphoryliert. Der Hexahistidin-Tag, auch His-Tag genannt, besteht aus sechs hintereinander gereihten Histidinen am c-terminalen Ende des Proteins und wird für die spätere Aufreinigung benötigt. Vektor und entsprechende Inserts wurden in einer Drei-Wege-Ligation ligiert. Mit den entstandenen Ligationsansätzen wurden XL-1 Blue bzw. XL-10 Gold *E. coli* transformiert. Nach erfolgreicher Transformation wurden einige Klone der Bakterien gepickt, kultiviert und eine Minipräparation angefertigt. Danach wurde die DNA sequenziert. Entsprach sie der korrekten Sequenz, wurde eine Retransformation, gefolgt von einer Maxipräparation, durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde erneut sequenziert und für die Transfektion von HEK293-6E-Zellen benutzt. Eine Woche nach der Transfektion wurde der Zellüberstand geerntet und steril filtriert. Anschließend wurden die Nanobody-Dimere über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Eluiert wurde in Imidazolpuffer, welcher allerdings toxisch ist. Die Umpufferung der Proteine fand mittels PD-10 Säulen in PBS +/- statt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über BCA Kit nach Herstellerangaben.

3.2.2. Aufreinigung von Nanobody-Dimeren

Die nach 7 Tagen geernteten Zellüberstände der HEK-6E-Zellen wurden mittels einer Nickel-NTA-Säulen (Nitrilotriessigsäure) aufgereinigt. In diesen Säulen befinden sich Nickel-Ionen, die über NTA an Agarose Beads gebunden sind. Da die aufzureinigenden Proteine ein c-terminales His-Tag besitzen, können die basischen Imidazolringe von je zwei Histidinen des His-Tags an die Ni²⁺-Ionen binden. Vorerst wurden die Säulen mit Nickel-NTA 2 ml befüllt und mit 10 ml PBS -/- gewaschen. Anschließend wurden 30 ml der HEK-Zellüberstände auf die Säulen gegeben und erneut gewaschen. Eluiert wurde per Imidazolgradient mit 250 mM Imidazol in PBS -/-. Die Säulen wurden mit Lagerungspuffer (PBS -/- + 20% Ethanol) befüllt und bei 4 °C gelagert. Aufgrund der Zytotoxizität von Imidazol wurden die Proteine nach der Elution über PD-10-Säulen in PBS +/- umgepuffert. Die Konzentrierung der Eluate geschah per Zentrifugation (Rotanta 460 R, Hettich) bei 4000 rpm für 10 min in einem Amicon Ultra 10000 MWCO. Die aufgereinigten Antikörper wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.3. SDS-PAGE

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Auftrennung von Proteinen proportional zu ihrem Molekulargewicht. SDS steht für Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*). Es handelt sich hierbei um ein anionisches Tensid, welches sich an die Aminosäuren der Proteine anlagert, wodurch die einzelnen negativen Ladungen der SDS-Moleküle sich voneinander abstoßen und so die Denaturierung der Proteine fördern. Ergänzend zum Verlust der Tertiär- bzw. Sekundärstruktur überlagern die negativen Ladungen des SDS die Eigenladung des Proteins, so dass nunmehr die Wanderung durch das Gel nicht von elektrischer Ladung, sondern nur vom Molekulargewicht abhängt. Durch Zugabe von Dithiothreitol, einem Reduktionsmittel, können Disulfidbrücken aufgetrennt werden. Den Proben wurde eine entsprechende Menge 4x LDS Sample Buffer und 10 % Reduktionsmittel hinzugefügt, wonach sie für 10 min auf 70 °C erhitzt wurden. Dies fördert die Denaturierung. Danach wurden sie für eine Minute bei 13.000 rpm (5424, Eppendorf) zentrifugiert. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit 1x MES Puffer aufgefüllt und die Proben in die Taschen des Geles pipettiert. Durch das

Anlegen einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 110 mA für 35 min wandern die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts durch die Poren des Polyacrylamidgeles. Für diese Arbeit wurden 12%ige SDS-Gele der Firma Invitrogen mit 12 oder 10 Taschen verwendet.

3.2.4. Coomassie-Färbung

Um die Protein-Banden nach der SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurden die Gele mittels einer Coomassie-Färbung (Instant Blue, Expedeon) über Nacht gefärbt. Um den Blaustich des Hintergrundes zu minimieren, wurden die Gele anschließend über mehrere Stunden mit Aktivkohlebeuteln in Wasser entfärbt. Die Trocknung der Gele erfolgte, indem sie für einige Minuten in Drying Solution inkubiert und danach in Cellulosefolien über Nacht aufgespannt wurden. Nach dem Trocknungsvorgang wurden die Gele zur Dokumentation eingescannt.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur

Alle Zellkulturzellen wurden in ihrem adäquaten Medium bei 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 37 °C gelagert. Jegliche Behandlung der Zellen wurde steril an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Medien und Reagenzien wurden zuvor steril durch ein Vakuum-Filtrationssystem filtriert. Verwendete Materialien wurden vorher bei 121 °C autoklaviert. Sämtliche Zelllinien, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind in **2.9.** aufgeführt.

Tumorzelllinien wurden in RPMI-Komplettmedium, HEK293-6E-Zellen in Freestyle-Medium und NK-92-Zellen ^{huCD16 CD38 KO} in α -MEM-Medium kultiviert. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich je nach Zustand und Dichte der Zellkultur 1:1 bis 1:5 geteilt. Luciferase-transduzierte Zelllinien wurden aufgrund einer als Selektionsmarker verwendeten Puromycin-Resistenz zusätzlich mit 10 μ g Puromycin behandelt.

3.3.2. Zellzahlen

Die Bestimmung von Zellzahlen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, indem 10 μ l Zellgemisch auf die Kammer pipettiert wurden. Die Gesamtzahl wurde durch Multiplikation mit dem Gesamtvolumen ermittelt.

3.3.3. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente XL-10 Gold und XL-1 Blue *Escherichia coli* verwendet. 50 μ l Bakterien wurden mit 2 μ l Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C, wonach die Bakterien erneut 2 min auf Eis inkubierten. Nach Zugabe von 450 μ l auf 42 °C vorgewärmten SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Es wurden jeweils 20 μ l und 100 μ l eines Ansatzes auf LB-Carb-Agar ausplattiert.

3.3.4. Kultivierung der Bakterien und DNA-Aufreinigung

Nachdem auf dem LB-Carb-Agar über Nacht bei 37 °C Bakterienkolonien gewachsen sind, wurden Klone gepickt. Je nachdem, wie viele Klone auf der Religationsplatte vorhanden waren, wurden 2 bis 5 Klone gepickt und in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin angeimpft. Für die Kultivierung zwecks einer anschließenden DNA-Sequenzierung statt, wurden 5 ml Medium verwendet. Für die Produktion größerer Mengen DNA wurden 100 ml Medium verwendet. Die Bakterienkulturen inkubierten dann über Nacht bei 220 rpm und 37 °C.

Kleinere Mengen DNA wurden mittels Minipräparationskit den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt und größere Mengen mittels Maxipräparationskit.

3.3.5. Transfektion von HEK293-6E-Zellen

Alle Transfektionen dieser Arbeit wurden in HEK293-6E-Zellen mittels JetPEI (Polyplus) durchgeführt. Zweck der Transfektion war die Produktion von Nanobody-Dimeren. Bei PEI handelt sich dabei um ein lineares Polyethylenimin, welches sich aufgrund seiner positiven Ladung an die negativ geladene Plasmid-DNA anlagert und somit eine Salzhülle bildet. Diese Hülle verhindert die Abstoßung von ebenfalls negativ geladener Zellmembran und DNA und ermöglicht auf diese Weise die Endozytose letzterer. Für die Transfektion in T175 Flaschen von 30 ml HEK293-6E-Zellen, was zwischen 2×10^7 und 4×10^7 Zellen entspricht, wurden 20 µg Plasmid-DNA verwendet. Bei der DNA handelte es sich in allen Fällen um pCSE.2.5 V_HH+His+c-Myc Expressionsvektoren. Das Verfahren erfolgte laut Herstellerangaben. 24 h nach erfolgter Transfektion wurde den Zellen 84 µl Freestyle Feeding Medium hinzugefügt. Der Zellüberstand wurde nach 7 d abgenommen, bei 4000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert und mittels eines Vakuum-Filtrationssystems steril filtriert.

3.4. Immunologische Methoden

3.4.1. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ist ein Analyseverfahren, mit welchem die Expression spezifischer Proteine sowie anderer Bestandteile einer Zelle nachgewiesen werden können. Dies funktioniert für gewöhnlich, indem die Strukturen mithilfe eines Fluorochrom-konjugierten Antikörpers markiert werden. Eine Zellsuspension mit gefärbten Zellen wird im Durchflusszytometer durch eine Küvette gesaugt und mit mehreren Lasern unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt. Das emittierte Licht der Fluorochrome wird über Teilerspiegel und durch Bandbreitenfilter weitergeleitet, bis es im entsprechenden Detektor gemessen werden kann. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, die Expression vieler unterschiedlicher Strukturen einer Zelle gleichzeitig zu analysieren.

Extrazelluläre Färbungen dieser Arbeit wurden entweder direkt mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper oder über einen Biotin-konjugierten Primärantikörper und einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. Als intrazelluläres Live/Dead-Staining wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, welches bei toten Zellen durch die Zellmembran eindringen kann und in die DNA interkaliert. Proben wurden mit 1 µl Fluoreszenzantikörper für 30 min bei RT oder 4 °C inkubiert. Danach erfolgte eine zweifache Waschung durch Zentrifugation (Rotanta 460 R, Hettich) bei 1600 rpm für 5 min und 4 °C, Abklopfen der Probe und Resuspension in 200 µl PBS + 0,2 % BSA. Bei Primär- und Sekundärantikörpern wurde ebenso verfahren. PI-Anfärbungen wurden nach der letzten Waschung im Verhältnis 1:500 durchgeführt. Die verwendeten Durchflusszytometer waren FACS Canto II und FACS Celesta. Ausgewertet wurden die Versuche mit FlowJo (Version 10.4).

3.4.2. Affinitäts-Assays

Zur Überprüfung der Affinität von Antikörpern zu ihrem Zielantigen wurden diese in einer Titrationsreihe mit 1×10^5 CA46-Zellen in 100 μ l PBS + 0,2 % BSA inkubiert. Nach einer halbstündigen Inkubation wurden überschüssige Antikörper durch zweifache Zentrifugation und Resuspension entfernt. Es wurde 1 μ l anti-c-Myc-Antikörper (AlexaFluor647) hinzugegeben und wiederum 30 min inkubiert. Nach erneuter zweimaliger Waschung wurden die Zellen in Durchflusszytometer analysiert.

3.4.3. Nachweis von Antikörpern im Serum

Sämtliche NiS-Dimere besitzen ein sogenanntes His-Tag und ein Myc-Tag am c-Terminus. Es besteht die Möglichkeit, dass Serumspender durch direkten Kontakt zu His- oder Myc-getaggten Proteinen gegenüber diesen Tags immunisiert wurden. Um dies auszuschließen, wurden 1×10^6 CD38-transduzierte HEK293-6E-Zellen in 200 μ l PBS + 0,2 % BSA für 30 min bei Raumtemperatur mit 100 nM NiS-Dimeren, einem Kontrollantikörper oder Daratumumab inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben zweimal gewaschen: Zentrifugation bei 1600 rpm (Rotanta 460 R, Hettich) für 5 Minuten, Ausschütten der FACS Tubes und Resuspendieren der Zellen in 200 μ l PBS + 0,2% BSA. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Proben mit NiS-Dimeren und denen des Kontrollantikörpers mit 15 % humanem Serum von gesunden Spendern. Um keine komplementabhängige Lyse der mit Daratumumab inkubierten Zellen hervorzurufen, wurde dieser Probe kein humanes Serum hinzugefügt. Alle Proben wurden dann wie oben beschrieben zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Proben zum Nachweis von gebundenem IgG mit einem anti-hulG1-Antikörper (PE) angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.4.4. CDC-Assays

Die komplementabhängige Zytotoxizität von Antikörpern, welche durch den klassischen Weg des Komplementsystems vermittelt wird, wurde in dieser Arbeit an den Zelllinien CA46, CA46 luc und Daudi luc getestet. Das verwendete Serum wurde mittels Serumröhrchen gesunden Spendern nach vorherigem Einvernehmen entnommen.. Zur Gerinnung wurde es 30 min bei RT stehen lassen. Es folgte die Zentrifugation (Rotanta 460 R, Hettich) bei 1600 rpm für 10 min bei 4°C und das Abpipettieren des Serums. Mittels CDC-Assay wurde das Komplementsystem auf seine Funktionalität überprüft und darauf, ob sich präexistierende Antikörper gegen die Zellkulturzellen im Serum befanden. Dies würde sich durch eine Zytolyse der Zellen ohne Zugabe von zusätzlichen Antikörpern präsentieren. Das Serum wurde bei -20 °C gelagert.

Für den CDC-Assay wurden die Zellen aus Kulturschalen geerntet und bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden sie auf 1×10^5 - 5×10^5 Zellen pro 100 μ l PBS + 0,2 % BSA mittels Neubauer-Zählkammer eingestellt. Durchgeführt wurden alle Assays auf 96-Well-Mikrotiterplatten mit U-Boden. In 70 μ l PBS + 0,2 % BSA wurden 100 nM Antikörper (angepasst auf das finale Gesamtvolumen von 200 μ l) vorgelegt bzw. bei Antikörperkombinationen 50 nM + 50 nM. Nachfolgend wurden 100 μ l Zellen hinzugefügt und 5 Minuten inkubiert. 30 μ l natives oder hitzeinaktiviertes humanes Serum, 15 % des Gesamtvolumens entsprechend, wurden den Proben zugegeben, die Platten mit Parafilm verschlossen und im Wasserbad für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Serums erfolgte durch 30-minütige Erhitzung auf 56 °C. Dadurch denaturieren unter anderm die Proteine des Komplementsystems und werden so inaktiviert. Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal gewaschen: Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 Minuten, Abklopfen der Mikrotiterplatte und Resuspendieren der Zellen in 200 μ l PBS + 0,2% BSA. Als live/dead staining wurde 2 μ l PI hinzupipettiert und die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

3.4.5. ADCC-Assays

Unterschiedliche Zelltypen können an der ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) beteiligt sein, in den ADCC-Assays dieser Arbeit wurden NK-Zellen verwendet. Die Bindung des Fc γ -Rezeptors IIIa an die Fc-Region eines Antikörpers löst in NK-Zellen die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen aus, welche Poren in der Zellmembran des Targets bilden und ihren Zelluntergang induzieren. In dieser Arbeit wurden als Effektorzellen huCD16-transduzierte CD38 KO NK-92-Zellen und CA46 luc und Daudi luc als Tumorzellen verwendet. Die Zellen wurden nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden Effektor- und Targetzellen auf $2,5 \times 10^5$ bzw. 1×10^5 pro 100 μ l RPMI-Komplettmedium eingestellt. In einer 96-Well-Platte mit U-Boden wurde in 67 μ l RPMI-Komplett-medium die beschriebene Menge Antikörper angepasst auf das finale Volumen von 200 μ l vorgelegt. Anschließend wurden 33 μ l Targetzellen hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden 100 μ l huCD16-transduzierte CD38 KO NK-92-Zellen beigefügt. Somit ergibt sich eine Effektor-Target-Ratio (E:T) von 3:1. Die Proben wurden für 3,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie wie oben beschrieben zentrifugiert, die Mikrotiterplatte ausgeschüttet und die Proben in 200 μ l PBS + 0,2% BSA resuspendiert. Der Vorgang wurde wiederholt und die Proben in 100 μ l PBS + 0,2% BSA resuspendiert. Den Ansätzen wurde 100 μ l Luciferin Working Solution (150 μ g/ml Luciferin in PBS) hinzugefügt, worauf eine 20-minütige lichtgeschützte Inkubation bei RT folgte. Die Proben wurden per VICTOR-Biolumineszenzmessung ausgewertet.

3.5. Tierversuche

3.5.1. Tumor-Xenograft-Modell

In dieser Arbeit wurde ein Maus-Tumor-Xenograft-Modell mit humanen CA46-luc-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um CD38⁺ Luciferase-transduzierte Burkitt-Lymphom-Zellen. Zweck dieses Versuchs war es, einen Behandlungsversuch mit möglichst langem Überleben zu erzielen. Der verwendete Mausstamm war CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcr1coCrl (Charles River). Diese Tieren haben ein SCID (*severe combined immunodeficiency*), wobei es sich um einen Immundefekt handelt, durch den ein schwerer Mangel an T- und B-Zellen hervorgerufen wird. Teile des angeborenen Immunsystems sind nicht beeinträchtigt. Diese Konstellation macht die Mäuse geeignet für eine Xenotransplantation von menschlichen Tumorzellen, die somit nicht abgestoßen werden. Zu Versuchsbeginn waren die ausschließlich weiblichen Mäuse 11 Wochen alt. Es erfolgte eine i.v. Injektion in die Schwanzvene von 4×10^6 CA46-luc-Zellen, gelöst in 200 μ l 0,9 %iger Natriumchloridlösung. Eine Woche später erfolgte die Kontrolle des Xenografts mittels IVIS-Biolumineszenzmessung. Die Mäuse wurden entsprechend der BLI (Biolumineszenzintensität) in 10 Gruppen eingeteilt. Gruppen, die mit einem einzelnen hcAb oder einem Kontrollantikörper behandelt wurden, enthielten 7 Mäuse, diejenigen, die mit einer Kombination aus Daratumumab und hcAb behandelt wurden, enthielten 5 Mäuse. Behandelt wurden die Mäuse einmal wöchentlich mit 50 μ g hcAb oder Kontrollantikörper bzw. 100 μ g Daratumumab. Dies liegt an dem beinahe doppelten Molekulargewicht eines konventionellen Antikörpers gegenüber einem Schwereketten-Antikörper. Die Kombinationstherapie wurde mit 25 μ g hcAb plus 70 μ g Daratumumab durchgeführt. Gelöst wurden die Antikörper in 200 μ l PBS. Die Injektion der Antikörper erfolgte stets i.p., wobei eine 1 ml Spritze für maximal 5 Tiere verwendet wurde. Kontrollen über den Zustand der Mäuse erfolgten dreimal wöchentlich. Beurteilt wurde nach Gewicht, Verhalten und Aussehen mittels eines objektiven Scoring-Systems. Bei Erreichen eines bestimmten Scores wurde die entsprechende Maus per cervikaler Dislokation getötet. Die Mäuse wurden mit maximal 5 Tieren pro Käfig in IVC-Käfigen (*individually ventilated cage*) gehalten. Der primäre Endpunkt des Versuchs wurde vor Beginn auf 150 Tage festgelegt.

3.5.2. IVIS-Biolumineszenzmessungen

Zur Beurteilung der Tumorgröße und Verteilung wurde sich die Luciferaseaktivität der CA46-luc-Zellen zunutze gemacht. Einmal pro Woche wurden die Tiere mittels inhalativer Isoflurannarkose betäubt. Anschließend erhielten sie eine i.p. Injektion von 6 mg Luciferin in 200 µl PBS. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Mäuse in Sets von jeweils fünf per IVIS-Biolumineszenzmessung in Rückenlage fotografiert. Die Aufnahmen wurden in 4 unterschiedlichen Belichtungs- und Blendeneinstellungen vorgenommen (**Tab. 3.4.**). Die Auswertungen der Bilder wurden mit Living Image (Version 4.5.2) durchgeführt.

Tab. 3.4.: Kameraeinstellungen bei IVIS-Biolumineszenzmessung

| Setting | Belichtungszeit | Binning | Blendenzahl | Bildfenster |
|---------|-----------------|---------|-------------|-------------|
| 1 | auto | 8 | 1 | C |
| 2 | 60'' | 1 | 8 | C |
| 3 | 40'' | 4 | 2 | C |
| 4 | 30'' | 2 | 4 | C |

3.5.3. Ex-vivo-Organanalysen

Von einigen Mäusen, die laut dem Scoring-System aus dem Überlebensversuch ausschieden, wurden Ex-vivo-Organanalysen durchgeführt. Nachdem betroffene Tiere mittels Isofluran betäubt wurden, erfolgte eine i.p. Injektion von 6 mg Luciferin, gelöst in 200 µl PBS -/-. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die cervikale Dislokation. Danach wurden sämtliche Bauch- und Thoraxorgane, sowie das Gehirn der Maus präpariert und auf einer schwarzen Unterlage neben dem eröffneten Kopf und Körper für Biolumineszenzaufnahmen positioniert. Die Aufnahmen wurden ebenfalls per IVIS durchgeführt. Organe, welche ein Biolumineszenzsignal aufwiesen, sprich tumorbefallene Organe, wurden in mit 10 ml PBS + 0,2 % BSA gefüllten Gentlemacs Tubes deponiert und anschließend in den Tubes mit dem hoher Umdrehungszahl im Gentlemacs homogenisiert. Zur weiteren Homogenisierung wurden sie durch ein 70 µm Zellsieb gepresst. Es erfolgte eine dreiminütige Erythrozytenlyse mittels Erythrozytenlysepuffer, welcher nach der Zeit durch Zugabe von 10 ml PBS + 0,2 % BSA inaktiviert wurde. Die Zellen wurden per Neubauer-

Zählkammer auf 1×10^6 Zellen pro 100 μ l PBS + 0,2 % BSA eingestellt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit dem Antikörper, mit welchem die Maus behandelt wurde, inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und die Ansätze mit gegen hulgG1 und CD38 angefärbt, wobei darauf geachtet werden musste, dass sich die Epitope des anti-CD38-Behandlungsantikörpers und des anti-CD38-Fluorochromantikörpers nicht überlappen. Die Auswertung erfolgte im Durchflusszytometer.

4. Ergebnisse

4.1. Effektivität von CD38-spezifischen hcAbs in vitro und in vivo

In der Tumorthherapie ist die Hemmung des Wachstums oder die Eradikation von malignen Zellen ein entscheidender Parameter der Effektivität eines Antikörpers. Die zu untersuchenden CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörper, bestehend aus der V_HH-Domäne eines Lama-Schwere-Ketten-Antikörpers und einem humanen Fc-Fragment, wurden in den im folgenden Teil vorgestellten Versuchen einzeln und in Kombination mit Daratumumab eingesetzt. Die als Target dienende Burkitt-Lymphom-Zelllinie CA46 luc zeichnet sich durch eine hohe Expression von CD38 auf der Zelloberfläche aus. Hinzu kam, dass die Zellen mit GFP und Luciferase transduziert waren. Es wurden drei Nanobodies untersucht, die sich in ihrer Bindungsstelle am CD38-Molekül unterscheiden. Jeder von ihnen besitzt ein distinktes Epitop am Ektoenzym. WF211 bindet ebenso wie Daratumumab an Epitop e1, JK2 bindet an Epitop e2 und *MU1105* bindet an Epitop e3. Diese drei Nanobodies wurden als hcAb mit normaler Fc-Region eingesetzt. Überdies kamen zwei hcAbs zum Einsatz, welche einen mutierten Fc-Teil besaßen. Diese wurden bereits in der Einleitung beschrieben und mit WF211 +/+ sowie WF211 -/- bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde mit L-15 hcAb ein Nanobody-hcAb ausgewählt, der an CD_{Ta} bindet, wobei es sich um ein Toxin des Bakteriums *Clostridium difficile* handelt. Als Positivkontrolle wurde der vollständig humane, monoklonale CD38-spezifische Antikörper Daratumumab als therapeutischer und diagnostischer Standard verwendet. In dieser Arbeit wird daher verglichen, ob hcAbs eine mögliche therapeutische Alternative bieten. Im Folgenden soll die Funktionalität der Antikörper getestet werden, CDC und ADCC in Lymphomzellen auszulösen und das Tumorwachstum der gleichen Zellen in einem Mäusen-implantierten Xenograft zu begrenzen.

Die folgenden Versuche (4.1.1. und 4.1.2.) wurden in Kooperation mit Levin Schriewer durchgeführt.

4.1.1. CD38-spezifische Antikörper induzieren ADCC

Die Vermittlung von antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität spielt eine wichtige Rolle in der Wirkung eines Antikörpers. Diese kann in vivo durch Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen verursacht werden. Für die In-vitro-Experimente wurden huCD16-transduzierte CD38 KO NK-92-Zellen verwendet. Zellkultur-NK-92-Zellen exprimieren standardmäßig kein CD16a (FcγRIIIa) auf ihrer Zelloberfläche, was sie als Effektorzellen dieses Versuches nutzlos gemacht hätte, sodass sie keinen ADCC auslösen könnten. Daher wurden sie in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe via Lentiviren mit dem CD16a-Gen transduziert. Da NK-Zellen CD38 exprimieren, würden die im Versuch angewendeten CD38-spezifischen Antikörper ebenfalls an sie binden. Um also die gegenseitige Lyse der Zellen zu verhindern, wurde mittels CRISPR/Cas der CD38-kodierende Genlocus ausgeknockt. Dies wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Fehse durchgeführt. Wie im CDC-Assay wurden CA46-luc-Zellen als Targetzellen verwendet. $2,5 \times 10^5$ wurden mit 100 nM bzw. 50 nM + 50 nM Antikörper in RPMI-Komplettmedium inkubiert. Nach der Zugabe von den $7,5 \times 10^5$ NK-92-Zellen huCD16 CD38 KO erfolgte eine Inkubation für 3,5 h bei 37 °C. Die Effektor-Target-Ratio betrug 3:1.

Für die Analyse eines ADCC-Assays wird häufig die Messung der Freisetzung von Chromisotopen aus lysierten Tumorzellen verwendet, die vorher mit den Isotopen inkubiert wurden (Nelson et al., 2001). Aufgrund der Luciferaseaktivität war es jedoch möglich, die Viabilität der CA46-luc-Zellen per Biolumineszenzmessung zu analysieren. Luciferase katalysiert die Reaktion von D-Luciferin in Oxiluciferin, wobei ATP benötigt wird. Bei dieser Reaktion wird außerdem ein Photon emittiert, was in der BLI-Messung wahrgenommen wird. Auf die Perforinausschüttung der aktivierten NK-Zellen nach FcγRIIIa-Bindung folgt die Permeabilisierung der Tumorzellmembran, was einen ATP-Ausstrom zur Folge hat. Steht dieses nach dem Zelltod nicht mehr zur Verfügung, lässt die Luciferaseaktivität nach.

Die einzelnen hcAbs erwiesen sich, bis auf WF211 -/- hcAb, als potente Induktoren der ADCC (**Abb. 4.1.**). Die Ansätze mit WF211 -/- hcAb hatten ein ebenso starkes Biolumineszenzsignal abgegeben wie der Kontrollantikörper, also unterlagen sie keiner nennenswerten ADCC. Die stärkste Zytotoxizität konnte WF211 hcAb mit unverändertem Fc-Fragment auslösen. Die WF211 +/- hcAb Variante mit der Mutation in der CH2-Domäne, die eigentlich eine Verbesserung der FcγRIII-Bindung

hervorrufen sollte, war weniger effektiv als WF211 mit normaler Fc-Region. Es ließ sich beobachten, dass die Kombination aus Daratumumab und WF211 hcAb etwa die gleiche Zytolyserate wie Daratumumab allein besaß. Hervorstechend erschien, dass Daratumumab und JK2 hcAb als Monotherapie eine wirkungsvolle Zellyse verursachten, die Kombinationstherapie aus beiden jedoch wesentlich mehr lebendige Zellen hinterließ. Auch bei *MU1105* ließ sich in Kombination mit Daratumumab kein Vorteil feststellen, jedoch kam es hierbei nicht zu einer Verschlechterung der Effektivität.

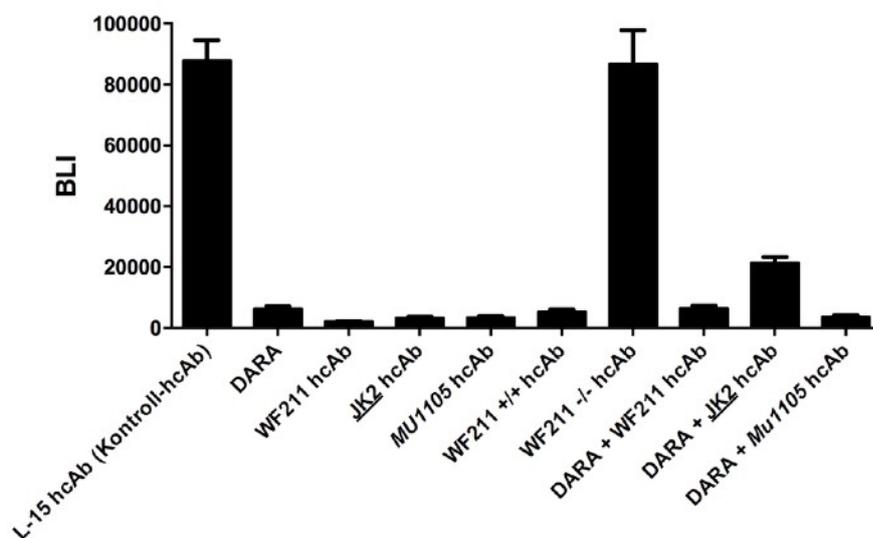


Abb. 4.1.: ADCC-Effekt von CD38-spezifischen hcAbs und Daratumumab an CA46-luc-Zellen. Es ließ sich eine starke Zytolyse in allen Ansätzen von hcAbs mit nativem Fc-Teil, „verbessertem“ Fc-Teil und Daratumumab nachweisen. WF211 +/- verursachte keinen ADCC-Effekt. Kombinationen aus Daratumumab mit hcAb waren der Monotherapie nicht überlegen. In einer lichtundurchlässigen Mikrotiterplatte wurden zu $2,5 \times 10^5$ CA46-luc-Zellen in RPMI-Komplettmedium 100 nM Antikörper oder bei Kombinationen aus Daratumumab und hcAb 50 nM + 50 nM Antikörper hinzugefügt. Die Zellen wurden mit $7,5 \times 10^5$ CD16-transduzierten CD38 KO NK-92-Zellen in RPMI-Komplettmedium für 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach zweifacher Waschung wurden die Zellen für 20 min in Luciferin Working Solution (150 µg/ml Luciferin in PBS) inkubiert und anschließend mittels Biolumineszenzmessung im Mikrotiterplattenleser vermessen. Der Versuch wurde in dreifachen Ansätzen durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

4.1.2. Kombinationen CD38-spezifischer Antikörper und Daratumumab lösen potente CDC aus

Die komplementabhängige Zytolyse einer Zelle, kann nach Bindung von Antikörpern an eine Zelle durch Aktivierung des klassischen Wegs des Komplementsystems induziert werden. 5×10^5 CA46-luc-Zellen wurden 100 nM eines Antikörpers bzw. 50 nM + 50 nM Antikörper bei Kombinationsansätzen aus Daratumumab und hcAb hinzugefügt. Zusätzlich wurde zu den Zellen 15 % humanes, natives Serum bzw. hitze-inaktiviertes Serum gegeben und sie für 1 h bei 37 °C inkubiert. Ausgewertet wurde die Effektivität der CDC im Durchflusszytometer mittels Propidiumiodid als Live/Dead-Staining, wobei eine starke intrazelluläre Konzentration dieses Farbstoffes hierbei für eine hohe Zelllyse sprach. Darüber hinaus verloren die toten Zellen ihr GFP-Signal.

Durch die Behandlung mit inaktiviertem Serum ergab sich bei keinem der Ansätze eine Zytolyse. Auch nach Inkubation mit aktivem Serum waren als Monotherapie alle hcAbs mit unmodifiziertem Fc-Fragment sowie WF211 +/- hcAb nicht in der Lage, eine CDC auszulösen. Dahingegen ergab sich durch die Inkubation mit aktivem Serum und dem konventionellen Antikörper Daratumumab eine schwache Zytolyse von circa 18 %. Auffällig war das Resultat in den Ansätzen von Daratumumab und einem hcAb, der nicht an sein Epitop e1 band, das bedeutet *MU1105* hcAb und *JK2* hcAb. Dadurch erhöhte sich der Zelltod auf beinahe 100 %. In **Abb. 4.2.A** sind exemplarisch die FACS-Plots von *JK2* hcAb und Daratumumab sowie die Koinkubation aus beiden aufgeführt. Dort wird der Shift von lebendigen, GFP exprimierenden Zellen in den Einzelansätzen hin zu lysierten, GFP-negativen Zellen im Kombinationsansatz deutlich. Im Gegensatz dazu hatte Daratumumab kombiniert mit WF211 hcAb, der ebenfalls an Epitop e1 bindet, keinen Effekt auf die Zellen. Das heißt, die Koinkubation von beiden hat den Effekt, den Daratumumab allein auf die Zellen hatte, sogar noch reduziert. Als einziges Monoagens konnte die Mutante WF211 +/- hcAb eine fast vollständige Zytolyse in den CA46-luc-Zellen hervorrufen. In **Abb. 4.2.B** sind die Lyseraten, die jeder Antikörper ausgelöst hat, in einem Balkendiagramm dargestellt.

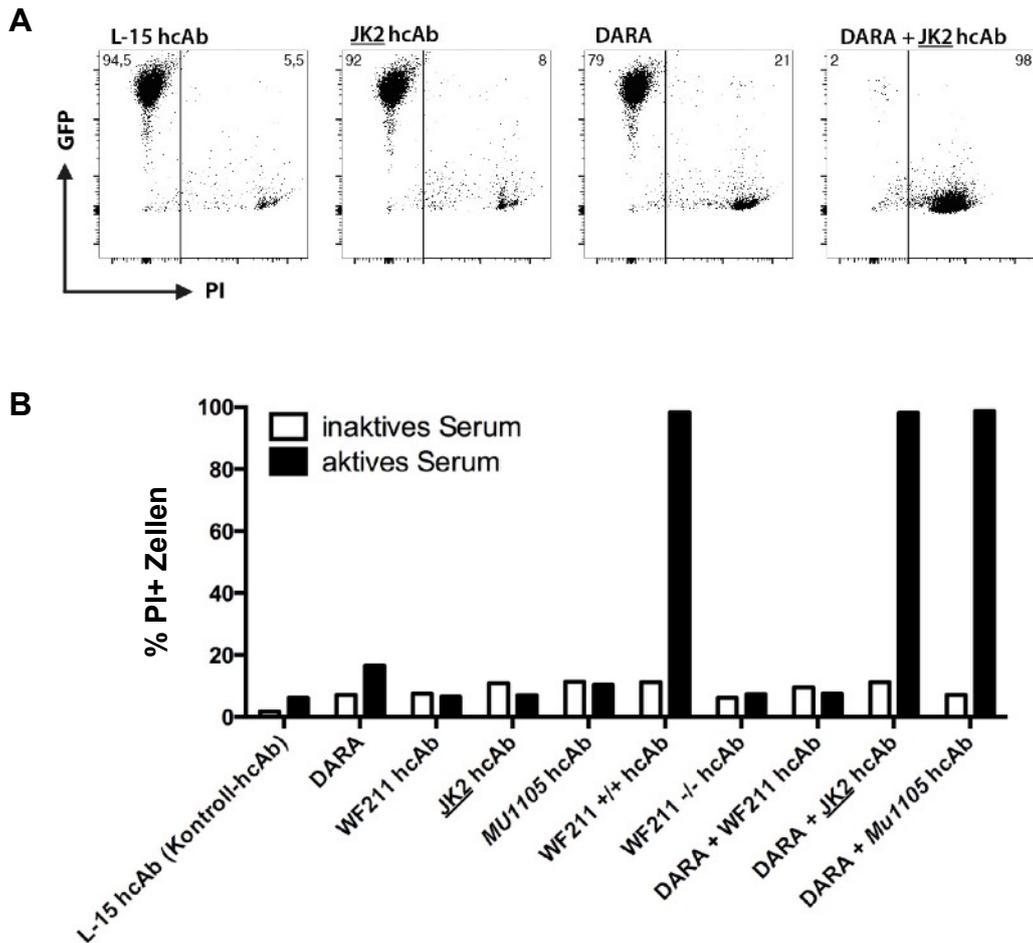


Abb. 4.2.: CDC-Effekt von CD38-spezifischen hcAbs und Daratumumab an CA46-luc-Zellen. (A) FACS Plots ausgewählter CDC-Ansätze von Daratumumab (e1), JK2 hcAb (e2) oder Kombination beider, zeigen eine ausgeprägte CDC-Aktivität bei der Kombination von beiden Antikörpern. (B) Graphische Auftragung der Messwerte aller CDC Ansätze mit aktivem und hitzeinaktiviertem Serum im Balkendiagramm. 5×10^5 CA46-luc-Zellen wurden mit 100 nM Antikörper oder bei Kombinationen aus Daratumumab und hcAb mit 50 nM + 50 nM Antikörper und 15 % humanem, aktivem oder hitzeinaktiviertem Serum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach zweifacher Waschung wurde den Proben PI (Propidiumiodid) im Verhältnis 1:500 hinzugegeben und sie im Durchflusszytometer vermessen. Die Zahlen in den oberen Ecken der FACS-Plots (A) geben die prozentuale Verteilung der Zellpopulation an. Der Versuch wurde in zweifachen Ansätzen durchgeführt, wobei die Balken jeweils den Mittelwert angeben. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

4.1.3. Maus-Tumor-Xenograft CD38⁺ Burkitt-Lymphom-Zellen

Nach der Überprüfung der Effizienz der CD38-spezifischen hcAbs in CDC- und ADCC-Assays wurde ein Maus-Tumor-Xenograft-Modell mit CA46-luc-Zellen durchgeführt. Der Fokus dieses Experiments lag vor allem auf dem Überleben der Mäuse und dem Tumorwachstum. Die verwendeten CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcr/coCrl-Mäuse zeichneten sich durch einen schweren Immundefekt (SCID) des adaptiven Immunsystems aus, besaßen jedoch normale Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen. Durch diese Symptomkonstellation war es möglich, den Mäusen menschliche Tumorzellen zu injizieren ohne, dass es zu einer Abstoßung jener kam. Den 11 Wochen alten Mäusen wurden 4×10^6 CA46-luc-Zellen in die Schwanzvene injiziert. Durch die Injektion in die venöse Blutbahn gelangten die Tumorzellen zunächst zum Herzen der Maus und verbreiteten sich von da aus weiter im Körper. Die Zellen zeichneten sich durch gutes Anwachsen aus, denn von 70 Tieren verblieben nur 5 ohne Tumor. Diese Tiere schieden dadurch aus dem Versuch aus. 6 Tage post injectionem wurden die Mäuse mittels IVIS-Biolumineszenzmessung untersucht und gleichmäßig in Gruppen nach ihrer BLI eingeteilt. IVIS-Biolumineszenzmessungen wurden wöchentlich bis Tag 49 durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse volatil narkotisiert und ihnen danach die Luciferinlösung i.p. injiziert. Sie wurden in Sets von 5 Mäusen fotografiert, wonach sie eine weitere i.p. Injektion ihres jeweiligen Antikörpers bzw. ihrer jeweiligen Antikörperkombination erhielten. Es wurden insgesamt 8 Messungen und 7 Behandlungen durchgeführt, wobei die erste Messung der Gruppeneinteilung diene.

4.1.3.1. Behandlung von Mäusen mit CD38-spezifischen Antikörpern hemmt Tumorwachstum

Die BLI, die über dem Körper einer Maus gemessen werden konnte, korrespondierte mit Tumorgöße der CA46-luc-Zellen. Die Biolumineszenzkurven in **Abb. 4.4.A** und **Abb. 4.4.B** beschreiben alle einen Aufwärtstrend, was bedeutet, dass trotz aller Behandlungen das Tumorwachstum nur gebremst, jedoch nicht gestoppt werden konnte. Zu beachten ist, dass die BLI in logarithmischer Form aufgetragen wurde. Das bedeutet, dass das Tumorwachstum nicht zunächst stark anstieg und danach in eine Plateauphase überging, sondern die absolute Tumormasse über die gesamte Zeit hinweg zunahm. In **Abb. 4.3.** erschien bei der ersten Messung an Tag 7 das

Biolumineszenzsignal stärker zu sein, als an den darauffolgenden Messungen, was daran lag, dass die Sensitivität auf den Bildern dieser Messung erhöht wurde, um den Tumor besser abzubilden. Die Gruppe, welche mit dem Kontrollantikörper behandelt wurde, zeigte ein deutlich stärkeres Biolumineszenzsignal als Mäuse der anderen Gruppen und den gravierendsten initialen Anstieg. Bereits zu frühen Messzeitpunkten zeichneten sich eindeutig betroffene Organe auf dem Körper der Tiere ab. Dazu zählten unter anderem die axillären und inguinalen Lymphknoten sowie der Kopf und die Milz (**Abb. 4.3.**). Zu den letzten beiden Zeitpunkten schienen die Tiere aufgrund des starken Signals beinahe gänzlich zu „leuchten“. Zwischen den letzten beiden Messungen an Tag 42 und Tag 49 wurden außerdem 6 der 7 Kontrollmäuse aus dem Versuch genommen, weshalb auf den letzten Punkt der Kontrollgruppe im Graphen verzichtet wurde. Anders als bei den vorangegangenen In-vitro-Versuchen zeichneten sich die Fc-Mutationsvarianten von WF211 durch ebenfalls relativ starkes Tumorwachstum aus und unterschieden sich wenig in ihrer Effektivität. Auch bei ihnen wurden früh die Lymphknoten sowie die Milz als starkes Signal sichtbar. Weniger intensiv ausgeprägt war die BLI der mit Daratumumab behandelten Mäuse. Ab Tag 21 lag sie etwa 90 % unter jener der Kontrollantikörper-Mäuse. Am besten schnitten die Nanobody-hcAbs mit nativer Fc-Region ab. JK2 hcAb wies vor *MU1105* hcAb und WF211 hcAb den größten Antitumoreffekt auf. Ebenso wie in ADCC- und CDC-Assays wurde im Tierversuch Daratumumab mit WF211 hcAb, JK2 hcAb bzw. *MU1105* hcAb als Kombinationstherapie eingesetzt. Die Unterschiede in der Biolumineszenz zwischen Tumoren, die mit Daratumumab und der Kombination aus jenem mit JK2 hcAb bzw. *MU1105* hcAb behandelt worden waren, waren anders als beim CDC nur marginal. Die in vitro nicht erfolgreiche Kombination aus WF211 hcAb und Daratumumab hingegen erzielte den größten Antitumoreffekt von allen Therapien, obwohl die beiden Antikörper um das gleiche Epitop e1 konkurrieren.

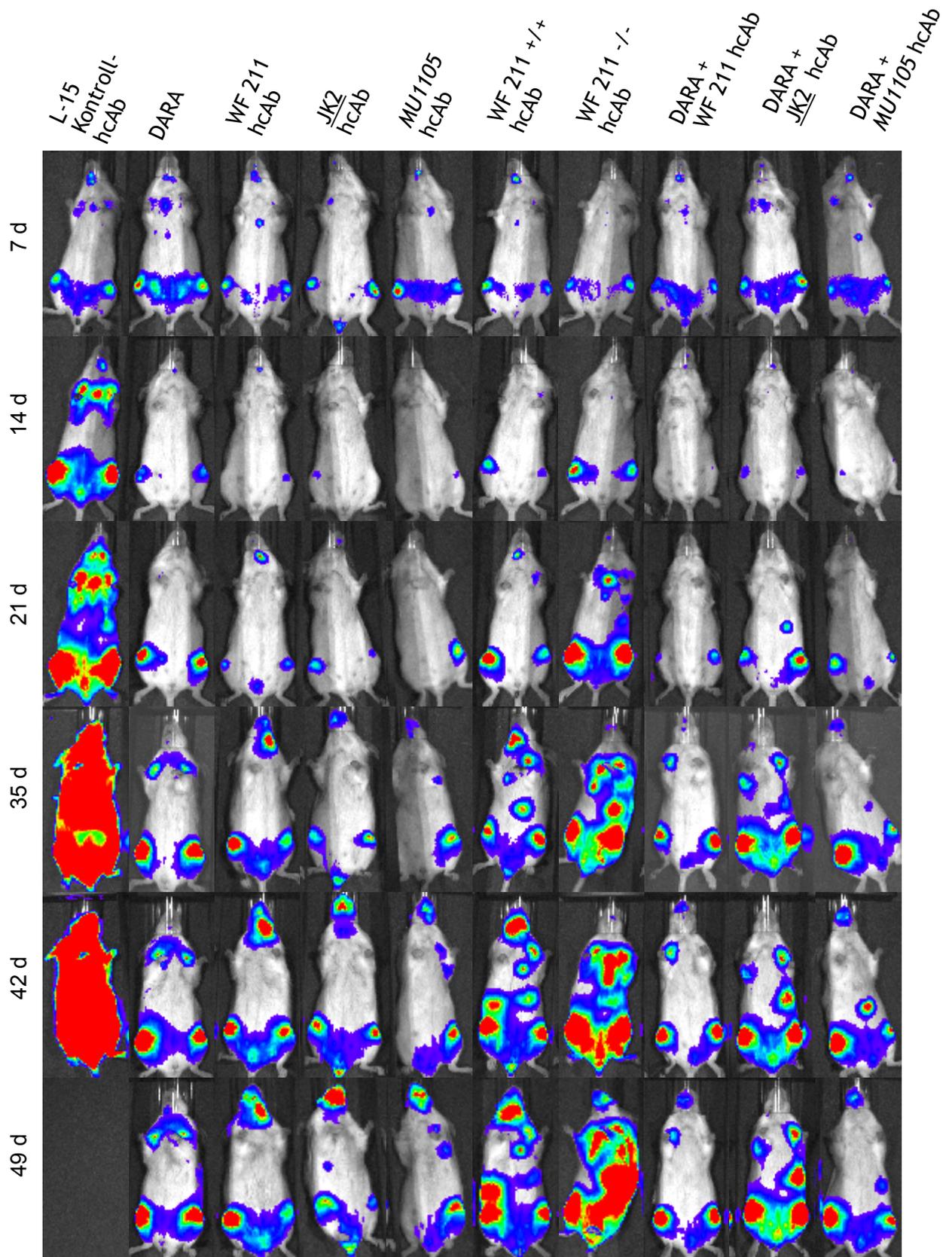


Abb. 4.3.: Tumorwachstum von humanem Burkitt-Lymphom-Xenograft in SCID-Mäusen. Für die In-vivo-Bildgebung der Tumoren wurde das Biolumineszenzsignal der Luciferase-exprimierenden CA46-luc-Zellen gemessen. Die Mäuse wurden narkotisiert und erhielten eine i.p. Injektion von 6 mg Luciferin in 200 μ l PBS $-/-$. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die IVIS-Aufnahmen durchgeführt. Die Tagesangaben links geben den Zeitpunkt der Messung post injectionem an. Exemplarisch dargestellt ist je eine Maus aus jeder Behandlungsgruppe. Die mit L-15 hcAb behandelte Maus wurde vor der letzten Messung an Tag 49 aus dem Versuch genommen. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

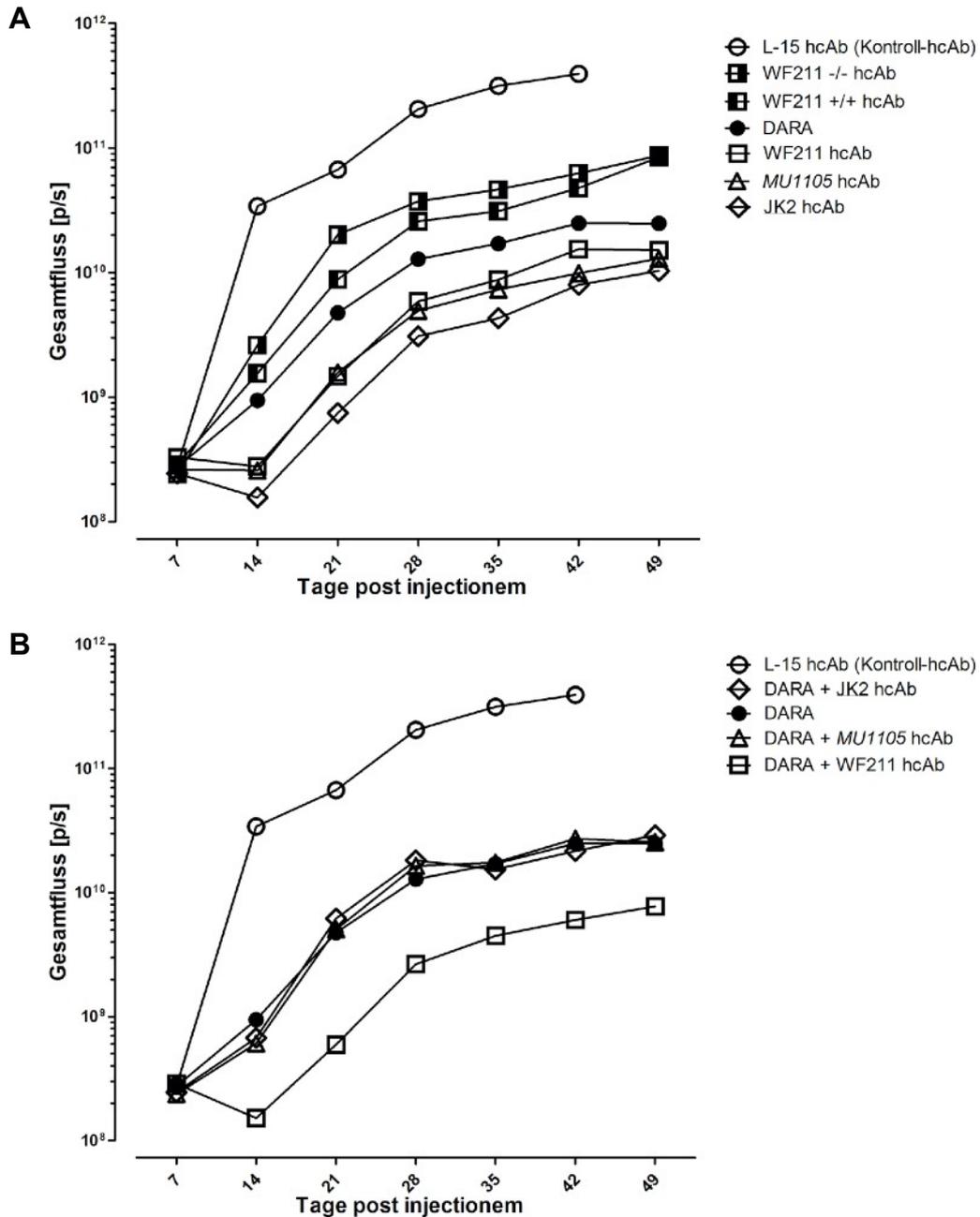


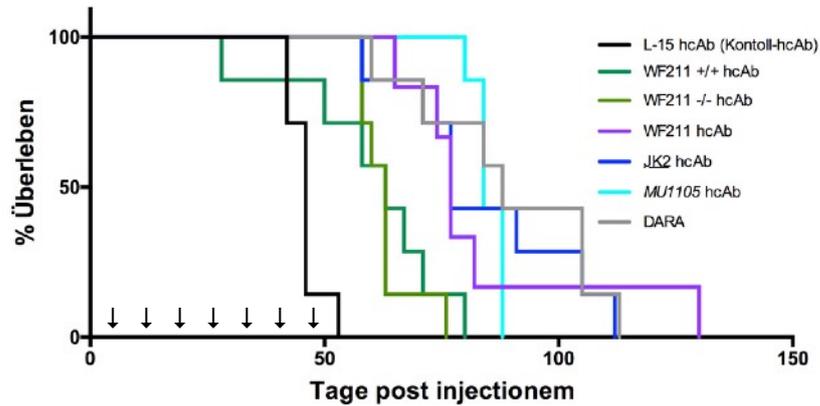
Abb. 4.4.: Inhibition des Tumorwachstums durch CD38-spezifische hcAbs als Monotherapie und in Kombination mit Daratumumab in Mäusen. Die Gruppen in (A) stellen die mit Einzelantikörpern behandelten Gruppen aus jeweils 7 Mäusen dar. In (B) sind die Gruppen aufgezeichnet (inklusive beider Kontrollen), die mit der Kombination aus Daratumumab und CD38-spezifischem hcAb behandelt wurden und aus jeweils 5 Tieren bestanden. Die CB17/lcr-Prkd^{scid}/lcr1coCrl-Mäuse wurden 6 Tage nach intravenöser Tumorinjektion von 4×10^6 CA46-luc-Zellen mithilfe des IVIS gemessen und gleichmäßig anhand ihrer BLI auf die 10 Behandlungsgruppen verteilt. Dafür wurden sie mit Isofluran narkotisiert und ihnen 6 mg Luciferin in 200 μ l PBS -/- i.p. injiziert. Nach 15-minütiger Inkubation wurde das Imaging von jeweils 5 Mäusen gleichzeitig durchgeführt. Die erste Messung für die Auswertung fand an Tag 7 statt, worauf wöchentliche Messungen bis Tag 49 folgten. Zu beachten ist die Auftragung des Gesamtflusses in logarithmischer Form. Sie wird in Photonen pro Sekunde definiert. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

4.1.3.2. CD38-spezifische mAbs verlängern Überleben im Tierversuch

Wie sich die Therapie mit einem Antikörper auf das Langzeitüberleben der Probanden auswirkt, ist eine essentielle Frage. Tiere schieden aus dem Versuch aus, wenn sie nach Beurteilung ihres Zustandes einen bestimmten Punktwert überschritten, der sich aus Punkten für Gewicht, Aussehen und Verhalten zusammensetzte. Das Gewicht wurde objektiv durch einzelnes Wiegen jeder Maus dreimal wöchentlich bestimmt. Das Aussehen wurde anhand des Fells, der Ohren, Schnurrhaare und eventuellen Verletzungen bewertet. Außerdem wurde das Verhalten analysiert. Es gab während des gesamten Versuchs eine Maus, die spontan einen Tag nach Injektion verstarb. Dabei handelte es sich um eine mit WF211 +/- hcAb behandelte Maus, die an Tag 29 verstarb.

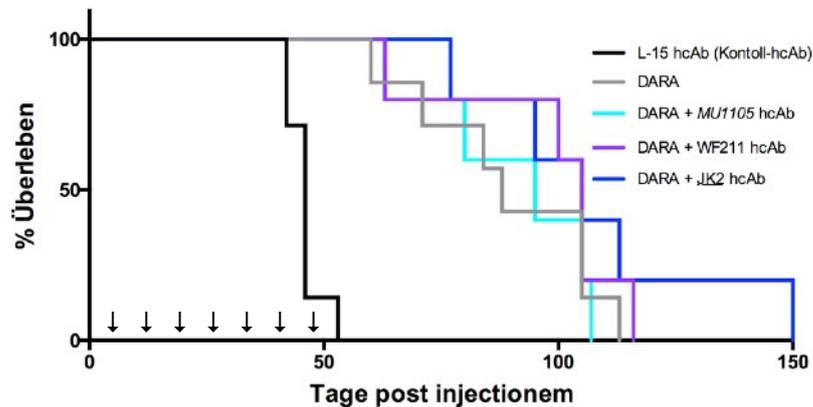
In **Abb. 4.5.A** und **Abb. 4.5.B** sind jeweils eine Kaplan-Meier-Kurve sowie eine Tabelle, die das mittlere Überleben der Mäuse einer Gruppe angibt, dargestellt. Die Mäuse der Kontrollantikörpergruppe präsentierten sich mit dem durchschnittlich kürzesten Überleben. Beinahe alle wurden zwischen Tag 42 und Tag 49 aufgrund von massivem Gewichtsverlust aus dem Versuch genommen. Korrelierend mit dem Tumorwachstum starben die Mäuse der beiden Fc-Mutationsvarianten von WF211 ebenfalls sehr früh. Das mittlere Überleben der beiden Gruppen lag mit circa 60 Tagen nur 15 Tage über dem der Gruppe der Kontrollmäuse. Erstaunlicherweise unterschied sich das mittlere Überleben der mit hcAbs als Monotherapie behandelten Mäuse um nicht einmal einen Tag. Auffällig war, dass innerhalb einer Woche alle *MU1105*-Mäuse verstarben. Als bestes Einzelkonstrukt manifestierte sich Daratumumab mit einem mittleren Überleben von 89,4 Tagen. Die Überlebensraten der Mäuse mit Kombinationstherapie lagen jedoch noch etwas höher, wobei sich WF211 hcAb und *MU1105* hcAb zusammen mit Daratumumab das Überleben nur um etwa 6 bzw. etwa 3 Tage im Vergleich zur Daratumumab-Monotherapie verlängerte. Mit einem mittleren Überleben von 108 Tagen konnte das Überleben der Mäuse durch die Kombination aus Daratumumab und JK2 hcAb am stärksten verlängert werden, wobei man beachten muss, dass eine Maus mit 150 Tagen Überleben den Durchschnitt der ganzen Gruppe nach oben verschob.

A



| Antikörper | L-15 | WF211 +/- hcAb | WF211 -/- hcAb | WF211 hcAb | JK2 hcAb | MU1105 hcAb | DARA |
|---------------------|--------|----------------|----------------|------------|----------|-------------|--------|
| Mittleres Überleben | 45,9 d | 59,6 d | 63 d | 84,2 d | 84,4 d | 85,1 d | 89,4 d |

B



| Antikörper | L-15 | DARA | DARA + MU1105 hcAb | DARA + WF211 hcAb | DARA + JK2 hcAb |
|---------------------|--------|--------|--------------------|-------------------|-----------------|
| Mittleres Überleben | 45,9 d | 89,4 d | 92,8 d | 95,8 d | 108 d |

Abb. 4.5.: Verlängerung des Überlebens von Mäusen durch wöchentliche Behandlung mit hcAbs oder mit Kombination aus hcAb und Daratumumab. In der Kaplan-Meier-Kurve in (A) dargestellte Mäuse wurden mit 50 µg hcAb oder 100 µg Daratumumab behandelt; Mäuse in (B) mit einer Kombination aus 70 µg Daratumumab und 25 µg hcAb (Kontrollen mit abgebildet). Die Tabellen in (A) und (B) geben das mittlere Überleben der Mäuse einer Behandlungsgruppe an. Die CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcr/coCrl-Mäuse wurden eine Woche nach intravenöser Tumoringektion von 4x10⁶ CA46-luc-Zellen in 10 Behandlungsgruppen eingeteilt. Ab Tag 7 bis Tag 49 bekamen sie in siebentägigen Abständen eine intraperitoneale Antikörperinjektion. Die Mäuse wurden dreimal wöchentlich Kontrollen über Aussehen, Verhalten und Gewicht unterzogen und demnach bewertet. Bei Verschlechterung des gesundheitlichen Zustandes über ein gewisses Maß wurden sie getötet und schieden aus dem Versuch aus. Die Pfeile (↓) verdeutlichen die Injektionszeitpunkte an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 28, Tag 35, Tag 42 und Tag 49. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

4.1.3.3. Ex-vivo-Organanalysen zeigen keine gebundenen CD38-Antikörper auf Tumorzellen

Die wöchentliche Antikörperbehandlung wurde in allen Versuchsgruppen ab Tag 49 post injectionem eingestellt. Die verwendete Mauslinie, die durch ihren schwerwiegenden Immundefekt für die Xenotransplantation gut geeignet ist, zeichnet sich außerdem dadurch aus, sehr anfällig für Infektionskrankheiten zu sein, da ihnen B- und T-Zellen praktisch fehlen. Um das Risiko von Infektionen zu minimieren, wurden die Tiere ausschließlich in IVC-Käfigen gehalten. Jedoch liefen die mehrmals wöchentlich stattfindenden Kontrollen über ihren Zustand außerhalb des Käfigs ab. Dies warf die Frage auf, ob bei den Mäusen zum Todeszeitpunkt Tumoren in lebenswichtigen Organen vorhanden waren oder nicht, was wiederum eine Infektion als Todesursache wahrscheinlicher machen würde. Überdies sollte überprüft werden, ob auf den CA46-luc-Zellen in den Tumoren noch immer Antikörper gebunden waren; darüber hinaus, ob die Tumorzellen noch in normalem Maß CD38 exprimierten oder es eventuell durch Shedding oder Internalisierung des Ektoenzym zu einer sog. Immunevasion kam (Pfister et al., 2001). Zu diesem Zweck wurden von 33 Mäusen nach Überschreiten des Scorelimits und Ausscheiden aus dem Versuch Ex-vivo-Organanalysen angefertigt.

Vor der cervikalen Dislokation wurde den Mäusen eine Luciferinlösung i.p. gespritzt. Nachdem die Organe präpariert waren und mithilfe des IVIS die Biolumineszenz der CA46-luc-Zellen gemessen wurde, folgte die Analyse tumorbefallener Organe. Dazu wurden sie homogenisiert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzantikörpern inkubiert. Es zeigte sich, dass das oberflächengebundene CD38 der CA46-luc-Zellen weiterhin einer hohen Expression unterlag. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet (**Abb. 4.6.A**), da einige Proben durch viele positive Signale im PE-Filter imponierten, obschon keine PE-konjugierten Antikörper in diesen Proben verwendet wurden. Dies wurde womöglich durch autofluoreszierende Zelltrümmer hervorgerufen, die bei der Präparation und vor allem beim nachfolgenden Homogenisieren der Organe entstanden. In keinem der analysierten Organe befand sich gebundenes humanes IgG1 auf der Zelloberfläche (**Abb. 4.6.B**). Hierbei schien es keinen Unterschied zu machen, ob Mäuse eine Woche zuvor ihre letzte Antikörperinjektion erhielten oder ob sie schon lange zurücklag. Somit wurden die Tumoren entweder nicht mehr von den Antikörpern erreicht oder es befanden sich

keine zirkulierenden Antikörper mehr im Serum der Tiere. Fügte man jedoch den Ansätzen nachträglich den entsprechenden Antikörper hinzu, mit der die Maus im Langzeitversuch behandelt wurde, konnte dieser auf den Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 4.6.C.**).

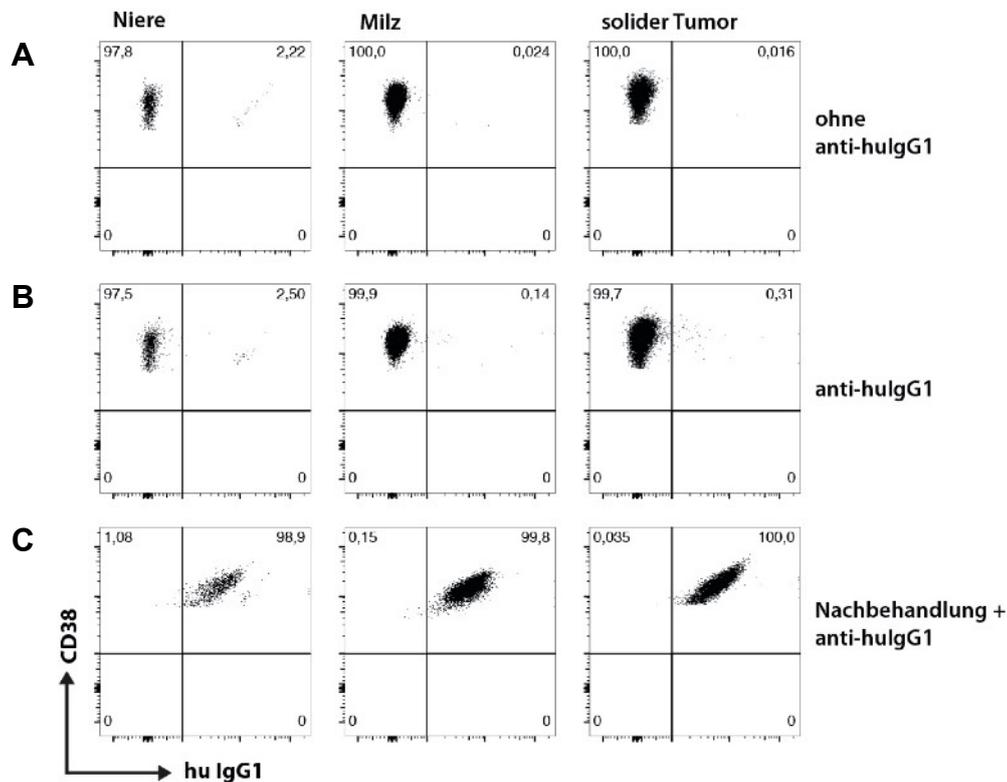


Abb. 4.6.: Keine gebundenen Antikörper auf CA46-luc-Zellen nachweisbar. Bei jeder Ex-vivo-Organpräparation wurden mehrere Biolumineszenz-positive Organe für weitere Analysen aufbereitet. Etwa die Hälfte aller Tiere wurde auf diese Art untersucht. Die Organe wurden mittels Gentlemacs und 70 µm Zellsieb homogenisiert und anschließend mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. Die hier untersuchten Organe stammen aus der einer mit WF211 *-/-* hcAb behandelten Maus, die nach 62 Tagen starb, wobei ihre letzte Antikörperinjektion 13 Tage zurücklag. Die Organe sind in **Abb. 4.7.A** mit weißen Pfeilen und Zahlen markiert. Milz: **1**; linke Niere: **2**; solider, abdomineller Tumor: **3**. In **(A)** wurden die Ansätze gegen CD38 angefärbt, in **(B)** gegen humanes IgG1 und CD38 und in **(C)** wurden die präparierten Zellen für 30 min mit dem jeweiligen Behandlungsantikörper der Maus inkubiert (in diesem Fall WF211 *-/-* hcAb) und anschließend gegen CD38 und humanes IgG1 angefärbt. Die Vermessung der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer und die FACS-Plots wurden mit FlowJo erstellt. Die Zahlen in den Quadranten stellen den prozentualen Anteil der Zellpopulation dar. Die Anfärbungen zeigen, dass auf den präparierten CA46-luc-Zellen kein Immunglobulin mehr detektiert wurde, jedoch eine Nachbehandlung mit entsprechendem Behandlungsantikörper wieder normal auf den Zellen band und nachweisbar war.

Die Tumorlokalisationen unterschieden sich maßgeblich je nach Behandlungsantikörper, den die Mäuse erhielten. Die am häufigsten von Tumoren betroffenen abdominalen Organe waren die Milz, die Nieren und auch der Magen. Diese Organe waren jedoch fast ausschließlich bei Tieren befallen, die mit dem Kontrollantikörper oder den beiden WF211 hcAb Mutanten behandelt wurden. Sie entwickelten alle eine ausgeprägte Splenomegalie und häufig multiple Tumorherde an den Nieren. Hinzu kamen stets Tumoren am Schädel und Hirn. Sie waren außerdem die Tiere, die im Durchschnitt am frühesten verstarben. Exemplarisch dargestellt sind in **Abb. 4.7.A** eine Maus, die mit WF211 $-/-$ hcAb behandelt wurde und nach 62 Tagen verstarb und in **Abb. 4.7.B** eine Maus, die mit der Kombination aus Daratumumab und *MU1105* behandelt wurde und nach 94 Tagen verstarb. Bei den anderen Mäusen, die mit einem Antikörper mit nativem Fc-Teil behandelt wurden, ließ sich ebenfalls meistens lediglich im Schädel und Gehirn ein starkes Biolumineszenzsignal nachweisen.

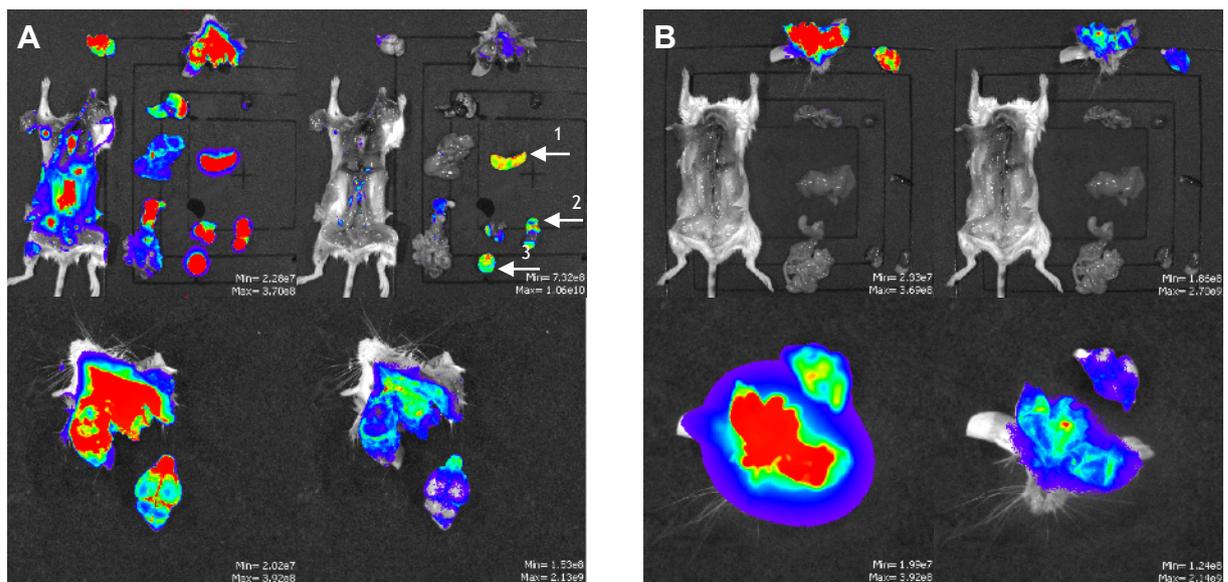


Abb. 4.7.: Organpräparation von Biolumineszenz-positiven Organen. In (A) wurde eine Maus, die nach 62 Tagen aus dem Versuch ausschied präpariert, wobei sich deutlich abgrenzbare Tumoren in Kopf, Gehirn, Lymphknoten, Nieren, Milz, Magen und einem soliden Geschwulst der Bauchhöhle befanden. Die Maus wurde mit WF211 $-/-$ hcAb behandelt. Die in (B) dargestellte Maus wurde mit einer Kombination aus Daratumumab und *MU1105* behandelt und starb nach 94 Tagen. Es ließen sich lediglich Tumoren in Kopf und Gehirn nachweisen. Nachdem Mäuse aus dem Versuch ausschieden, wurden etwa von der Hälfte aller Mäuse Ex-vivo-Organanalysen angefertigt. Während des Versuchs wurde ihr Wohlergehen mittels eines Scores über den Zustand der Maus quantifiziert. Bei Erreichen eines bestimmten Limits wurden die Mäuse per cervikaler Dislokation getötet. Tiere, die für Organanalysen herangezogen wurden, wurden vor Genickbruch mit Isofluran narkotisiert und erhielten eine i.p. Injektion von 6 mg Luciferin in 200 μ l PBS $-/-$. 15 min später erfolgten Tötung, Präparation der Organe und IVIS-Biolumineszenzmessung. Die jeweils linken Bilder von Kopf und Körper in (A) und (B) wurden mit sehr sensitiven Einstellungen aufgenommen, die rechten erlauben einen besseren Blick auf die genaue Lokalisation der Tumoren.

4.2. CD38-spezifische Nanobody-Dimere

4.2.1. Produktion und Aufreinigung von bivalenten Nanobody-Dimeren

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse, die in den vorangegangenen CDC-Assays gewonnen wurden, fällt auf, dass die Antikörperkombination aus Daratumumab und JK2 hcAb oder *MU1105* hcAb eine beinahe vollständige Zytolyse in den CA46-luc-Zellen hervorriefen. Dies war wahrscheinlich auf Kreuzvernetzungen zwischen den einzelnen CD38-Antikörper-Immunkomplexen auf der Zelloberfläche zurückzuführen, welche dadurch entstehen können, dass die Antikörper unterschiedliche Epitope binden und somit mehrere Moleküle miteinander verknüpfen. Möglicherweise führt allein die unmittelbare Proximität der Fc-Regionen der gebundenen Antikörper zu einer verstärkten Rekrutierung des C1-Komplexes und somit zur Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems. Weiterhin wäre es möglich, dass auch andere Effektormechanismen wie ADCC auf diese Weise verstärkt werden könnten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 12 verschiedene bivalente CD38-spezifische Nanobody-Dimere kloniert und anschließend produziert.

Die verwendeten Nanobody-Monomere, die für die Klonierung benutzt wurden, waren JK2 und *JK36*, wobei ersterer an Epitop e2 und letzterer an Epitop e3 bindet. Die DNA-Sequenzen beider Nanobodies wurden bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in pCSE2.5 V_HH+hFc IgG1 Vektoren kloniert und konnten so für die Amplifizierung mittels PCR verwendet werden. Als Linker wurde ein sogenannter GS-Linker verwendet, der aus je 4 Glycinen und einem Serin (GGGGS)_n besteht. Hierbei steht „n“ für die Anzahl an Wiederholungen der Aminosäuresequenz, aus der der Linker aufgebaut ist. Diese Art von Linker bietet eine hohe Flexibilität aufgrund der geringen Größe der Aminosäuren und Stabilität durch die Formierung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässriger Lösung (Chen et al., 2013). Im Folgenden wird eine Abfolge von (GGGGS)₁ mit „5GS“ gleichgesetzt, wobei die verwendeten Linker immer aus Vielfachen dieser Kombination bestanden. Die Nanobodies wurden in den Konstellationen JK2-JK2, JK2-JK36, *JK36-JK2* und *JK36-JK36* mit jeweils einem 15GS-, einem 25GS- und einem 35GS-Linker kloniert (**Abb. 4.8.**). Die V_HHs an jeweils vorderer Stelle wurden aus den Plasmiden von JK2 (FS#833) und *JK36* (FS#832) mithilfe spezifischer Primer, die eine PciI-Schnittstelle

vor und die erste Hälfte des GS-Linkers hinter der Nanobody-DNA-Sequenz codieren, via PCR amplifiziert. Nanobodies an zweiter Stelle im Dimer wurden auf die gleiche Weise mit der entsprechenden zweiten Hälfte des GS-Linkers vor und einer NotI-Schnittstelle hinter der V_HH-DNA-Sequenz amplifiziert. Die DNA-Sequenzen sowie der Vektor wurden mit den adäquaten Restriktionsendonukleasen verdaut. Die PciI-Schnittstelle vor den Nanobodies wurde angefügt, da die DNA-Sequenz von JK2 eine interne NcoI-Schnittstelle besitzt und mit diesem Enzym auch das Insert aus dem Vektor geschnitten wird. Allerdings sind die Restriktionsschnittstellen von NcoI und PciI nach dem Restriktionsverdau miteinander kompatibel und konnten somit ohne Probleme ligiert werden. Im Anschluss an den Verdau wurden die Inserts per Dreiwegeligation in einen pCSE2.5 V_HH+His+c-Myc Vektor mit endständigem His-Myc-Tag eingefügt. Im folgenden Teil der Arbeit werden für die Nanobody-Dimere anstatt der Bezeichnungen JK2-JK2 15GS, JK2-JK36 15GS usw. die Bezeichnungen NiS1 - *NiS12* verwendet.

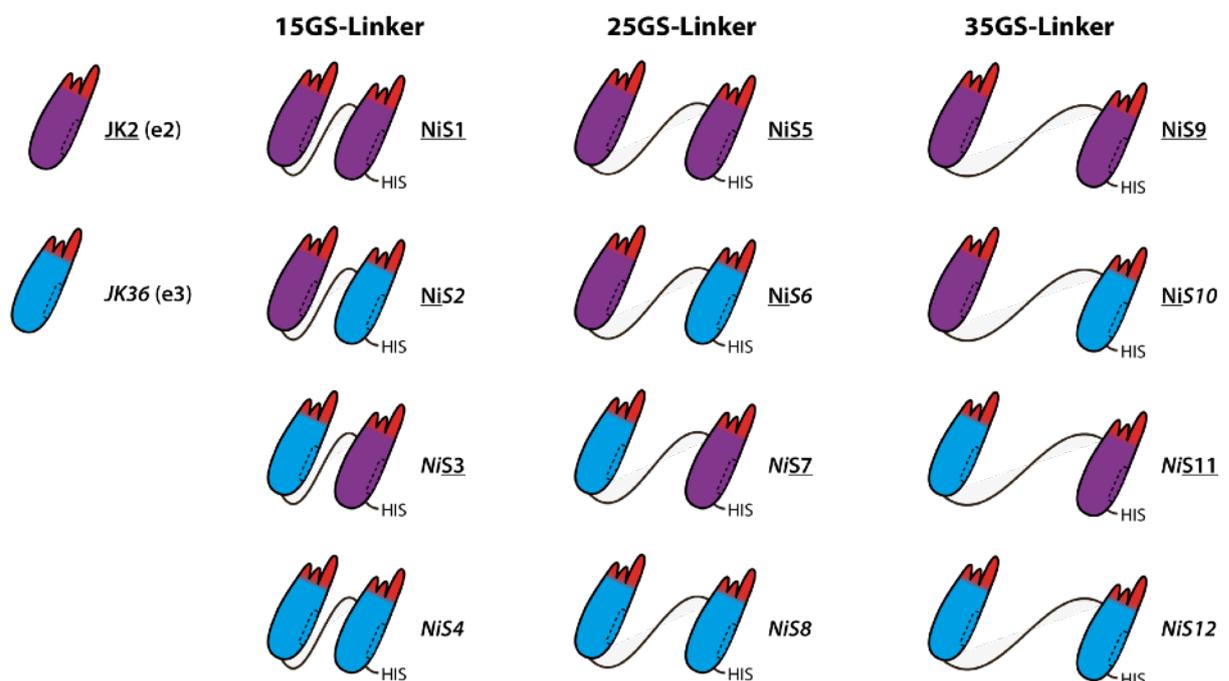


Abb. 4.8.: Schematische Darstellung aller 12 bivalenten NiS-Nanobody-Dimere. Die Darstellung zeigt alle Nanobody-Dimere von NiS1 - *NiS12*. Die Nanobody-Dimere wurden mit einem GS-Linker in den Längen 15GS, 25GS und 35GS kloniert. Das „HIS“-Kästchen symbolisiert den Hexahistidin(His)-Myc-Tag. Bei der Schreibweise der Namen wurde weiterhin darauf geachtet, dass Namen der Epitop-e2-bindenden Nanobodies unterstrichen und Namen der Epitop-e3-bindenden Nanobodies *kursiv* aufgeführt werden. Homodimere aus JK2 binden nur an Epitop e2, Homodimere aus *JK36* binden nur an Epitop *e3*. Somit werden erstere nur unterstrichen, letztere nur *kursiv* geschrieben. Heterodimere werden teils unterstrichen, teils *kursiv* geschrieben.

Die Produktion der NiS-Nanobody-Dimere wurde mittels transienter Transfektion in HEK293-6E-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsvektoren mithilfe von PEI durch die Zellmembranen geschleust. Die Zellen produzierten und sezernierten über eine Woche Dimere in Suspension. Eine Woche nach Transfektion wurden die Zellüberstände geerntet und zentrifugiert. Die Zellen wurden verworfen und die Überstände mittels Ni-NTA Präzipitation aufgereinigt. Eluiert wurden die Proteine in PBS -/- mit 250 nM Imidazol. Aufgrund der Toxizität von Imidazol wurden die Dimere anschließend mithilfe von Gelfiltrationssäulen vom Imidazol getrennt und in PBS +/- umgepuffert. Die Konzentrationen wurden per BCA Kit bestimmt. Danach wurden sie auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit einer Coomassie-Färbung angefärbt (**Abb. 4.9.**). Das Molekulargewicht der Nanobody-Dimere beträgt abhängig von GS-Linkerlänge und Zusammensetzung der Nanobodies zwischen 29,7 und 32 kDa.

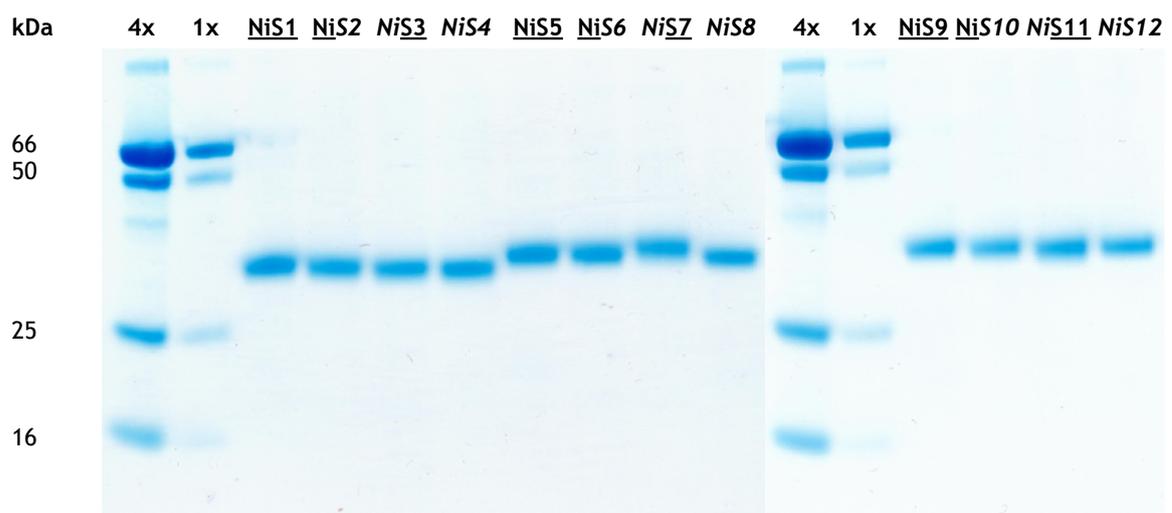
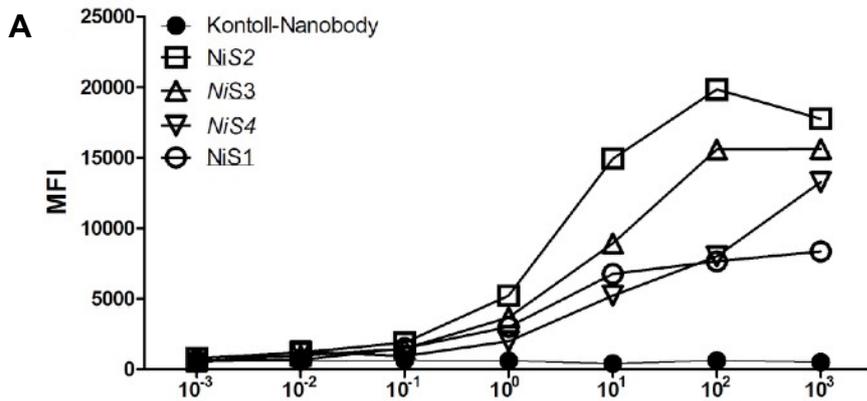


Abb. 4.9.: Produktion rekombinanter, bivalenter Nanobody-Dimere in HEK293-6E-Zellen. Die Zellen wurden mithilfe von JetPEI (Polyplus) mit den pCSE2.5 V_HH+His+c-Myc Expressionsvektoren der Nanobody-Dimere NiS1 - NiS12 transient transduziert. Zellüberstände wurden nach 7 Tagen geerntet, für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und steril filtriert. Die Aufreinigung fand über eine Nickel-NTA Matrix statt. Über die Imidazolringe des Hexahistidin-Tags banden die Protein an die Matrix, wonach sie in Puffer aus PBS -/- mit 250 mM Imidazol eluiert wurden. Aufgrund der Toxizität des Imidazols wurden die Nanobody-Dimere anschließend über PD10-Säulen in PBS +/- umgepuffert. Das Eluat wurde mittels Ultrazentrifugation eingeeengt und die Konzentration per BCA-Kit festgestellt. Jeweils 1 µg der aufgereinigten Proteine wurden per SDS-PAGE analysiert. Das Molekulargewicht der Dimere liegt zwischen 29,7 kDa und 32 kDa. Supermarker SM beinhaltet: BSA (1 µg, 66 kDa), IgG schwere Kette (500 ng, 50 kDa), IgG leichte Kette (250 ng, 25 kDa) und Lysozym (100 ng, 16 kDa) in einfacher Menge (1x) oder vierfacher Menge (4x). Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e2, Epitop e3.

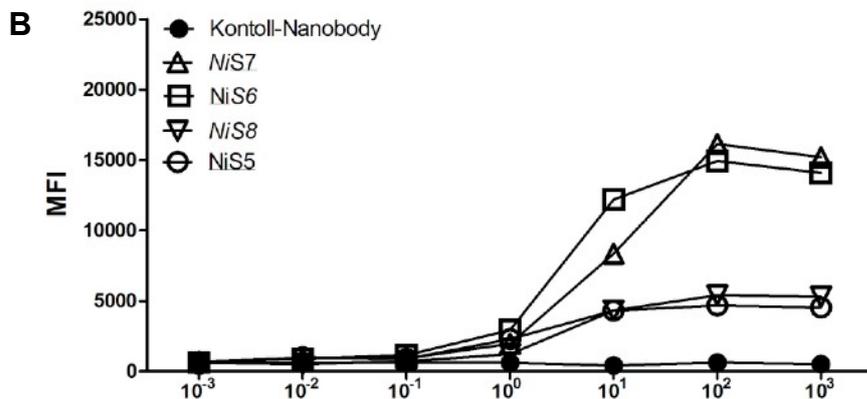
4.2.2. Charakterisierung von bivalenten Nanobody-Dimeren

Zur Charakterisierung der Nanobody-Dimere wurde die Affinität der Antikörper zu ihrem Zielantigen getestet. Dazu wurden CD38 exprimierende CA46-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Antikörpern in 100 μ l inkubiert. Es handelte sich um eine dezimale Verdünnungsreihe, die in sechs Schritten von einer Konzentration von 1 μ M zu 1 pM führte. Da die Klonierung der NiS-Dimere in einen pCSE2.5 V_HH+His+c-Myc Expressionsvektor durchgeführt wurden, konnte man die an CD38 gebundenen Antikörper über einen anti-c-Myc-Antikörper detektieren. Dieser Antikörper war an AlexaFluor647 konjugiert, welches im APC-Kanal des FACS gemessen wurde.

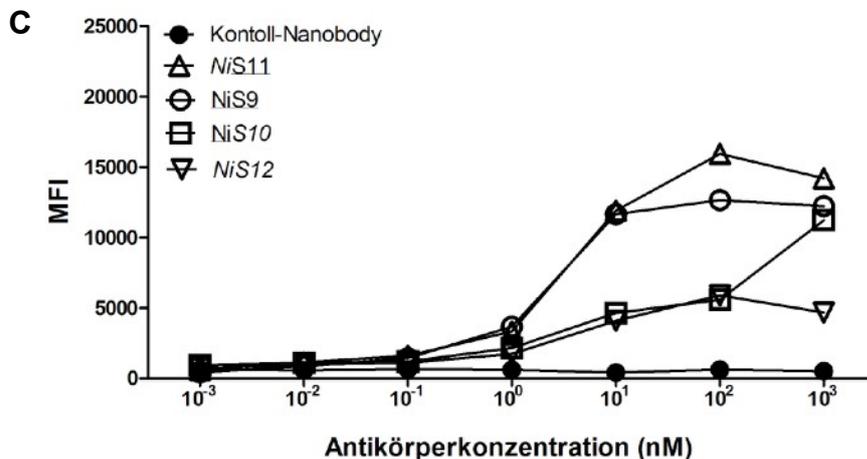
In **Abb. 4.10.** sind in drei Graphen die Bindungskurven von den 12 NiS-Dimeren dargestellt, wobei sich jeweils die 15GS- (**Abb. 4.10.A**), die 25GS- (**Abb. 4.10.B**) und 35GS-Dimere (**Abb. 4.10.C**) einen Graph teilen. Auf den ersten Blick scheint es, dass die Heterodimere aus JK2 und JK36 eine deutlich stärkere Bindung aufwiesen, als es bei den Homodimeren der Fall war. Man sollte jedoch in Betracht ziehen, dass für die Bindung der Heterodimere doppelt so viele Epitope zur Verfügung standen, wie es bei den Homodimeren der Fall war. Aufgrund dessen war in diesem Assay ein niedrigeres maximales Signal bei den Homodimeren zu erwarten als bei den Heterodimeren. Da die Kurven der Homodimere bis auf NiS4 und NiS10 ebenfalls eine ähnliche sigmoidale Form besitzen, wurde davon ausgegangen, dass das maximale APC-Signal bei einer Dimerkonzentration von 1 μ M zu erwarten war. Die Dissoziationskonstante K_D , welche die Konzentration angibt, bei der ein halbmaximales Signal gemessen wurde, sprich die Hälfte aller CD38-Moleküle mit Antikörpern besetzt waren, ist neben dem jeweiligen Graphen in einer Tabelle angegeben. Dadurch, dass jeweils zwei Ansätze gemessen wurden, gab es bei NiS4 und NiS10 je einen Ausreißer nach oben bei einer Konzentration von 1 μ M, der die Werte möglicherweise verfälscht hat. Für sie konnten keine genauen K_D -Werte ermittelt werden. Je niedriger der K_D -Wert, desto höher war die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen. Die JK2-Homodimere wiesen die stärkste Bindung auf gefolgt von JK2-JK36-Heterodimeren. Die Affinitäten von JK36-JK2-Dimeren und JK36-Homodimeren waren insbesondere bei 15GS- und 25GS-Linker-Dimeren etwas geringer.



| Dimer | K _D (nM) |
|-------|---------------------|
| NiS2 | 3 |
| NiS3 | 7,8 |
| NiS4 | nb |
| NiS1 | 2,2 |



| Dimer | K _D (nM) |
|-------|---------------------|
| NiS7 | 10 |
| NiS6 | 3,3 |
| NiS8 | 4 |
| NiS5 | 1,4 |



| Dimer | K _D (nM) |
|-------|---------------------|
| NiS11 | 3,6 |
| NiS9 | 2 |
| NiS10 | nb |
| NiS12 | 3,8 |

Abb. 4.10.: Titrationsreihe der Nanobody-Dimere NiS1 - NiS12 an CA46-Zellen zur Analyse der Bindung. In (A) sind die 15GS-Dimere NiS1 - NiS4, in (B) die 25GS-Dimere NiS5 - NiS8 und in (C) die 35GS-Dimere NiS9 - NiS12 dargestellt. In den Tabellen neben den Graphen sind die K_D-Werte für die Dimere angegeben, welche mit dem Rechner von ATT Bioquest ermittelt wurden. Die Werte von NiS4 und NiS10 waren nicht bestimmbar (nb). CA46-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expressionsrate von CD38 auf ihrer Zelloberfläche aus. Alle Nanobody-Dimere wurden an einem His-Myc-Tag gekoppelt produziert, welche als Detektionsstelle verwendet werden konnte. Pro Ansatz wurden 1x10⁵ Zellen verwendet. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 1 µM in dezimalen Schritten bis 1 pM in 100 µl PBS + 0,2 % BSA zu den Zellen gegeben und mittels eines c-Myc-Antikörpers (APC) detektiert. Als Negativkontrolle wurde ein Nanobody mit dem Namen 271 verwendet, welcher P2X4 bindet. Die Werte wurden in zwei Ansätzen gemessen und gemittelt. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e₂, Epitop e₃.

4.2.3. Kein Nachweis von Antikörpern gegen Nanobody-Dimere in verwendetem humanen Serum

Vor dem Einsatz von den Nanobody-Dimeren in CDC-Assays stellte sich die Frage, ob komplementabhängige Lyse durch Nanobody-Dimere und hcAbs durch die Kreuzvernetzung von CD38-Molekülen möglich wäre oder ob sich im eingesetzten Serum präformierte, gegen die Dimere gerichtete, Antikörper befanden, die ebenfalls zu einer erhöhten Zelllyse führen könnten. Das Serum besteht neben dem für CDC-Assays unerlässlichen Komplementsystem unter anderem aus Elektrolyten, Metaboliten, Nährstoffen und Antikörpern. Die Zusammensetzung der Antikörper im Serum kann sehr stark variieren. Dies hängt entscheidend davon ab, mit welcher Art von Antigenen ein Individuum in seinem Leben bereits in Kontakt gekommen ist. So bestand unter anderem die Möglichkeit, dass einer der Serumspender zirkulierende Antikörper gegen einen Teil der Nanobody-Dimere, wie zum Beispiel die c-terminalen Tags, besaß.

Das in den Versuchen dieser Arbeit verwendete Serum wurde gewonnen, indem gesunden Spendern Blut entnommen wurde, welches eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerinnen lassen wurde. Durch zehnmündige Zentrifugation bei 1600 rpm wurde das Serum von zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt. Anschließend wurde es abpipettiert und von jedem Spender einzeln getestet. Diese Testung erfolgte, indem Daudi oder CA46-Zellen in CDC-Assays mit bekanntermaßen zytotoxischen Antikörperkombinationen und Serum inkubiert wurden, was einen hohen Anteil an nekrotischen Zellen mit sich bringen sollte. Außerdem wurde getestet, ob sich durch die reine Inkubation des Serums mit den Zellen eine Zytolyse ergab. Nach dieser Überprüfung, wurde das Serum gepoolt und erneut auf dieses Weise getestet.

Die Nanobody-Dimere bestanden aus zwei V_{HH} s, die mit einem GS-Linker verbunden und mit einem Polyhistidin- und einem Myc-Tag versehen waren. Sie besaßen keine Fc-Region. Um zu untersuchen, ob im verwendeten Serum Antikörper gegen eine der genannten Strukturen existierten, wurden CD38-transfizierte HEK293-6E-Zellen mit Nanobody-Dimeren inkubiert. Überschüssige Dimere wurden durch Zentrifugation und Resuspension entfernt. Es folgten eine Inkubation mit humanem Serum und eine erneute Waschung. Nach Zugabe eines an die Fc-Region bindenden PE-gelabelten Antikörpers wurden die Zellen im Durchflusszytometer

vermessen. Eine Inkubation von CD38-transfizierten HEK293-6E-Zellen ohne vorherige Inkubation mit NiS-Dimeren gab Aufschluss darüber, dass sich keine gegen HEK-Zellen gerichteten Antikörper im Serum befanden oder HEK-Zellen oberflächengebundenen Ig exprimierten, wie es bei Daudi und CA46-Zellen der Fall ist. Auch bei Zellen mit vorheriger Inkubation mit V_HH-Dimer ließ sich nachweisen, dass auf den Zellen keine Antikörper gebunden waren (**Abb. 4.11.**). Das bedeutet, dass das verwendete Serum frei von Antikörpern gegen die Dimere oder ihre Tags war. Als Positivkontrolle wurde Daratumumab verwendet und mit den HEK-Zellen inkubiert. Allerdings wurden die Zellen nach der Inkubation mit Daratumumab nicht mit Serum inkubiert, da dies einen teilweisen CDC-Effekt mit sich bringen würde. Durch die Behandlung der Zellen mit Daratumumab wiesen sie ein hohes Signal für gebundene Immunglobuline auf.

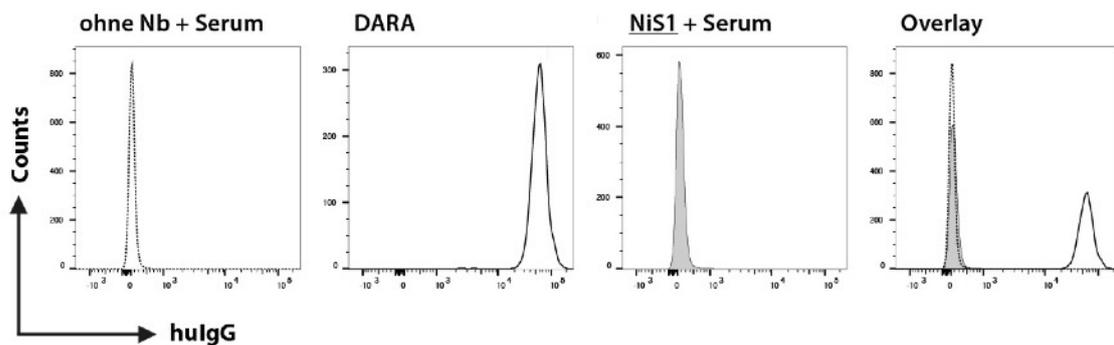


Abb. 4.11.: Keine gegen Nanobody-Dimere mit His-Myc-Tag gerichteten Antikörper in humanem Serum nachweisbar. Pro Ansatz wurden 1×10^6 CD38-transduzierte HEK293-6E-Zellen verwendet. Diese wurden mit 100 nM Nanobody-Dimer für 30 min inkubiert. Es folgte eine zweifache Waschung und Inkubation mit 15 % nativem, humanem Serum. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Serum entfernt und die Zellen in PBS + 0,2 % BSA resuspendiert. Die Zellen wurden gegen IgG (PE) angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Es wurden mehrere Ansätze mit V_HH-Monomeren sowie V_HH-Dimeren überprüft (Daten nicht gezeigt), wobei sich immer das gleiche Bild wie bei NiS1 + Serum ergab, daher wurde nur dieser Ansatz exemplarisch dargestellt. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit Serum inkubiert, um ausschließen zu können, dass sich gegen HEK-Zellen gerichtete Antikörper im Serum befanden oder HEK-Zellen oberflächengebundenen Immunglobulin exprimierten, was beides nicht der Fall war. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 100 nM Daratumumab inkubiert, aber anschließend nicht mit Serum, da dies die Auslösung von CDC zur Folge hätte, sondern nur mit einem anti-IgG-Fluoreszenzantikörper. Im Overlay wird deutlich, dass an zuvor mit Nanobody-Dimer inkubierten Zellen keine Antikörper banden. Daher konnte die Existenz von im Serum befindlichen Antikörpern gegen einen Teil der Nanobody-Dimere ausgeschlossen werden. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e2.

4.2.4. Nanobody-Dimere in Kombination mit Daratumumab oder hcAbs weisen hohe CDC-Effektivität auf

Die ursprüngliche Hypothese, dass eine CDC in einer Zelle durch Kreuzvernetzung der CD38-Antikörper-Immunkomplexe ausgelöst bzw. verstärkt werden kann, sollte durch den Einsatz von Nanobody-Dimeren untersucht werden. Diese Nanobody-Dimere zeichnen sich alle durch eine Bivalenz aus, also das Binden an zwei Antigenen gleichzeitig. Einige von ihnen sind biparatopisch, das heißt, sie können am gleichen Molekül zwei unterschiedliche Epitope binden. Zu letzteren zählen lediglich die Heterodimere JK2-JK36- bzw. JK36-JK2-Dimere: NiS2, NiS3, NiS6, NiS7, NiS10 und NiS11. Nichtsdestotrotz sind alle Dimere in der Lage, unabhängig von Daratumumab an CD38 zu binden, da dieser konventionelle Antikörper an Epitop e1 und die Dimere an die Epitope e2 und/oder Epitop e3 binden. Bei den bisher dargestellten CDC-Assays war das Resultat, dass eine Zugabe von Daratumumab und humanem Serum zu CA46-luc-Zellen eine Lyse von etwa 20 % der Zellen ergab. Die Behandlung der gleichen Zellen mit einem hcAb anstatt Daratumumab führte dabei zu keiner Lyse. Der Hintergrund toter Zellen lag bei etwa 10 %. Durch die Koinkubation von Daratumumab und JK2 hcAb bzw. MU1105 hcAb wurde die Lyse jedoch auf nahezu 100 % erhöht. Es bestand also die Möglichkeit, dass durch die Bindung von mehr Antikörpern zusätzliche Fc-Regionen für eine verstärkte Aktivierung des Komplementsystems sorgten. Eine weitere Möglichkeit war, dass durch die lokale Nähe der CD38-Moleküle die Bindung des C1q an die Fc-Regionen erleichtert wurde. Die Arme der unterschiedlichen Antikörper können je bis zu zwei CD38-Moleküle binden. So käme es nicht wie bei einem einzelnen Antikörper nur zu einer Verknüpfung von je zwei CD38, sondern zu einer Verkettung von einer weitaus größeren Anzahl der Ektoenzyme.

Um diese These zu überprüfen, wurde ein CDC-Assay an CA46-Zellen durchgeführt. Zu 1×10^5 Zellen wurden 50 nM Daratumumab und 50 nM Nanobody-Dimer gegeben und sie anschließend mit 15 % nativen bzw. hitzeinaktiviertem humanem Serum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Nachweis nekrotischer Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometer mittels PI-Färbung.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass die Kombination aus Daratumumab und Dimeren in allen Fällen ein sehr hohes Potential für die Induktion einer CDC aufwies (**Abb. 4.12.A**). In diesem Fall lag sie sogar über der erwiesenermaßen

effektiven Kombination aus JK2 hcAb und Daratumumab. Bezogen auf ihre Linkerlänge, ließ sich bei den Dimeren ein Unterschied in der Fähigkeit, eine CDC auszulösen, erkennen. Die Unterschiede waren marginal, jedoch fiel auf, dass je länger ein Linker war, desto geringer lag die Zytolyserate. So wiesen alle Ansätze der CA46-Zellen in Gegenwart der 15GS-Dimere eine höhere Lyse auf als die der korrespondierenden 25GS- bzw. 35GS-Dimere. Weiterhin war erkennbar, dass verglichen innerhalb der Linkerlängen NiS1, NiS5 und NiS9 (JK2-Homodimere) am wenigsten und *NiS4*, *NiS8* und *NiS12* (*JK36*-Homodimere) am meisten Zytolyse in den Zellen erzeugten.

Zuvor wurde dieser Versuch mit ähnlichem Ergebnis an Daudi-luc-Zellen durchgeführt (Daten nicht abgebildet).

Nachdem beobachtet werden konnte, dass die NiS-Nanobody-Dimere die Fähigkeit besaßen den CDC-Effekt von Daratumumab maßgeblich zu verstärken, wurde untersucht wie sich die Dimere in Kombination mit Schwere-Ketten-Antikörpern verhielten. Dazu wurden die zwei hcAbs gewählt, die die gleichen Nanobodies enthielten wie die produzierten Dimere und welche an verschiedene Epitope binden: JK2 hcAb bindet an Epitop e2 und *JK36* hcAb bindet an Epitop e3. Die CDC-Assays wurden genau wie im oben beschriebenen Versuch in Kombination mit den Dimeren durchgeführt.

Der erste Schwere-Ketten-Antikörper, dessen Fähigkeit in Kombination mit den NiS V_HH-Dimeren CDC zu induzieren untersucht wurde, war JK2 hcAb (**Abb. 4.12.B**) Bei der Koinkubation von Dimer und hcAb zeichnete sich ab, dass sowohl JK2-Homodimere als auch JK2-*JK36*-Heterodimere die CDC-Effektivität nicht zu steigern vermochten. Allerdings konnten die Heterodimere mit *JK36* an erster Stelle, NiS3, NiS7 und NiS11, eine Lyse von 30 bis 40 % in CA46-Zellen bewirken. Dabei war die Rolle der unterschiedlichen GS-Linkerlängen bemerkenswert. Die Zytotoxizität nahm mit der Länge des Linkers kontinuierlich ab. Dies bekräftigt die Annahme, dass es von Vorteil zu sein scheint, eine enge Verknüpfung zwischen den CD38-Molekülen und somit zwischen den Fc-Regionen der an sie gebundenen Antikörper zu schaffen, um eine komplementabhängige Lyse in den Targetzellen auszulösen.

Der gleiche Abfall in der Zellyse bei zunehmender Linkerlänge wurde auch bei den *JK36*-Homodimeren deutlich. Diese Dimere waren die Einzigen, die nicht um Epitop e2 mit JK2 hcAb konkurrieren, was ihnen die Bildung von Kreuzvernetzungen

ermöglichte und wodurch sie gemeinsam mit JK2 hcAb ähnlich zytotoxisch wirkten, wie jenes in Kombination mit Daratumumab.

Als zweiter Schwere-Ketten-Antikörper wurde *JK36* hcAb mit allen CD38-spezifischen Nanobody-Dimeren an CA46-Zellen getestet (**Abb. 4.12.C.**). Wieder wurden 50 nM Antikörper und 50 nM Dimer mit 1×10^5 Zellen und 15 % humanem Serum inkubiert. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie schon in **Abb. 4.12.B.**, allerdings vice versa. Nur drei der Dimere steigerten die Effektivität von *JK36* hcAb, wobei es sich um NiS1, NiS5 und NiS9 handelte. Diese JK2-Homodimere binden unabhängig von *JK36* an Epitop e2 und können somit die Kreuzvernetzungen erzeugen, die, wie bei der Kombination von JK2 hcAb und distinkt bindenden *JK36*-Dimeren beobachtet wurde, zu einer verstärkten komplementabhängigen Zytotoxizität führten. Im Unterschied zu den anderen Versuchen ließ sich hier nicht erkennen, dass die Linkerlänge einen Einfluss auf die Effektivität zu haben schien, denn die Lyse von NiS1 und NiS9 war auf gleichem Niveau bei 89 %. Der Anteil nekrotischer Zellen bei NiS5 + *JK36* hcAb lag mit 85 % nur minimal darunter.

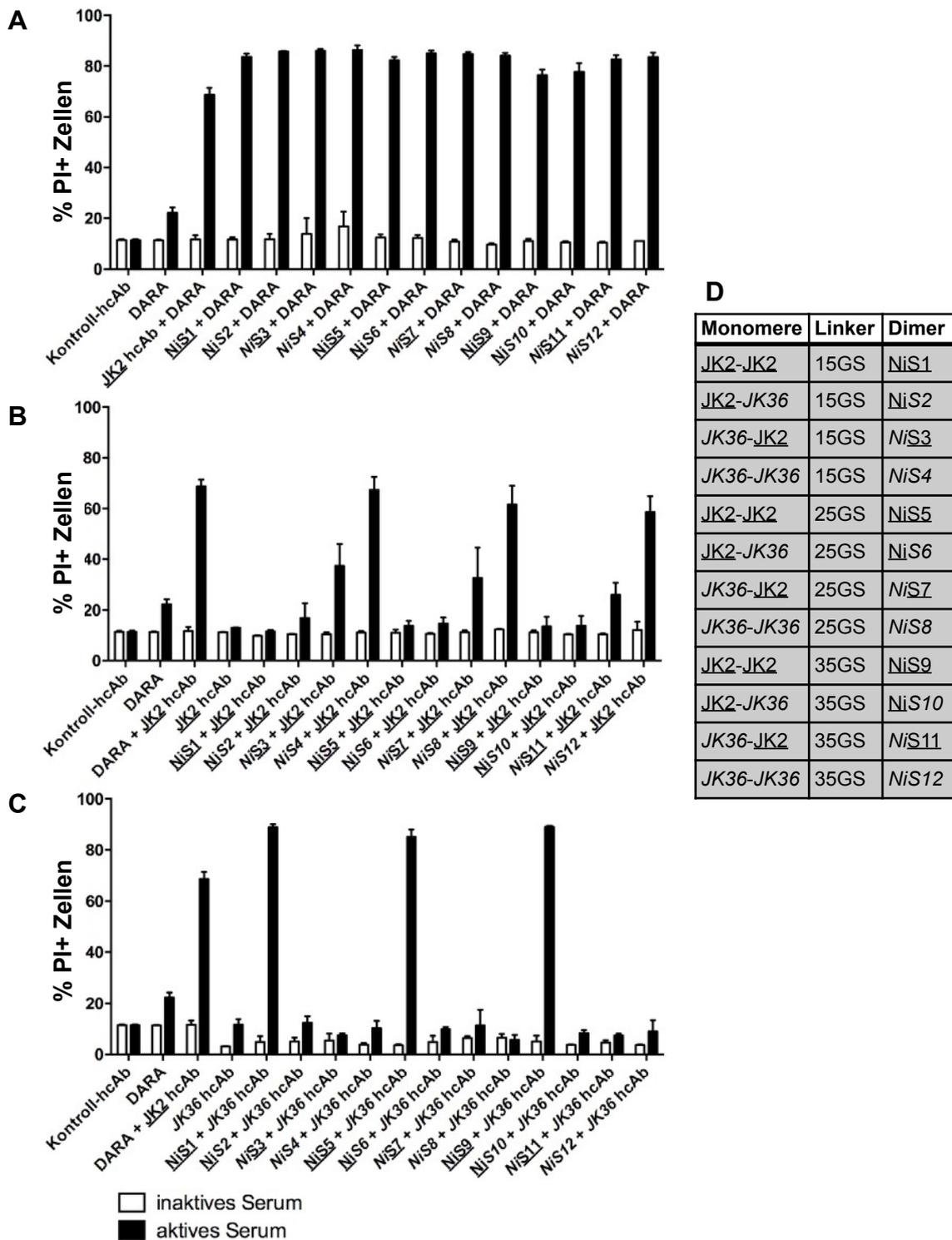


Abb. 4.12.: CDC-Effekt aller Nanobody-Dimere in Kombination mit DARA (A), mit JK2 hcAb (B) und JK36 hcAb (C). In (D) ist eine Legende der verwendeten Nanobodies abgebildet. Es ließ sich beobachten, dass alle Dimere in Kombination mit Daratumumab eine potente CDC induzieren konnten (A). NiS4, NiS8 und NiS12 (JK36-Homodimere) konnten die CDC-Effektivität von JK2 hcAb soweit steigern, wie Daratumumab und JK2 hcAb in Kombination (B). NiS1, NiS5 und NiS9 als JK2-Homodimere waren in der Lage, die CDC-Effektivität von JK36 hcAb maßgeblich zu erhöhen. Unabhängig von der Linkerlänge führte die Koinkubation zu einer Zytolyse von beinahe 90 % (C). 1×10^5 CA46-Zellen wurden mit 50 nM JK2 hcAb + 50 nM NiS-Nanobody-Dimer und 15 % humanem Serum, reaktiviert oder inaktiviert, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach zweifacher Waschung wurden die Zellen resuspendiert und PI als Live/Dead-Staining im Verhältnis 1:500 hinzugegeben. Die Proben wurden im Durchflusszytometer analysiert. Der Versuch wurde in dreifachen Ansätzen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

4.2.5. Nanobody-Dimere in Kombination mit hcAbs unterschiedlicher Spezifität induzieren potente CDC bei nicht-überlappenden Epitopen

In den vorangegangenen CDC-Assays zeichnete sich ab, dass die CD38-spezifischen Nanobody-Dimere als potente Verstärker des CDC-Effekts von Daratumumab sowie in gewissen Kombinationen mit den verschiedenen Schwere-Ketten-Antikörpern fungieren konnten. Auffällig bezogen auf den Großteil der Ansätze, waren die Unterschiede in der Verstärkung der Zytotoxizität von Dimeren mit gleichen V_{HH} s, aber verschiedener Linkerlängen. Obwohl die Abweichungen meist nur marginal waren, kristallisierte sich im Großen und Ganzen heraus, dass je länger ein GS-Linker war, desto ineffizienter war die Aktivierung des Komplementsystems und die mit ihr einhergehende Lyse. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche lediglich NiS1, NiS2, NiS3 und NiS4 mit einem 15GS-Linker verwendet.

Es war entscheidend, welche Dimere in Kombination mit welchen Antikörpern eingesetzt wurden. Hierbei gab es erhebliche Unterschiede, falls Dimer und hcAb eine Spezifität für das gleiche Epitop aufwiesen. Beobachten konnte man, dass bei der Kombination von Homodimer und hcAb gleicher Spezifität eine Lyse vollständig ausblieb. Auch bei der Kombination aus Heterodimer und hcAb, wo die Spezifität eines V_{HH} s des Dimers mit der Spezifität des Schwere-Ketten-Antikörpers übereinstimmt, wurde bis auf die Ausnahmen von JK2 hcAb plus die JK36-JK2-Heterodimere NiS3, NiS7 und NiS11 keine CDC ausgelöst. Die einzig wirksamen Varianten waren die Koinkubationen von einem Dimer und hcAb, deren Spezifitäten sich gänzlich unterschieden, wie zum Beispiel bei JK36 hcAb mit NiS1. Dadurch konnte der Dimer scheinbar als Linker zwischen den CD38-Immunkomplexen agieren.

Um zusätzlichen Aufschluss über die Funktion der Nanobody-Dimere als Verstärker von komplementabhängiger Zytolyse zu erlangen, wurden daher weitere Versuche mit Schwere-Ketten-Antikörpern durchgeführt. Es wurden 1×10^5 CA46-Zellen für eine Stunde bei 37 °C mit 50 nM hcAb und 50 nM V_{HH} -Dimer und 15 % humanem, nativem Serum inkubiert. Auf die Kontrollen mit hitzeinaktiviertem Serum wurde hierbei verzichtet. Da sich bei den vorherigen CDC-Assays herausstellte, dass sich eine kurze Linkerlänge vorteilhaft auf den CDC-Effekt auswirkt, wurden nur die

15GS-Dimere verwendet. Sie wurden mit 22 verschiedenen CD38-spezifischen hcAbs inkubiert, von denen 11 an Epitop e1 binden, 3 an Epitop e2 und 8 an Epitop e3.

Die Effektivität der drei Epitop-e2-hcAbs MU523 hcAb, MU1067 hcAb und JK2 hcAb wurde ausschließlich durch *NiS4* verstärkt (**Abb. 4.13.A**). Wie in **4.2.4.** beschrieben, können sich durch *NiS4*, das als *JK36*-Homodimer exklusiv an Epitop e3 bindet, Kreuzvernetzungen zwischen CD38-Molekülen bilden. Die maximal ausgelöste Lyse von 87 % wurde im Ansatz der Kombination *NiS4* mit MU1067 erreicht. Damit war sie so hoch wie die Lyse der meisten Epitop-e1-bindenden Schwere-Ketten-Antikörpers mit *NiS4* (**Abb. 4.13.C**). Durch die Koinkubation mit NiS1, NiS2 und NiS3 und den Epitop e2 hcAbs ergab sich keine Zytolyse.

In **Abb. 4.13.B** ist die Lyse der 8 hcAbs, welche an Epitop e3 binden, aufgeführt. Die Koinkubation von NiS1 - *NiS4* mit ihnen ließ ein ähnliches Bild erkennen wie in **Abb. 4.12.C** bei der Kombination von *JK36* hcAb den 15GS-Dimeren. Eine Zytolyse wurde nicht ausgelöst bei der Kombination von Antikörpern mit NiS2, NiS3 oder *NiS4*. Jedoch wurden Lyseraten von 75 % bis 91 % bei den Kombinationen NiS1, welches als JK2-Homodimer unabhängig an Epitop e2 bindet, mit *WF9* hcAb, *WF100* hcAb, *WF121* hcAb, *JK19* hcAb und *JK36* hcAb erreicht. Demgegenüber wiesen drei der Antikörper, *WF14* hcAb, *WF42* hcAb und *WF124* hcAb, eine deutlich niedrigere Potenz in der CDC-Induktion als der Rest auf. Trotzdem ging aus allen Ansätzen eine ganz klare Tendenz dahingehend hervor, dass NiS1 ihre Zytotoxizität steigerte und sich durch die Koinkubation von NiS2 - *NiS4* nichts veränderte.

In **Abb. 4.13.C** sind die Lyseraten von den Kombinationen aus Dimeren mit Schwere-Ketten-Antikörpern, die an Epitop e1 binden, dargestellt. Es stellte sich heraus, dass sie in Kombination mit den Heterodimeren NiS2 und NiS3 mit der einzigen Ausnahme von MU1068 hcAb + NiS3 eine Zytolyse von über 80 % in den Zielzellen hervorriefen. Ansätze mit NiS1 waren außer bei *JK22* hcAb durch die geringste Lyse gekennzeichnet. In den Fällen von *MU415* hcAb, *MU738* hcAb, *MU1053* hcAb und *MU1068* hcAb betrug der Anteil der nekrotischen Zellen zwischen 10 und 15 % weniger als der des nächstbesseren Dimers. Die Raten von *NiS4* lagen bei allen Antikörpern mit 74 bis 90 % Lyse auf hohem Niveau mit der Ausnahme bei *WF211* hcAb mit etwa 55 % Zelllyse.

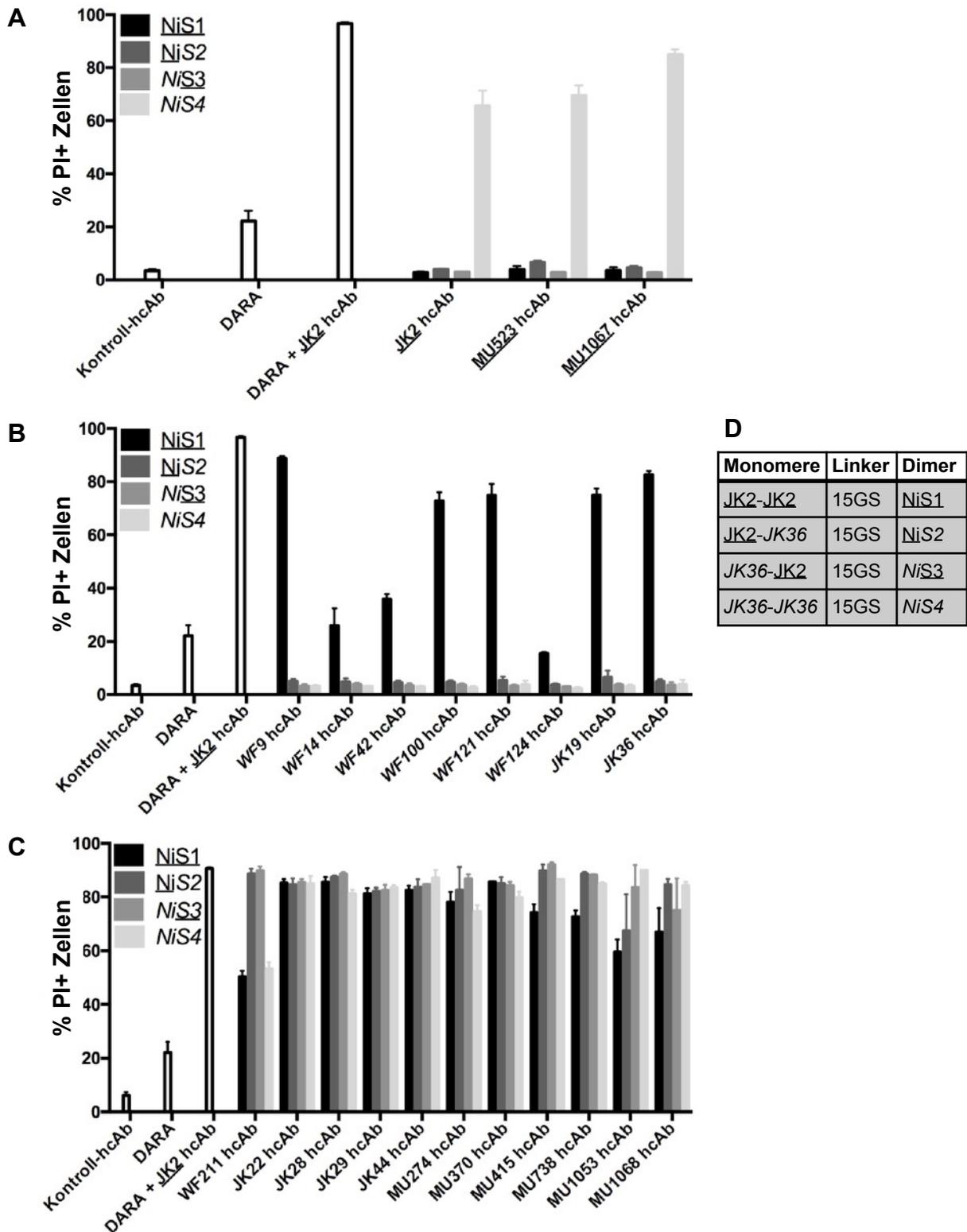


Abb. 4.13.: CDC-Effekt von Nanobody-Dimeren in Kombination mit Epitop e2 hcAbs (A), mit Epitop e3 hcAbs (B) und Epitop e1 hcAbs (C). In (D) ist eine Legende der verwendeten Nanobodies abgebildet. Alle Dimere führen zu ausgeprägtem CDC-Effekt von Epitop-e1-bindenden hcAbs. NiS4 verstärkt Epitop e2 hcAbs und NiS1 verstärkt Epitop e3 hcAbs. Pro Ansatz wurden 1×10^5 CA46-Zellen verwendet. Diese wurden bei 37°C für 1 h mit 50 nM Antikörper + 50 nM NiS-Dimer und 15 % humanen Serum inkubiert. Die Proben wurden zweimal gewaschen und mit PI in Verhältnis 1:500 in 150 μl PBS + 0,2 % BSA resuspendiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Als Kontrolle wurden 100 nM L-15 hcAb eingesetzt und als weitere Kontrollen 100 nM Daratumumab und 50 nM + 50 nM Daratumumab + JK2 hcAb. Der Versuch wurde in Dreifachansätzen durchgeführt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung angeben. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e1, Epitop e2, Epitop e3.

5. Diskussion

5.1. Überblick der Ergebnisse

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden CD38-spezifische Schwere-Ketten-Antikörper und Nanobody-Dimere in Hinblick auf ihr therapeutisches Potential an CD38-positiven Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden maßgeblich zwei Bereiche betrachtet: CDC und Tumor-Xenograft-Modell. Es konnte gezeigt werden, dass in vivo hcAbs allein oder in vitro in Kombination mit Daratumumab oder mit Nanobody-Dimeren eine effektive Zytotoxizität gegenüber CD38-positiven Zellen vermitteln.

Bezüglich der CDC wurde beobachtet, dass einzelne hcAbs keine Effektive Zytolyse an CA46-luc-Zellen hervorrufen konnten. Allerdings stellte sich heraus, dass die Kombination von zwei hcAbs oder Daratumumab mit einem hcAb eine nahezu vollständige Zelllyse erzeugten, wenn die verwendeten Antikörper an verschiedenen Epitopen banden. Zur weiteren Untersuchung dieses Ergebnisses wurden Nanobody-Dimere, welche zum Teil ausschließlich an Epitop e2, Epitop e3 oder an beide gleichzeitig binden konnten, mit hcAbs unterschiedlicher Spezifität kombiniert. Dabei zeigte sich, dass Dimere mit reiner Epitop-e2-Spezifität in Kombination mit einem hcAb mit Epitop-e1- oder Epitop-e3-Spezifität ebenfalls eine vollständige Zelllyse in CA46-Zellen auslösten. Äquivalent dazu verhielt es sich bei der Kombination aus einem reinen Epitop-e3-Dimer mit einem Epitop-e1- oder Epitop-e2-hcAb. Im Folgenden werden die Epitope in Klammern hinter den Antikörpern angegeben.

In den In-vivo-Versuchen dieser Arbeit wurden Mäuse mit CA46-luc-Zellen injiziert, woraufhin die sich entwickelnden Tumoren mit verschiedenen hcAbs und Daratumumab einzeln oder in Kombination therapiert wurden. Dabei zeigte sich, dass Mäuse mit einer Monotherapie bereits ein etwa doppelt so langes Überleben ein deutlich vermindertes Tumorwachstum aufwiesen als Mäuse der Kontrollgruppe. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Kombinationen aus den hcAbs mit Daratumumab noch darüber hinaus ein verlängertes Überleben boten.

5.2. CDC-Aktivierung

CDC-Assays sind einer der Pfeiler für die präklinische Evaluation von monoklonalen Antikörpern. Die Umsetzung *in vitro* und auch ihre Auswertung sind simpel und kostengünstig. Auch *in vivo* gibt es zahlreiche Untersuchungen, die zeigen, welche essentielle Rolle ein funktionierendes Komplementsystems in der Tumorzelllyse einnimmt. Für die Wichtigkeit des CDC-Effekts sprechen Experimente mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab, wobei C1q KO Mäusen Lymphomzellen injiziert und mit Rituximab behandelt wurden. Jene Mäuse verstarben so schnell wie Mäuse ohne Antikörperbehandlung, Wildtyp Mäuse hingegen präsentierten vollständige Remission (Di Gaetano et al., 2003). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Prognose und Progression von kolorektalen Karzinomen negativ mit deren Expression von CD59, einem Inhibitor des Membranangriffskomplexes, einhergingen (Watson et al., 2005).

Die untersuchten CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörper allein wiesen nach der Inkubation mit CA46-luc-Zellen keine Tumorlyse auf. Allerdings war auch Daratumumab (e1) mit einer Lyse von 20 % kein potenter Induktor einer CDC. Kombiniert mit Daratumumab (e1) konnten hingegen JK2 hcAb (e2) und *MU1105* hcAb (e3) eine vollständige Tumorlyse induzieren. Diese Antikörper binden beide eigenständige Epitope von Daratumumab (e1) und können so gleichzeitig mit dem konventionellen Antikörper an CD38 binden. Dieser Effekt konnte bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beobachtet werden (Schütze et al., 2018). CD38 ist nicht das einzige Antigen bei dem zwei Antikörper, die an nicht-überlappende Epitope binden, den CDC-Effekt an betroffenen Zellen maßgeblich verstärken. Ähnliche Ergebnisse konnten bei verschiedenen, distinkt bindenden CD5-spezifischen Antikörpern an CLL-Zellen festgestellt werden (Klitgaard et al., 2013).

Als Grund für die Potenzierung der komplementabhängigen Zytotoxizität wird unter anderem eine höhere Dichte von Immunkomplexen auf der Zelloberfläche und nicht nur eine erhöhte absolute Anzahl an Fc-Regionen der gebundenen Antikörper angenommen. Zwar stehen durch Inkubation von Zellen mit zwei eigenständig bindenden Antikörpern theoretisch doppelt so viele Fc-Regionen für eine Bindung des C1-Komplexes zur Verfügung, allerdings scheinen aber nicht diese zusätzlichen auf der Zelloberfläche befindlichen Fc-Regionen für die verbesserte Aktivierung des

Komplements verantwortlich zu sein, sondern etwas anderes, wie in den CDC-Assays mit den Nanobody-Dimeren bewiesen wurde.

C1q besteht aus 3 Untereinheiten zu je 6 Ketten, die der Komplementkomponente eine maximale Breite von 40 nm verleihen. Die Untereinheiten haben die Form eines „Y“s und besitzen an beiden Armen einen endständigen, kugelförmigen Kopf, welcher an ein Motiv der CH2-Domäne einer Fc-Region binden kann. Die Entfernung dieser Motive unterschiedlicher Fc-Regionen darf zwischen 10 und 40 nm betragen, um von einem C1q gebunden zu werden (Dobrovolskaia and McNeil, 2013). C1q bindet einzelne Fc-Fragmente nur mit einer niedrigen Affinität von 100 μ M und wird idealerweise durch Hexamerisierung von Fc-Regionen gebunden, was die Affinität auf 10 nM erhöht (Duncan and Winter, 1988, Diebolder et al., 2014). Wenn zwei Antikörper, die nicht-überlappende Epitope an CD38 erkennen, mit einem Arm an dasselbe CD38-Molekül binden, besteht die Möglichkeit, dass der jeweils zweite Arm der Immunglobuline an ein anderes CD38-Molekül bindet. Die entstehenden Verkettungen von CD38-Immunkomplexen durch die Kreuzvernetzung führen zu einer größeren Proximität von Fc-Regionen. Um zu eruieren, ob in einem solchen Szenario die Kreuzvernetzungen oder nur die zusätzlichen Fc-Regionen auf der Zelloberfläche eine Rolle in der CDC spielen, wurden in dieser Arbeit CD38-spezifische Nanobody-Dimere, die eben keine Fc-Regionen besitzen, kloniert und produziert. Durch die Kombination dieser Konstrukte mit Daratumumab (e1) oder Schwere-Ketten-Antikörpern, die nicht-überlappend an CD38 banden, konnte gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung der CD38-Immunkomplexe entscheidend für die Aktivierung der Komplementkaskade war.

Die Größe eines Nanobodies wurde anhand seiner Kristallstruktur mit 2,5 nm im Durchmesser und 4 nm in der Höhe berechnet (Revets et al., 2005). Die maximale Länge eines 15GS-Linkers wurde mit 5,7 nm berechnet, woraus sich errechnete Längen von 9,5 nm für einen 25GS-Linker und 13,3 nm für einen 35GS-Linker ergeben (Chen et al., 2013). Daraus wiederum ergeben sich Längen der 15GS-Dimere von 13,7 nm, der 25GS-Dimere von 17,5 nm und der 35GS-Dimere von 21,3 nm. Somit wären rein rechnerisch alle Dimere in der Lage, CD38-Antikörper-Konjugate auf einem so engen Raum kreuzzuvernetzen, dass mindestens zwei Fc-Regionen der gebundenen Antikörper dicht genug beisammen sind, um C1q zu binden und somit mit dem C1-Komplex den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren. In **Abb. 4.12.** wird deutlich, dass kürzere Linkerlängen der

Dimere von 15GS zu einer geringfügig höheren Zellyse führen, als Dimere gleicher Spezifität mit 25GS- oder 35GS-Linkern. Dies erhärtet weiterhin die Vermutung, dass eine größere Nähe der Immunkomplexe bedeutend für die Aktivierung von Komplement sind.

Entscheidend war welche Dimere in Kombination mit welchen Antikörpern eingesetzt wurden. Hierbei gab es erhebliche Unterschiede, falls Dimer und hcAb eine Spezifität für das gleiche Epitop aufwiesen. Die Annahme war, dass bei der Kombination von Homodimer und hcAb gleicher Spezifität eine Kreuzvernetzung unmöglich war, da sie gegenseitig ihre Epitope blockierten (**Abb. 5.1.**). Auch bei der Kombination aus Heterodimer und hcAb gab es demnach eine Blockade, wenn die Spezifität eines $V_{\text{H}}\text{Hs}$ des Dimers mit der Spezifität des Schwere-Ketten-Antikörpers übereinstimmte. So bestünde zwar die Möglichkeit der Kreuzvernetzung von CD38-Molekülen auf der Zelloberfläche, allerdings nicht von CD38-Immunkomplexen mit Fc-Regionen, da Epitope von Dimeren für Schwere-Ketten-Antikörper geblockt wären (**Abb. 5.2.**). Die einzig effektive Variante war die Koinkubation von einem Dimer und Antikörper, deren Spezifitäten sich gänzlich unterschieden, wie zum Beispiel bei *JK36* hcAb (e3) mit *NiS1* (e2-e2). Bei dieser Kombination kommt es durch die Bindung des hcAbs an CD38 zur Ausbildung von Immunkomplexen. Diese CD38-Immunkomplexe werden dann durch die Bindung des Dimers an ein anderes Epitop desselben CD38-Moleküls quervernetzt. Somit entstehen letztendlich Cluster aus vielen Dimeren, Antikörpern und CD38-Molekülen, die jeweils an zwei Stellen miteinander verbunden sind (**Abb. 5.3.**). Mit den beobachteten Ergebnissen ist es vereinbar zu sagen, dass diese Kreuzvernetzungen für eine beobachtete Zellyse in den CA46-Zellen verantwortlich waren.

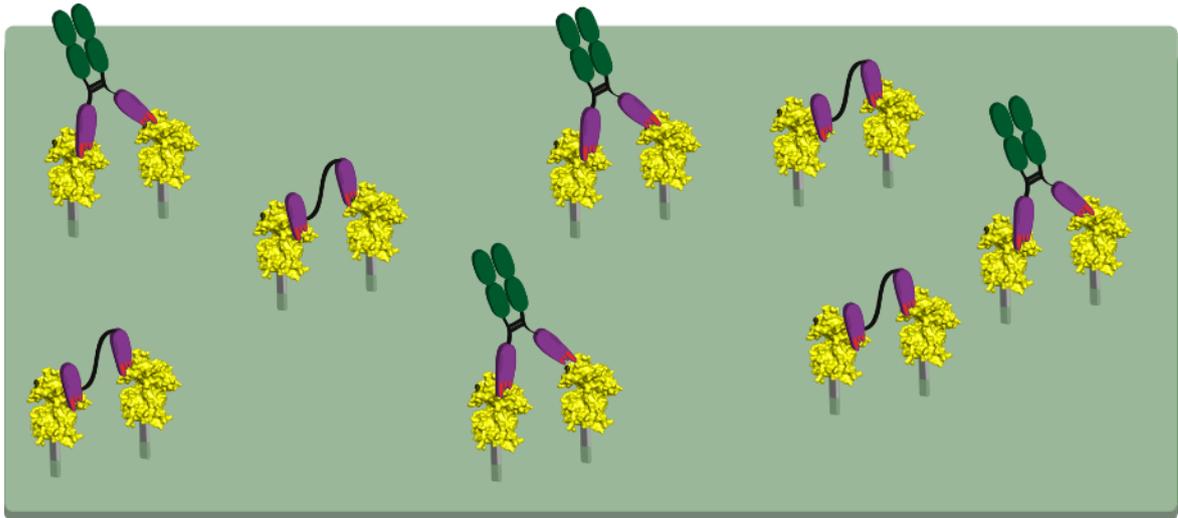


Abb. 5.1.: Schematische Abbildung der Koinkubation von NiS1 (e2-e2) und JK2 hcAb (e2). Bei einer Koinkubation von einem NiS1-Dimer und JK2 hcAb besitzen beide Antikörper die gleiche Spezifität und können jeweils nur ein Epitop an einem CD38-Molekül besetzen. Es besteht zwar die Möglichkeit für hcAb und Dimer jeweils zwei CD38-Moleküle gleichzeitig zu binden, jedoch ist die Entstehung von Kreuzvernetzungen unmöglich. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e2.

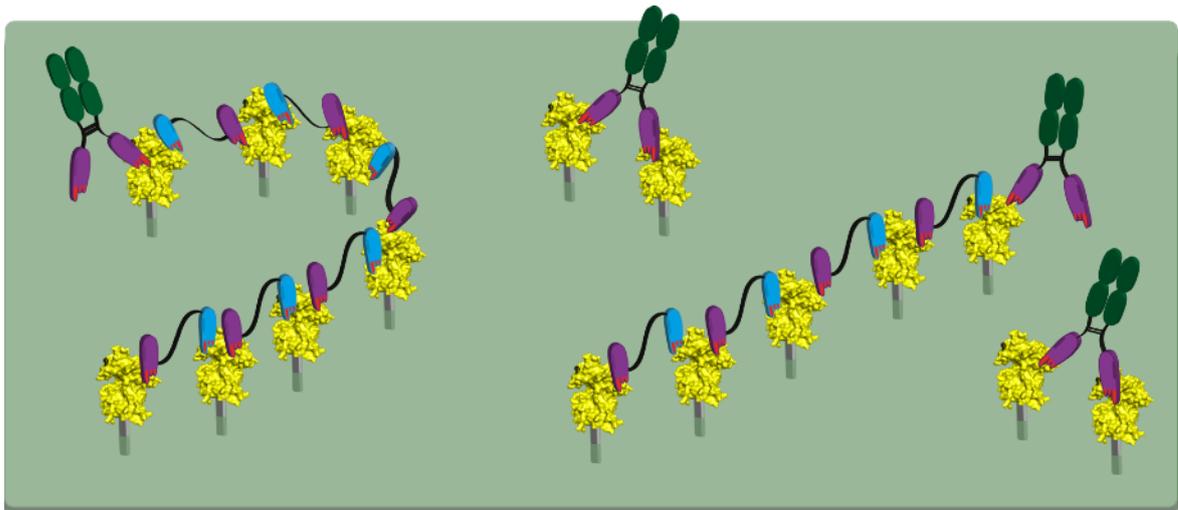


Abb. 5.2.: Schematische Abbildung der Koinkubation von NiS2 (e2-e3) und JK2 hcAb (e2). Durch eine Koinkubation von NiS2 und JK2 hcAb können CD38-Moleküle aufgrund der bispezifischen NiS2-Dimere kreuzvernetzt werden. Die Möglichkeit einer langen Verkettung von CD38-Molekülen besteht. Jedoch können an von Dimeren gebundene CD38-Moleküle keine JK2 hcAbs mehr binden, da durch die Dimere bereits das Epitop e2 besetzt wurde. Die einzige Möglichkeit an eine solche Kreuzvernetzung zu binden, besteht am Ende bzw. am Anfang einer solchen Verkettung. Somit können bei dieser Form von Koinkubation keine vernetzten CD38-Immunkomplexe mit Fc-Teilen gebildet werden. Weiterhin können JK2 hcAbs, wie bei einer Inkubation mit nur diesen Antikörper, zwei CD38-Moleküle gleichzeitig binden, ohne dass weitere NiS2-Dimere involviert sind. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e2, Epitop e3.

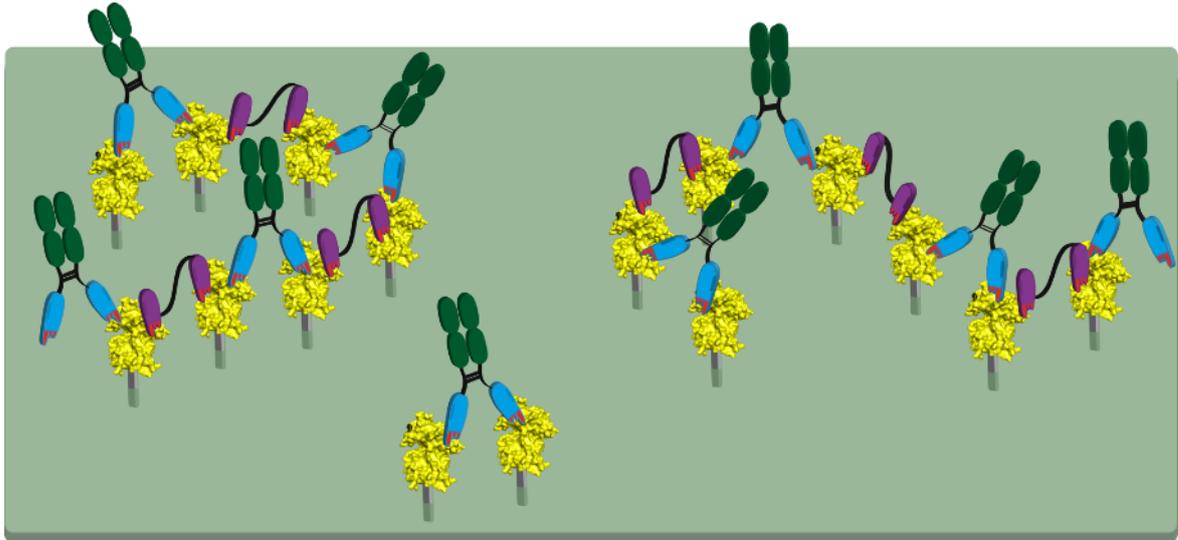


Abb. 5.3.: Schematische Abbildung der Koinkubation von NiS1 (e2-e2) und JK36 hcAb (e3). Die Koinkubation von CA46-Zellen mit NiS1 und JK36 hcAb hat im CDC-Assay eine vollständige Zytolyse hervorgebracht. Der Mechanismus der Kreuzvernetzungen ist hier schematisch dargestellt. CD38-Moleküle können jeweils von JK36 hcAb an Epitop e3 und NiS1-Dimer an Epitop e2 gleichzeitig gebunden werden und somit entstehen nicht nur Kreuzvernetzungen von CD38-Molekülen sondern CD38-Immunkomplexen. Durch die enge Verknüpfung durch die NiS1-Dimere können die Fc-Regionen der Schwere-Ketten-Antikörper dichter zusammenrücken, um somit suffizient C1q zu binden und den C1-Komplex zu aktivieren. Es besteht natürlich immer die Möglichkeit, dass zwei CD38-Moleküle nur von einem NiS1-Dimer oder einem JK36 hcAb gebunden werden, jedoch wäre danach immer noch das jeweils andere Epitop frei zugänglich für den anderen Antikörper. Typographische Darstellung der Epitope: Epitop e2, Epitop e3.

5.3. In-vivo-Effektivität

Maus-Tumor-Xenograft-Modelle, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind eine Möglichkeit Tumorwachstum und Überleben in vivo zu untersuchen. Dazu werden Mäuse mit einem schweren Immundefekt eingesetzt, die dadurch keine Abstoßungsreaktion des Transplantats erfahren. Durch die Verwendung von Luciferase-exprimierenden Tumorzellen wurde die Dokumentation des Tumorwachstums an den lebendigen Tieren zu jedem Zeitpunkt des Versuchs möglich (Christoph et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden 10 Behandlungsgruppen mit Daratumumab, Daratumumab und hcAb, nur hcAb oder hcAb mit Fc-Mutationen beobachtet. Zwei Werte waren dabei am Ende maßgeblich von Bedeutung. Einerseits die Dauer des Überlebens, andererseits das emittierte Biolumineszenzsignal, welches mit dem Tumorwachstum korrelierte. Betrachtete man letzteres in den Gruppen, die lediglich mit einem hcAb behandelt wurden, so schnitten alle drei hcAbs, WF211 hcab (e1), JK2 hcAb (e2) und *MU1105* hcAb (e3), mit einem niedrigeren Biolumineszenzsignal also besser ab als Daratumumab (e1) (**Abb. 4.4.A**). In den Gruppen, in denen eine Kombinationsbehandlung aus Daratumumab und hcAb durchgeführt wurde, stellte sich die Kombination aus Daratumumab (e1) und WF211 hcAb (e1) als effektivste dar (**Abb. 4.4.B**). Verglich man die Biolumineszenz mit den Daten des durchschnittlichen Überlebens (**Abb. 4.5.**), kam man zu dem Schluss, dass in diesen Fällen die beiden Werte nicht genau korrelierten. Das Biolumineszenzsignal wurde nur bis einschließlich Tag 49 post injectionem gemessen und ebenso wurde die Therapie ab diesem Tag eingestellt. Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass die Tumorgröße in den besagten Gruppen bis zu diesem Zeitpunkt kleiner war und nach Therapieende ein erneutes verstärktes Wachstum stattgefunden hat oder aber, dass nicht die gesamte Tumorgröße, sondern das Auftreten von Tumoren an für die Antikörper unzugänglichen Stellen die wichtigere Einflussgröße der Überlebenszeit darstellt. Um dies zu prüfen, wäre ein weiteres Maus-Xenograft-Modell notwendig, bei dem Imaging und Treatment bis zum Tod der Mäuse fortgeführt werden.

Die Tumorverteilung konnte in allen Gruppen, die mit nativem hcAb, Daratumumab oder beidem behandelt wurden, gleich beschrieben werden. Tumoren in Geweben, die einfach zugänglich für die applizierten Antikörper waren, waren stark reduziert und in Ex-vivo-Analysen nur in Kopf, Gehirn und nur teilweise in peripheren

Lymphknoten nachweisbar (**Abb. 4.7.B**). Im Gegensatz dazu präsentierten sich die Mäuse in den Gruppen der Fc-Mutationsvarianten von WF211 (e1) und in der Kontrollgruppe mit Tumoren in leicht zugänglichen Organen wie der Milz oder den Nieren (**Abb. 4.7.A**). Dies könnte dafür sprechen, dass in den Mäusen der hcAb- und Daratumumab-Gruppen zirkulierende Tumorzellen besser abgetötet wurden und nur dort anwachsen konnten, wo die Antikörper sie nicht erreichten. Denn in den besagten abdominalen Organen ließen sich bei Mäusen, die mit Antikörpern mit nativem Fc-Teil behandelt wurden, keine Tumoren nachweisen.

Weiterhin wurde ersichtlich, dass während der Behandlung mit beiden Fc-Mutationsvarianten von WF211 ein deutlich stärkeres Tumorstadium auftrat und die therapierten Mäuse eher verstarben als bei der nativen Fc-Variante von WF211 (**Abb. 4.4.A, Abb. 4.5.A**). Bei WF211 -/- war dies zu erwarten, da auch in In-vitro-Vorversuchen keine merkliche Aktivierung von Komplementsystem oder NK-Zellen zu Tage traten (**Abb. 4.1., Abb. 4.2.B**). Im Gegensatz dazu war WF211 +/+ allein in der Lage, eine vollständige Lyse in CDC-Versuchen und eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität in ADCC-Assays hervorzurufen. Nichtsdestotrotz verhielten sich die beiden Behandlungsgruppen in vivo ähnlich bezogen auf Tumorstadium und -verteilung sowie das durchschnittliche Überleben. Möglicherweise konnte die mutierte CH2-Domäne der „verbesserten“ WF211 Variante nicht die Effektormechanismen der Maus adäquat aktivieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich Löslichkeitseigenschaften des Antikörpers durch die Mutationen veränderten und somit nicht den gewünschten Effekt erzielten. Die Überprüfung warum eine mutierte Fc-Region in In-vitro-Experimenten einen anderen Effekt zeigt als in vivo könnte ebenfalls Bestandteil zukünftiger Arbeiten sein.

In den In-vivo-Experimenten konnten somit einige Beobachtungen gemacht werden, die teils mit unserem bisherigen Wissenstand plausibel erklärbar sind, aber mit der Diskrepanz zwischen gemessener Tumorstadium und Überleben der Mäuse, der Dauer der Behandlung und der Ineffektivität der Fc-Mutationsvarianten bestehen in Zukunft noch offene Fragen. Weitere Mausversuche mit weniger Gruppen und einem gezielten Fokus auf jene Fragestellungen wären ethisch vertretbare Optionen, um ein passendes Modell bezüglich der Therapie zu etablieren.

5.4. Ausblick für Schwere-Ketten-Antikörper und Nanobodies in der Therapie von Tumoren

Schwere-Ketten-Antikörper sind eine relativ neue Sparte der Immunotherapie und daher im klinischen Setting bei Weitem nicht so gut erforscht wie konventionelle Antikörper bezüglich ihrer Wirkung und Immunogenität.

In den 1980er Jahren wurde in einer Studie herausgefunden, dass als Antwort auf die Behandlung mit vollständig murinen Antikörpern von den Probanden humane anti-Maus-Antikörper (HAMAs) gebildet wurden. Anders als erwartet, konnte keine klinische Toxizität von dieser Immunreaktion ausgehend beobachtet werden, sowie keine Abnahme der Effektivität der murinen Antikörper (Schroff et al., 1985). In den einigen darauffolgenden Untersuchungen ließ sich sogar ein verlängertes Überleben durch eine erhöhte Immunogenität von Antikörpern feststellen, besonders wenn von Probanden anti-Idiotyp-Antikörper gebildet wurden. Darunter versteht man Antikörper, welche an Teile der variablen Domäne eines anderen Antikörpers binden (Mirick et al., 2004).

Der erste jemals von der FDA im Februar 2019 und von der EMA im August 2018 zugelassene bivalente Nanobody, Caplacizumab, richtet sich gegen die A1 Domäne des von-Willebrand-Faktors und wird bei der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) eingesetzt (Scully et al., 2019). Bereits in der präklinischen Zulassungsphase konnte ihm eine gute Verträglichkeit und geringe Immunogenität bescheinigt werden (Bartunek et al., 2008, Peyvandi et al., 2016). In einer Studie mit 145 Patienten erwies sich die Behandlung mit Caplacizumab als sehr effektiv und zeigte eine geringe Nebenwirkungsrate. Bei 3 % der Patienten ließen sich Anti-Idiotyp-Antikörper nachgewiesen werden, eine Änderung der Effektivität des Nanobodies gab es dadurch nicht (Scully et al., 2019).

Bezüglich der Immunogenität von Antikörper-Tags gab es keine Hinweise, dass Mäuse in Versuchen, bei denen Polyhistidin-getaggte Antikörper zum Einsatz kamen, eine gegen die Tags gerichtete Immunreaktion ablief (Watson et al., 2011). So waren auch in jenen in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzten humanen Seren keine Antikörper gegen Hexahistidin- oder Myc-Tags nachweisbar (**Abb. 4.11.**), was allerdings nicht zwangsläufig bedeutet, dass nicht die Möglichkeit einer sich gegen jene Tags gerichtete Immunantwort besteht.

Bevor die Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, allerdings in der Tumorthherapie am Menschen zum Einsatz kommen können, bedarf es noch weiterer präklinischer Evaluation. Die hier eingesetzten Zelllinien waren Burkitt-Lymphom-Zellen, die CD38 überexprimierten. Diese sind einfach in der Handhabung und finden in vielen Laboren Anwendung. Jedoch sollte als nächster Schritt die Überprüfung der erzielten Ergebnisse an verschiedenen Myelomzelllinien folgen, da sie schlussendlich das in der Therapie angepeilte Target darstellen. Überdies wurde die Antikörperwirkung bisher nur in ADCC- und CDC-Assays getestet. Ein weiterer Aspekt, um eine Übersicht zu bekommen, wie gut die Antikörper sich in vitro gegen CD38⁺-Tumoren behaupten, ist die ADCP, die methodisch eine größere Herausforderung darstellt als die beiden anderen Prinzipien.

Sollten die Antikörper auch dort zufriedenstellende Ergebnisse erzielen, würde im Anschluss die Übertragung auf menschliches Material in Form von einer ex vivo Antikörpertestung an primären Knochenmarkszellen von Patienten erfolgen, die an einem Multiplen Myelom erkrankt sind. Durch diese Testung können ebenfalls weitere Erkenntnisse über die Verträglichkeit der Antikörpertherapie bezüglich anderer Blutzellen, die CD38 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, gewonnen werden. Erst danach könnte eine klinische Studie in vivo am Menschen in Betracht gezogen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass noch weitere Schritte in der Erforschung der Nanobodies folgen müssen, bevor Menschen mit ihnen behandelt werden können, jedoch konnten bei den Untersuchungen dieser Arbeit einige positive Effekte beobachtet werden und somit sind die Ergebnisse sehr vielversprechend für zukünftige Arbeiten.

6. Kurzfassung

Das Multiple Myelom ist eine neoplastische Erkrankung, die sich in malignen Plasmazellen manifestiert. Zu den Therapieoptionen gehören Proteasom-Inhibitoren, immunmodulatorische Medikamente und neuerdings der monoklonale Antikörper Daratumumab. Daratumumab richtet sich gegen CD38, welches von Myelomzellen überexprimiert wird. 1993 eröffnete sich ein neues Feld in der Antikörperforschung als in Dromedaren die Schwere-Ketten-Antikörper (hcAbs) entdeckt wurden. Die Besonderheiten an ihnen sind die fehlenden leichten Ketten und ihre V_HH-Domänen, die sogenannten Nanobodies. Diese zeichnen sich beispielsweise durch ihre geringe Größe, gute Löslichkeit und hohe Stabilität aus. Im Februar 2019 wurde mit Caplacizumab der erste Nanobody-Dimer von der FDA zugelassen.

In dieser Arbeit wurden gegen CD38 gerichtete hcAbs und Nanobodies auf ihre antitumoralen Eigenschaften getestet. Dies erfolgte zunächst mit hcAbs in CDC- und ADCC-Assays an Burkitt-Lymphom-Zellen und später durch ihren Einsatz in einem Maus-Tumor-Xenograft-Modell. Der zweite Teil der Arbeit bestand aus der Klonierung, Produktion und Testung von bivalenten Nanobody-Dimeren. Dabei wurde das Augenmerk hauptsächlich auf den CDC-Effekt der Dimere in Kombination mit hcAbs gelegt. In den Experimenten des ersten Teils stellte sich heraus, dass die Effektivität der hcAbs in ADCC-Assay und Mausversuch mit der von Daratumumab vergleichbar war. Die CDC-Assays zeigten, dass die Kombination von zwei Antikörpern, die an unterschiedliche Epitope banden, eine vollständige Tumorlyse erbrachte, wobei die einzelnen Antikörper beinahe keinen Effekt zeigten. Diese vollständige Lyse wurde ebenfalls bei den Nanobody-Dimeren beobachtet, die nur als Linker zwischen CD38-Molekülen dienten und sie somit kreuzvernetzten, wenn man sie mit einem hcAb anderer Spezifität koinkubierte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die verwendeten CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörper in ihrer antitumoralen Funktion mit dem mAb Daratumumab vergleichbar sind. Weiterhin könnten die entwickelten Dimere eine potentielle Verbesserung der bisher etablierten antikörperbasierten Tumorthherapie des Multiplen Myeloms darstellen.

7. Abstract

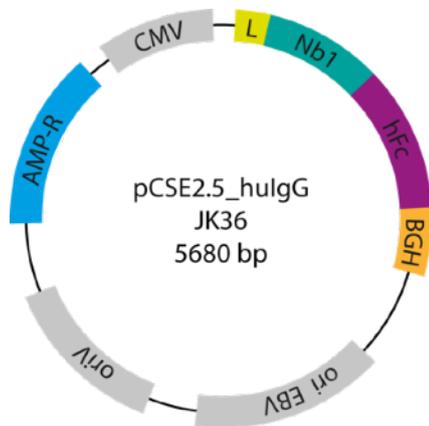
Multiple myeloma is a neoplastic disease, which manifests itself in malignant plasma cells. The therapeutic options consist of proteasome inhibitors, immunomodulatory drugs and recently the monoclonal antibody Daratumumab. Daratumumab is directed against CD38, which is overexpressed by myeloma cells. 1993 a new field in antibody research opened up as heavy-chain antibodies (hcAbs) were discovered in dromedaries. Their special features are the missing light chains and their V_HH domains, the so-called nanobodies. They distinguish themselves from conventional antibodies in their small size, high solubility and stability. In February 2019 the first nanobody-dimer Caplacizumab was approved by the FDA.

In this study the antitumor ability of hcAbs and nanobodies directed against CD38 were tested. First, this was examined with hcAbs in CDC and ADCC assays on Burkitt lymphoma cells and thereafter in a mouse tumor xenograft model. The second part of this study consisted of cloning, production and testing of bivalent nanobody dimers. The focus laid on the CDC effect of the dimers in combination with hcAbs. In ADCC assays and the mouse model the effectivity of the hcAbs were comparable with Daratumumab. In CDC assays it became apparent that the combination of two antibodies binding distinct epitopes caused a complete lysis of the tumor, whereas single hcAbs barely exhibited any effect. This complete lysis was also observed with nanobody dimers, which only served as a linker between CD38 molecules thus cross-linking them, when they were coincubated with an hcAb targeting another distinct epitope of CD38.

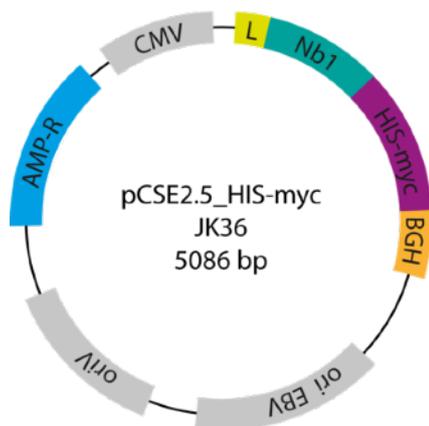
The results of this study demonstrate that CD38-specific heavy-chain antibodies are comparable to the mAb Daratumumab in their antitumor function. Furthermore the generated dimers could present themselves as a potential improvement to the already established tumor therapy of multiple myeloma.

8. Anhang

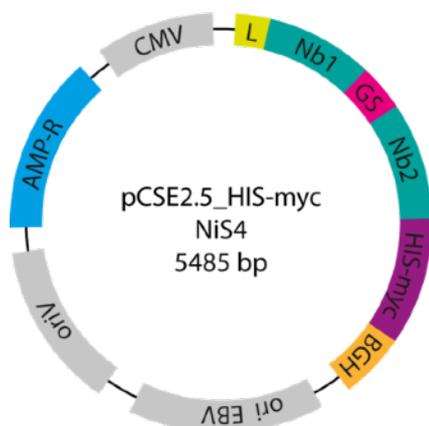
8.1. Plasmidkarten



human-IgG-Expressionsvektor



HIS-myc-Expressionsvektor



HIS-myc-Expressionsvektor
mit Nanobody-Dimer-Insert

8.2. Sequenzen der Nanobody-Dimere

NiS1 (JK2-JK2, 15GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVG
YVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQ
VTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS2 (JK2-JK36, 15GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVA
AITSRGTNYADSVKGRFTISSDNAENTVSLQMNLLKPGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQ
VTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS3 (JK36-JK2, 15GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGTNYA
DSVKGRFTISSDNAENTVSLQMNLLKPGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVG
YVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQ
VTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS4 (JK36-JK36, 15GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGTNYA
DSVKGRFTISSDNAENTVSLQMNLLKPGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVA
AITSRGTNYADSVKGRFTISSDNAENTVSLQMNLLKPGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQ
VTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS5 (JK2-JK2, 25GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQ
APGKQRELVGYYVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHY
AAGRDIWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS6 (JK2-JK36, 25GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIWGQGTQVTVSSGGGG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQ
APGKQRELVAAITSRGTNYADSVKGRFTISSDNAENTVSLQMNLLKPGDTAVYYCNADHT
FAGVYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS7 (JK36-JK2, 25GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSTNYA
DSVKGRFTISRDAENTVSLQMNSLKPAGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GKQRELVGYYVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAG
RDYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS8 (JK36-JK36, 25GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSTNYA
DSVKGRFTISRDAENTVSLQMNSLKPAGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GKQRELVAAITSRGSTNYADSVKGRFTISRDAENTVSLQMNSLKPAGDTAVYYCNADHTFAG
VYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS9 (JK2-JK2, 35GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDRYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
RNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNNLKPEDTAV
YYCNYWHYAAGRDRYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS10 (JK2-JK36, 35GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYA
DSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDRYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
YVCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS11 (JK36-JK2, 35GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSTNYA
DSVKGRFTISRDAENTVSLQMNSLKPAGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
NTMGWYRQAPGKQRELVGYYVGSMTNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNNLKPEDTAVY
YCNYWHYAAGRDRYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

NiS12 (JK36-JK36, 35GS-Linker)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGSTNYA
DSVKGRFTISRDAENTVSLQMNSLKPAGDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
YCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

Komplementarität-determinierende Regionen: CDR1, CDR2, CDR3

GS-Linker

His-Myc-Tag

8.3. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ADCC | antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>) |
| ADCP | antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (<i>antibody dependent cellular phagocytosis</i>) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ADPR | ADP-Ribose |
| ADPRP | ADP-Ribose-2'-Phosphat |
| APC | Allophycocyanin |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATRA | all-trans-Retinsäure (<i>all-trans-retinoic acid</i>) |
| BCA | Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>) |
| BLI | Biolumineszenzintensität |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| cADPR | zyklische ADP-Ribose |
| Carb | Carbenicillin |
| CD | Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (<i>cluster of differentiation</i>) |
| CDC | komplementabhängige Zytotoxizität (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>) |
| CDR | Komplementarität-determinierende Region (<i>complementarity determining region</i>) |
| CDTa | <i>Clostridium difficile</i> Toxin A |
| CH | konstante Domäne der schweren Kette (<i>constant domain of the heavy chain</i>) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CXCL | CXC-Motiv-Chemokin |
| CXCR | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor |
| DARA | Daratumumab |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |

| | |
|----------------|--|
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| E:T | Effektor-Target-Ratio |
| et al. | und andere |
| FACS | Durchflusszytometrie (<i>fluorescent activated cell sorting</i>) |
| Fc | konstante Region eines Antikörpers (<i>fragment crystallizable</i>) |
| FCS | Fetales Kalbserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FDA | U. S. Food and Drug Administration |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GM-CSF | Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor |
| GS | Glycin-Serin-Linker |
| hcAb | Schwere-Ketten-Antikörper (<i>heavy chain antibody</i>) |
| HEK | humane, embryonale Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>) |
| HLA | humanes Histokompatibilitätsantigen (<i>human leukocyte antigen</i>) |
| hu | human |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| IVC | <i>individually ventilated cage</i> |
| IVIS | <i>in vivo imaging system</i> |
| i.v. | intravenös |
| kDa | Kilodalton |
| KIR | Killer-Zell Immunoglobulin-like Rezeptor |
| KO | Ausschalten eines Gens (<i>knock-out</i>) |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| luc | Luciferase-transduziert |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| MAC | Membranangriffskomplex (<i>membrane attack complex</i>) |
| MEM | Zellkulturmedium (<i>minimum essential medium</i>) |
| MES | 2-Morpholinoethansulfonsäure |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| MM | Multiples Myelom |

| | |
|------------------|--|
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MWCO | molekulare Ausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>) |
| NAADP | Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat |
| NAD | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NADP | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| Nb | Nanobody |
| NK | Natürliche Killerzelle |
| NTA | Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM | <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> |
| PEI | Polyethylenimin |
| PI | Propiumiodid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| RPMI | Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institut) |
| RT | Raumtemperatur |
| scFv | Antikörperfragment bestehend aus kovalent gebundenen V _H und V _L (<i>single chain variable Fragment</i>) |
| SCID | schwerer kombinierter Immundefekt (<i>severe combined immunodeficiency</i>) |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SIRP | Signal-regulatorisches Protein |
| SM | Supermarker |
| SOC | <i>super optimal broth</i> + 20 nM Glukose |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TRPM | Kationenkanal (<i>transient receptor potential channel of melastatin subfamily</i>) |
| UV | Ultraviolett |
| V _H | variable Domäne der schweren Kette |
| V _H H | Nanobody (<i>variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies</i>) |
| V _L | variable Domäne der leichten Kette |
| ZAP | <i>Zeta-chain-associated protein kinase</i> |

9. Literaturverzeichnis

ADEBANJO, O. A., MOONGA, B. S., YAMATE, T., SUN, L., MINKIN, C., ABE, E. & ZAIDI, M. 1998. Mode of Action of Interleukin-6 on Mature Osteoclasts. Novel Interactions with Extracellular Ca(2+) Sensing in the Regulation of Osteoclastic Bone Resorption. *The Journal of Cell Biology*, 142, 1347-1356.

AN, G., ACHARYA, C., FENG, X., WEN, K., ZHONG, M., ZHANG, L., MUNSHI, N. C., QIU, L., TAI, Y.-T. & ANDERSON, K. C. 2016. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: therapeutic implication. *Blood*, 128, 1590-1603.

ANDERSON, K. C. 2012. Bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30, 445-452.

ARBABI GHAHROUDI, M., DESMYTER, A., WYNS, L., HAMERS, R. & MUYLDERMANS, S. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 414, 521-526.

ARBABI-GHAHROUDI, M. 2017. Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Frontiers in Immunology*, 8, 1589.

BANNAS, P., HAMBACH, J. & KOCH-NOLTE, F. 2017. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8, 1603.

BARTUNEK, J., BARBATO, E., HOLZ, J.-B., VERCRUYSE, K., ULRICHTS, H., ABLYNX, N. V. & HEYNDRICKX, G. 2008. Abstract 2009: ALX-0081 a Novel Anti-Thrombotic: Results of a Single-Dose Phase 1 Study in Healthy Volunteers and Further Development in Patients with Stable Angina Undergoing PCI. *Circulation*, 118, 656.

BURGER, J. A., TSUKADA, N., BURGER, M., ZVAIFLER, N. J., DELL, AQUILA, M. & KIPPS, T. J. 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96, 2655.

CHAKRAVARTY, R., GOEL, S. & CAI, W. 2014. Nanobody: The "Magic Bullet" for Molecular Imaging? *Theranostics*, 4, 386-398.

CHEN, X., ZARO, J. & SHEN, W.-C. 2013. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Advanced drug delivery reviews*, 65, 1357-1369.

CHRISTOPH, S., SCHLEGEL, J., ALVAREZ-CALDERON, F., KIM, Y.-M., BRANDAO, L. N., DERYCKERE, D. & GRAHAM, D. K. 2013. Bioluminescence imaging of leukemia cell lines in vitro and in mouse xenografts: effects of monoclonal and polyclonal cell populations on intensity and kinetics of photon emission. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 10-10.

CHURCHILL, G. C., OKADA, Y., THOMAS, J. M., GENAZZANI, A. A., PATEL, S. & GALIONE, A. 2002. NAADP Mobilizes Ca²⁺ from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs. *Cell*, 111, 703-708.

COSTA, F., TOSCANI, D., CHILLEM, A., QUARONA, V., BOLZONI, M., MARCHICA, V., VESCOVINI, R., MANCINI, C., MARTELLA, E., CAMPANINI, N., SCHIFANO, C., BONOMINI, S., ACCARDI, F., HORENSTEIN, A. L., AVERSA, F., MALAVASI, F. & GIULIANI, N. 2017. Expression of CD38 in myeloma bone niche: A rational basis for the use of anti-CD38 immunotherapy to inhibit osteoclast formation. *Oncotarget*, 8, 56598-56611.

DE GENST, E., SILENCE, K., DECANNIERE, K., CONRATH, K., LORIS, R., KINNE, J., MUYLDERMANS, S. & WYNS, L. 2006. Molecular basis for the preferential cleft recognition

by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4586-4591.

DEAGLIO, S., MEHTA, K. & MALAVASI, F. 2001. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Research*, 25, 1-12.

DEAGLIO, S., MORRA, M., MALLONE, R., AUSIELLO, C. M., PRAGER, E., GARBARINO, G., DIANZANI, U., STOCKINGER, H. & MALAVASI, F. 1998. Human CD38 (ADP-Ribosyl Cyclase) Is a Counter-Receptor of CD31, an Ig Superfamily Member. *The Journal of Immunology*, 160, 395.

DEAGLIO, S., VAISITTI, T., AYDIN, S., BERGUI, L., ARENA, G., BONELLO, L., OMEDÉ, P., SCATOLINI, M., JAKSIC, O., CHIORINO, G., EFREMOV, D. & MALAVASI, F. 2007. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*, 110, 4012.

DEAGLIO, S., VAISITTI, T., BERGUI, L., BONELLO, L., HORENSTEIN, A. L., TAMAGNONE, L., BOUMSELL, L. & MALAVASI, F. 2005. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*, 105, 3042.

DHEILLY, E., MOINE, V., BROYER, L., SALGADO-PIRES, S., JOHNSON, Z., PAPAIOANNOU, A., CONS, L., CALLOUD, S., MAJOCCHI, S., NELSON, R., ROUSSEAU, F., FERLIN, W., KOSCO-VILBOIS, M., FISCHER, N. & MASTERNAK, K. 2017. Selective Blockade of the Ubiquitous Checkpoint Receptor CD47 Is Enabled by Dual-Targeting Bispecific Antibodies. *Mol Ther*, 25, 523-533.

DI GAETANO, N., CITTERA, E., NOTA, R., VECCHI, A., GRIECO, V., SCANZIANI, E., BOTTO, M., INTRONA, M. & GOLAY, J. 2003. Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *The Journal of Immunology*, 171, 1581.

DIEBOLDER, C. A., BEURSKENS, F. J., DE JONG, R. N., KONING, R. I., STRUMANE, K., LINDORFER, M. A., VOORHORST, M., UGURLAR, D., ROSATI, S., HECK, A. J. R., VAN DE WINKEL, J. G. J., WILSON, I. A., KOSTER, A. J., TAYLOR, R. P., SAPHIRE, E. O., BURTON, D. R., SCHUURMAN, J., GROS, P. & PARREN, P. W. H. I. 2014. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science (New York, N.Y.)*, 343, 1260-1263.

DIMOPOULOS, M. A., ORIOL, A., NAHI, H., SAN-MIGUEL, J., BAHLIS, N. J., USMANI, S. Z., RABIN, N., ORLOWSKI, R. Z., KOMARNICKI, M., SUZUKI, K., PLESNER, T., YOON, S. S., BEN YEHUDA, D., RICHARDSON, P. G., GOLDSCHMIDT, H., REECE, D., LISBY, S., KHOKHAR, N. Z., O'ROURKE, L., CHIU, C., QIN, X., GUCKERT, M., AHMADI, T., MOREAU, P. & INVESTIGATORS, P. 2016. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 375, 1319-1331.

DOBROVOLSKAIA, M. A. & MCNEIL, S. E. 2013. Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials, Singapore, N.J: World Scientific Pub. Co.

DRACH, J., MCQUEEN, T., ENGEL, H., ANDREEFF, M., ROBERTSON, K. A., COLLINS, S. J., MALAVASI, F. & MEHTA, K. 1994. Retinoic Acid-induced Expression of CD38 Antigen in Myeloid Cells Is Mediated through Retinoic Acid Receptor- α . *Cancer Research*, 54, 1746.

DUNCAN, A. R. & WINTER, G. 1988. The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332, 738.

ECKER, D. M., JONES, S. D. & LEVINE, H. L. 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, 7, 9-14.

ELS CONRATH, K., LAUWEREYS, M., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. 2001. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem*, 276, 7346-50.

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, Y. J., CHEUNG LEE, H., MALAVASI, F., GOLDBAUM, F., VAN HEGELSOM, R., STORTELEERS, 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. *Scientific Reports*, 7, 14289.

FUNARO, A., MORRA, M., CALOSSO, L., ZINI, M. G., AUSIELLO, C. M. & MALAVASI, F. 1997. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*, 49, 7-15.

GRAEFF, R., MUNSHI, C., AARHUS, R., JOHNS, M. & LEE, H. C. 2001. A single residue at the active site of CD38 determines its NAD cyclizing and hydrolyzing activities. *J Biol Chem*, 276, 12169-73.

HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMMERS, C., SONGA, E. B., BENDAHMAN, N. & HAMMERS, R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363, 446.

HANSEL, T. T., KROPSHOFER, H., SINGER, T., MITCHELL, J. A. & GEORGE, A. J. T. 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 325.

HOWARD, M., GRIMALDI, J. C., BAZAN, J. F., LUND, F. E., SANTOS-ARGUMEDO, L., PARKHOUSE, R. M., WALSETH, T. F. & LEE, H. C. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, 262, 1056.

HUSTON, J. S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M. S., NOVOTNÝ, J., MARGOLIES, M. N., RIDGE, R. J., BRUCCOLERI, R. E., HABER, E. & CREA, R. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 5879-5883.

ITOH, M., ISHIHARA, K., TOMIZAWA, H., TANAKA, H., KOBUNE, Y., ISHIKAWA, J., KAISHO, T. & HIRANO, T. 1994. Molecular Cloning of Murine BST-1 Having Homology with CD38 and *Aplysia* ADP-Ribosyl Cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 1309-1317.

JACKSON, D. G. & BELL, J. I. 1990. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *The Journal of Immunology*, 144, 2811.

KLITGAARD, J. L., KOEFOED, K., GEISLER, C., GADEBERG, O. V., FRANK, D. A., PETERSEN, J., JURLANDER, J. & PEDERSEN, M. W. 2013. Combination of two anti-CD5 monoclonal antibodies synergistically induces complement-dependent cytotoxicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 163, 182-193.

KLOS, A., TENNER, A. J., JOHNSWICH, K.-O., AGER, R. R., REIS, E. S. & KÖHL, J. 2009. The Role of the Anaphylatoxins in Health and Disease. *Molecular immunology*, 46, 2753-2766.

KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. 2005. Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497. *The Journal of Immunology*, 174, 2453.

KORTÜM, M., DRIESSEN, C., EINSELE, H., GOLDSCHMIDT, H., GUNSILIUS, E., KROPFF, M., KRÖGER, N., LIEBISCH, P., LUDWIG, H., NAUMANN, R., PEEST, D., TAVERNA, C. & WÖRMANN, B. 2013. Leitlinie Multiples Myelom. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie*.

LEE, H. C. 2006. Structure and Enzymatic Functions of Human CD38. *Molecular Medicine*, 12, 317-323.

LEE, H. C. & AARHUS, R. 1991. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regulation*, 2, 203-209.

LIU, H.-X., MA, S., NAN, Y. & YANG, W.-H. 2016. Transient receptor potential melastatin-2 and temperature participate in the process of CD38-regulated oxytocin secretion. *NeuroReport*, 27, 935-939.

LIU, J. K. H. 2013. The history of monoclonal antibody development. *Annals of Medicine and Surgery*, 3, 113-116.

LOKHORST, H. M., PLESNER, T., LAUBACH, J. P., NAHI, H., GIMSING, P., HANSSON, M., MINNEMA, M. C., LASSEN, U., KREJCIK, J., PALUMBO, A., VAN DE DONK, N. W., AHMADI, T., KHAN, I., UHLAR, C. M., WANG, J., SASSER, A. K., LOSIC, N., LISBY, S., BASSE, L., BRUN, N. & RICHARDSON, P. G. 2015. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 373, 1207-19.

MALAVASI, F., DEAGLIO, S., DAMLE, R., CUTRONA, G., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. 2011. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*, 118, 3470-3478.

MALAVASI, F., DEAGLIO, S., FUNARO, A., FERRERO, E., HORENSTEIN, A. L., ORTOLAN, E., VAISITTI, T. & AYDIN, S. 2008. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiological Reviews*, 88, 841-886.

MALAVASI, F., FUNARO, A., ROGGERO, S., HORENSTEIN, A., CALOSSO, L. & MEHTA, K. 1994. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunology Today*, 15, 95-97.

MALLONE, R., FUNARO, A., ZUBIAUR, M., BAJ, G., AUSIELLO, C. M., TACCHETTI, C., SANCHO, J., GROSSI, C. & MALAVASI, F. 2001. Signaling through CD38 induces NK cell activation. *Int Immunol*, 13, 397-409.

MICHAELSEN, T. E., THOMMESEN, J. E., IHLE, O., GREGERS, T. F., SANDIN, R. H., BREKKE, O. H. & SANDLIE, I. 2006. A mutant human IgG molecule with only one C1q binding site can activate complement and induce lysis of target cells. *European Journal of Immunology*, 36, 129-138.

MIRICK, G. R., BRADT, B. M., DENARDO, S. J. & DENARDO, G. L. 2004. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies Not four letter words. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48, 251-257.

MUNSHI, C., AARHUS, R., GRAEFF, R., WALSETH, T. F., LEVITT, D. & LEE, H. C. 2000. Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 275, 21566-71.

NELSON, D. L., KURMAN, C. C. & SERBOUSEK, D. E. 2001. 51Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc.

NEWMAN, P. J. 1999. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 5-9.

NIJHOF, I. S., GROEN, R. W. J., LOKHORST, H. M., VAN KESSEL, B., BLOEM, A. C., VAN VELZEN, J., DE JONG-KORLAAR, R., YUAN, H., NOORT, W. A., KLEIN, S. K., MARTENS, A. C. M., DOSHI, P., SASSER, K., MUTIS, T. & VAN DE DONK, N. W. C. J. 2015. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia*, 29, 2039.

NOGUCHI, N., TAKASAWA, S., NATA, K., TOHGO, A., KATO, I., IKEHATA, F., YONEKURA, H. & OKAMOTO, H. 1997. Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsomes. *J Biol Chem*, 272, 3133-3136.

OVERDIJK, M. B., JANSEN, J. H. M., NEDEREND, M., LAMMERTS VAN BUEREN, J. J., GROEN, R. W. J., PARREN, P. W. H. I., LEUSEN, J. H. W. & BOROSS, P. 2016. The Therapeutic CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Induces Programmed Cell Death via Fcγ Receptor-Mediated Cross-Linking. *The Journal of Immunology*, 197, 807.

OVERDIJK, M. B., VERPLOEGEN, S., BÖGELS, M., VAN EGMOND, M., VAN BUEREN, J. J. L., MUTIS, T., GROEN, R. W. J., BREIJ, E., MARTENS, A. C. M., BLEEKER, W. K. & PARREN, P. W. H. I. 2015. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *mAbs*, 7, 311-320.

PALUMBO, A., CHANAN-KHAN, A., WEISEL, K., NOOKA, A. K., MASSZI, T., BEKSAC, M., SPICKA, I., HUNGRIA, V., MUNDER, M., MATEOS, M. V., MARK, T. M., QI, M., SCHECTER, J., AMIN, H., QIN, X., DERAEDT, W., AHMADI, T., SPENCER, A., SONNEVELD, P. & INVESTIGATORS, C. 2016. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 375, 754-66.

PEYVANDI, F., SCULLY, M., KREMER HOVINGA, J. A., CATALAND, S., KNOBL, P., WU, H., ARTONI, A., WESTWOOD, J. P., MANSOURI TALEGHANI, M., JILMA, B., CALLEWAERT, F., ULRICHTS, H., DUBY, C., TERSAGO, D. & INVESTIGATORS, T. 2016. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 374, 511-22.

PFISTER, M., OGILVIE, A., DA SILVA, C. P., GRAHNERT, A., GUSE, A. & HAUSCHILD, S. 2001. NAD degradation and regulation of CD38 expression by human monocytes/macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 268, 5601-5608.

QUARONA, V., ZACCARELLO, G., CHILLEMI, A., BRUNETTI, E., SINGH, V. K., FERRERO, E., FUNARO, A., HORENSTEIN, A. L. & MALAVASI, F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom*, 84, 207-17.

REVETS, H., DE BAETSELIER, P. & MUYLDERMANS, S. 2005. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 111-124.

ROMERO-RAMÍREZ, H., MORALES-GUADARRAMA, M. T., PELAYO, R., LÓPEZ-SANTIAGO, R. & SANTOS-ARGUMEDO, L. 2015. CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. *Immunology*, 144, 271-281.

ROOVERS, R. C., VOSJAN, M. J. W. D., LAEREMANS, T., EL KHOULATI, R., DE BRUIN, R. C. G., FERGUSON, K. M., VERKLEIJ, A. J., VAN DONGEN, G. A. M. S. & VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P. 2011. A bi-paratopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 129, 2013-2024.

SARMA, J. V. & WARD, P. A. 2011. The Complement System. *Cell and tissue research*, 343, 227-235.

SCHROFF, R. W., FOON, K. A., BEATTY, S. M., OLDHAM, R. K. & MORGAN, A. C. 1985. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. *Cancer Research*, 45, 879.

SCHÜTZE, K., PETRY, K., HAMBACH, J., SCHUSTER, N., FUMEY, W., SCHRIEWER, L., RÖCKENDORF, J., MENZEL, S., ALBRECHT, B., HAAG, F., STORTELERS, C., BANNAS, P. & KOCH-NOLTE, F. 2018. CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. *Frontiers in Immunology*, 9.

SPECTOR, N. L. & BLACKWELL, K. L. 2009. Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 5838-5847.

SUN, L., ADEBANJO, O. A., MOONGA, B. S., CORISDEO, S., ANANDATHEERTHAVARADA, H. K., BISWAS, G., ARAKAWA, T., HAKEDA, Y., KOVAL, A., SODAM, B., BEVIS, P. J. R., MOSER, A. J., LAI, F. A., EPSTEIN, S., TROEN, B. R., KUMEGAWA, M. & ZAIDI, M. 1999. Cd38/Adp-Ribosyl Cyclase: A New Role in the Regulation of Osteoclastic Bone Resorption. *The Journal of Cell Biology*, 146, 1161-1172.

SUN, L. I., ADEBANJO, O. A., KOVAL, A., ANANDATHEERTHAVARADA, H. K., IQBAL, J., WU, X. Y., MOONGA, B. S., WU, X. B., BISWAS, G., BEVIS, P. J. R., KUMEGAWA, M., EPSTEIN, S., HUANG, C. L. H., AVADHANI, N. G., ABE, E. & ZAIDI, M. 2002. A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca²⁺ signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD⁺ sensor. *The FASEB Journal*, 16, 302-314.

SUN, L. I., IQBAL, J., DOLGILEVICH, S., YUEN, T., WU, X.-B., MOONGA, B. S., ADEBANJO, O. A., BEVIS, P. J. R., LUND, F., HUANG, C. L. H., BLAIR, H. C., ABE, E. & ZAIDI, M. 2003. Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption. *The FASEB Journal*, 17, 369-375.

TOGASHI, K., HARA, Y., TOMINAGA, T., HIGASHI, T., KONISHI, Y., MORI, Y. & TOMINAGA, M. 2006. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *The EMBO Journal*, 25, 1804-1815.

UNGER, M., EICHHOFF, A. M., SCHUMACHER, L., STRYSIO, M., MENZEL, S., SCHWAN, C., ALZOGARAY, V., ZYLBERMAN, V., SEMAN, M., BRANDNER, J., ROHDE, H., ZHU, K., HAAG, F., MITTRÜCKER, H.-W., GOLDBAUM, F., AKTORIES, K. & KOCH-NOLTE, F. 2015. Selection of Nanobodies that Block the Enzymatic and Cytotoxic Activities of the Binary Clostridium Difficile Toxin CDT. *Scientific Reports*, 5, 7850.

USMANI, S. Z., WEISS, B. M., PLESNER, T., BAHLIS, N. J., BELCH, A., LONIAL, S., LOKHORST, H. M., VOORHEES, P. M., RICHARDSON, P. G., CHARI, A., SASSER, A. K., AXEL, A., FENG, H., UHLAR, C. M., WANG, J., KHAN, I., AHMADI, T. & NAHI, H. 2016. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 128, 37-44.

VAISITTI, T., AYDIN, S., ROSSI, D., COTTINO, F., BERGUI, L., D'ARENA, G., BONELLO, L., HORENSTEIN, A. L., BRENNAN, P., PEPPER, C., GAIDANO, G., MALAVASI, F. & DEAGLIO, S. 2010. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 24, 958.

VALLARIO, A., CHILOSI, M., ADAMI, F., MONTAGNA, L., DEAGLIO, S., MALAVASI, F. & CALIGARIS-CAPPIO, F. 1999. Human myeloma cells express the CD38 ligand CD31. *British Journal of Haematology*, 105, 441-444.

VAN DE DONK, N. W. C. J., JANMAAT, M. L., MUTIS, T., LAMMERTS VAN BUEREN, J. J., AHMADI, T., SASSER, A. K., LOKHORST, H. M. & PARREN, P. W. H. I. 2016. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews*, 270, 95-112.

VAN DE DONK, N. W. C. J., RICHARDSON, P. G. & MALAVASI, F. 2018. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood*, 131, 13.

WANG, W., ERBE, A. K., HANK, J. A., MORRIS, Z. S. & SONDEL, P. M. 2015. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6, 368.

WATSON, D. S., PLATT, V. M., CAO, L., VENDITTO, V. J. & SZOKA, F. C. 2011. Antibody Response to Polyhistidine-Tagged Peptide and Protein Antigens Attached to Liposomes via Lipid-Linked Nitrilotriacetic Acid in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology* : *CVI*, 18, 289-297.

WATSON, N. F. S., DURRANT, L. G., MADJD, Z., ELLIS, I. O., SCHOLEFIELD, J. H. & SPENDLOVE, I. 2005. Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55, 973.

WEI, W., GRAEFF, R. & YUE, J. 2014. Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway. *World Journal of Biological Chemistry*, 5, 58-67.

WEISKOPF, K. & WEISSMAN, I. L. 2015. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *mAbs*, 7, 303-310.

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, D. V., GOLDBAUM, F. A., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198, 157-174.

WÜRZNER, R. 2000. Modulation of complement membrane attack by local C7 synthesis. *Clinical and Experimental Immunology*, 121, 8-10.

ZUPO, S., RUGARI, E., DONO, M., TABORELLI, G., MALAVASI, F. & FERRARINI, M. 1994. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *European Journal of Immunology*, 24, 1218-1222.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Peter Bannas für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die regelmäßigen Besprechungen während meiner Laborzeit. Ebenfalls einen besonderen Dank möchte ich gegenüber meinem Betreuer Prof. Dr. Friedrich Nolte aussprechen für die zahlreichen Hilfestellungen im Verlauf meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich all meinen Forschungskollegen der AG Nolte und AG Bannas für die schöne und spannende Zeit danken. Namentlich erwähnen möchte ich hier allen voran Birte Albrecht, die mir bei der Einarbeitung und über das Jahr hinweg eine sehr große Hilfe war. Julia Hambach bin ich ebenfalls sehr dankbar für ihre Unterstützung bei der Meisterung von Adobe Illustrator. Für den Beistand an langen Labortagen und Motivationsengpässen danke ich außerdem Marten Junge, Nikolina Pantelic und Dilan Aytan.

Ich möchte außerdem Levin Schriewer, William Fumey und Kerstin Schütze für die Vorarbeiten, die sie auf dem Gebiet der CD38-bezogenen Tumorforschung bereits geleistet und mir nahegebracht haben, und für die Kooperation einiger Experimente danken. Dazu gilt mein Dank auch Michael Horn-Glander für die Hilfe bei der Durchführung der IVIS-Messungen.

Mein privater Dank geht an meine Familie und an meine Freunde, auf die ich immer zählen kann und die mir auch während schlechter Zeiten immer beigestanden haben.

11. Lebenslauf (entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)

12. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: