

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Direktor Prof. Dr. med. Marcus Altfeld

Herstellung und Fc-Engineering CD38-spezifischer Schwereketten-Antikörper für eine effektivere Zytotoxizität gegenüber Myelomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Kokou Mensah Raphael William Fumey

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
02.11.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Gerhard Adam

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde bereits publiziert :

Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38 + tumors in mouse models in vivo

Fumey W, Koenigsdorf J, Kunick V, Menzel S, Schütze K, Unger M, Schriewer L, Haag F, Adam G, Oberle A, Binder M, Guse A, Zhao YJ, Cheung Lee H, Malavasi F, Goldbaum F, van Hegelsom R, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F.
Sci Rep. 2017 Oct 30

CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity against Multiple Myeloma Cells

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.
Front Immunol. 2018 Nov 19; 9

Nanobody-based CD38-specific heavy chain antibodies induce killing of multiple myeloma and other hematological malignancies

Schriewer L, Schütze K, Petry K, Hambach J, **Fumey W**, Koenigsdorf J, Baum N, Menzel S, Rissiek B, Riecken K, Fehse B, Röckendorf JL, Schmid J, Albrecht B, Pinnschmidt H, Ayuk F, Kröger N, Binder M, Schuch G, Hansen T, Haag F, Adam G, Koch-Nolte F, Bannas P.
Theranostics. 2020 Feb 3

Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection.

Bannas P, Lenz A, Kunick V, Well L, **Fumey W**, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Schütze K, Eichhoff A, Trepel M, Adam G, Ittrich H, Koch-Nolte F.
Contrast Media Mol Imaging. 2015 Sep-Oct

Validation of nanobody and antibody based in vivo tumor xenograft NIRF-imaging experiments in mice using ex vivo flow cytometry and microscopy.

Bannas P, Lenz A, Kunick V, **Fumey W**, Rissiek B, Schmid J, Haag F, Leingärtner A, Trepel M, Adam G, Koch-Nolte F.
J Vis Exp. 2015 Apr 6

Antigen-binding polypeptides directed against cd38

Friedrich Nolte, Peter Bannas, Kerstin Schütze, **William Fumey**, Levin Schriewer, Stephan Menzel, Catelijne Stortelers
Patentnummer: WO2017081211A2
2016

1.	Einleitung	8
1.1.	CD38 als Target für das Multiple Myelom	8
1.2.	Nanobodies und Nanobody-basierte Schwereketten-Antikörper	10
1.3.	Fc-Engineering für die Verstärkung der Ak-vermittelten Zytotoxizität	13
1.4.	Zielsetzung	16
2.	Material	17
2.1.	Primer	17
2.2.	DNA-Sequenz der bestellten humanen Fc-Fragmente mit den entsprechenden Mutationen	18
2.3.	Enzyme	19
2.4.	Chemikalien	19
2.5.	Lösungen	20
2.6.	Enzyme	20
2.7.	Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA	21
2.8.	Verwendete Kits (kommerziell erhältlich)	21
2.9.	Antikörper	21
3.	Methoden	22
3.1.	Phagendisplay	22
3.2.	Selektion an CD38 exprimierenden Zellen nach Blockade bekannter Epitope	22
3.3.	Reinfektion der TG1 <i>E. coli</i> Bakterien	24
3.4.	Isolierung von Plasmiden aus gepickten Klonen	24
3.5.	Transformation und periplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	25
3.6.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.7.	Fc-Fragment - Mutagenese	27
3.7.1.	Einführung einer Punktmutation durch PCR-Mutagenese	27

3.7.2.	Einführung der Mutationen durch Subklonierung	28
3.8.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	29
3.9.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	30
3.10.	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.11.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	30
3.12.	Ligation von DNA-Fragmenten	30
3.13.	Transformation und Kultivierung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	31
3.14.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
3.15.	Kultivieren und Passagieren von Zellen	31
3.16.	Transfektion und transiente Expression in HEK293-6E Zellen	32
3.17.	Aufreinigung von HEK-Zellüberständen	33
3.17.1.	Aufreinigung der Zellüberstände mittels Ni-NTA Säulen zur Gewinnung von 6His-Myc tragenden Proteinen	33
3.17.2.	Aufreinigung der Zellüberstände mittels Protein G Säule zur Gewinnung von Fc-Tag tragenden Proteinen	33
3.18.	Quantifizierung von Proteinen	34
3.19.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.20.	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	34
3.21.	Durchflusszytometrie (FACS)	34
3.21.1.	Spezifizitäts-Assay	35
3.21.2.	Titrations-Assay	35
3.21.3.	Aviditäts-Assay	36
3.21.4.	Kreuzblockade-Assay	36
3.21.5.	CDC-Assay	36
3.22.	ADCC-Assay	37
3.22.1.	Vorarbeit	37
3.22.2.	Biolumineszenz-Versuche	38

4.	Ergebnisse	39
4.1.	Selektion und Charakterisierung von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern	39
4.1.1.	Bestätigung der CD38-Expression der verwendeten Zellen	39
4.1.2.	Selektion der CD38-spezifischen Nanobodies	40
4.1.3.	Periplasmatische Expression und Bindungskontrolle der selektionierten Nanobodies	48
4.1.4.	Umklonierung der Nanobodies in den eukaryotischen pCSE2.5 Vektor und Produktion rekombinanter Nanobodies und Schwerekettenantikörper in HEK-6E Zellen	50
4.1.5.	Monovalente Nanobody-His/Myc und bivalente Nanobody-hlgG1 Schwereketten-Antikörper binden spezifisch an CD38 exprimierende Zellen	53
4.1.6.	Ermittlung der relativen Bindungsstärken der rekombinanten Nanobodies und Schwereketten-Antikörper	54
4.1.6.1.	Titrationenversuche	54
4.1.6.2.	Dissoziations-Assay	57
4.1.7.	Epitopkartierung	59
4.2.	Fc-Engineering von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern	64
4.2.1.	Einführung von Mutationen durch Punktmutation oder Klonierung	64
4.2.2.	Heterodimerisierung der Nanobody-Schwereketten-Antikörper durch Knob-in-Hole Mutation	64
4.2.3.	Modulation der Bindung von Schwereketten-Antikörpern an den C1q Komplementfaktor und an Fcγ-Rezeptoren.	65
4.2.4.	Produktion der modifizierten Schwereketten-Antikörper.	68
4.3.	Zytotoxische Effektorfunktionen von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern	70

4.3.1.	Titrationenanalysen zeigen eine weiterhin hohe Bindung der mutierten Nb-Schwereketten-Antikörper an CD38 exprimierende Zellen	70
4.3.2.	Die Einführung der E345R Mutation führt zu einer verbesserten Bindung von C1q an antikörperbeladene LP-1 Myelomzellen.	71
4.3.3.	Die Einführung der E345R Mutation führt zu einem starken CDC	73
4.3.4.	Heterodimere Nb-Schwereketten-Antikörper zeigen eine effektive Induktion der komplementabhängigen Zellyse.	78
4.3.5.	CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper induzieren ADCC	80
5.	Diskussion	83
6.	Ausblick	88
7.	Zusammenfassung	89
8.	Summary	90
9.	Abkürzungsverzeichnis	91
10.	Literaturverzeichnis	92
11.	Danksagung	99
12.	Lebenslauf	100
13.	Eidesstattliche Versicherung	101

1. Einleitung

1.1. CD38 als Target für das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM), auch bekannt als Morbus Kahler, ist ein niedrigmalignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom mit diffuser Durchsetzung des Knochenmarks durch einen Klon maligner transformierter Plasmazellen. Es ist mit fünf auf hunderttausend Neuerkrankungen jährlich der häufigste Tumor von Knochenmark und Knochen, wobei ein Auftreten erst ab dem 45. Lebensjahr beobachtet wird (Herold, 2013).

Nach klonaler Vermehrung einer entarteten Plasmazelle infiltriert diese das Knochenmark und produziert Immunglobuline einer einheitlichen Struktur oder nur freie Leichtketten (Paraproteine). Dies kann zu einem Antikörpermangelsyndrom und einer entsprechenden Infektanfälligkeit führen. Die Paraproteine können durch Einlagerung in die Niere zum nephrotischen Syndrom führen. Die hohe Konzentration an Immunglobulinen kann auch zum Hyperviskositätssyndrom und zu Polyneuropathien führen. Folge der Infiltration des Knochenmarks durch die entarteten Plasmazellen ist eine Panzytopenie durch die Verdrängung des blutbildenden Knochenmarks. Myelomzellen haben keine eigene osteolytische Aktivität, sondern stimulieren Osteoklasten und hemmen die Osteoblastenfunktion. Dies führt zu Knochenschmerzen, Spontanfrakturen und hyperkalzämischen Krisen. Meist führt die Expansion der entarteten Zelle zum Tod. Für die Behandlung des MM wurden Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib und neue Immuntherapeutika zugelassen (Kumar, et al., 2008). Trotzdem liegt die relative 10-Jahres-Überlebensrate nur bei ca 30% (Leitlinien DGHO Stand Mai 2018). Damit ergibt sich die Notwendigkeit neuer lebensverlängernder bzw. kurativer Behandlungen. Zur Diagnostik des MM werden aktuell noch radiologische Schnittbildverfahren und zytogenetische Analysen eingesetzt. Neuartige Verfahren zur früheren Erkennung des MM könnten entwickelt werden. Antikörper gegen hoch exprimierte Membranproteine gewinnen für die Diagnostik und Therapie des MM zunehmend an Bedeutung (Petrucci & Vozella, 2019) (Chim, et al., 2019).

CD38 ist die wichtigste extrazelluläre NAD-Hydrolase der Säugetiere (**Abbildung 1**). Es ist ein multifunktionelles Ektoenzym, das neben der Hydrolyse von NAD zu ADP-Ribose und Nikotinamid auch die Synthese von zyklischer ADP-Ribose

(cADPR) aus NAD und von Nicotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP) aus Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADP) katalysiert (Wei, Graeff, & Yue, 2014) (Chini, Chini, Espindola Netto, de Oliveira, & van Schooten, 2018) (Hogan, Chini, & Chini, 2019).

Humanes CD38 ist etabliert als Tumormarker für das MM, da seine Expression auf der Oberfläche dieser Leukozyten erhöht ist (Nakayama, et al., 2012). Somit bietet dieses Oberflächenmolekül einen vielversprechenden Ansatz für den Einsatz Antikörper-basierter Therapien. CD38-spezifische Antikörper sind bereits als Therapeutikum für die Behandlung des MM zugelassen (Daratumumab seit 2016, Isatuximab seit 2020) (Mateos, et al., 2019) (Terpos, Ntanasis-Stathopoulos, & International Myeloma Society, 2020). Untersuchungen von Knochenmarksproben in den ersten klinischen Studien mit Daratumumab-Monotherapie (GEN501 und Sirius) zeigten, dass Patienten mit einer relativ hohen CD38-Expression eine partielle Remission eher erreichten als Patienten, deren Tumorzellen eine geringere Zelloberflächenexpression von CD38 aufwiesen (Nijhof, et al., 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD38-spezifische Nbs und Nb-basierte Schwereketten-Antikörper kloniert und charakterisiert.

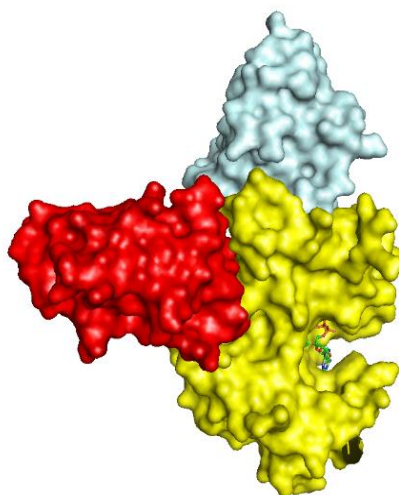


Abbildung 1: Schematische Darstellung zweier Nanobodies gebunden an humanes CD38. Das Modell des humanen Ektoenzym CD38 (gelb), der an Epitop 1 bindende Nb MU274 (grau) und der an Epitop 3 bindende Nb MU523 (rot) wurden aus den Koordinaten von drei Kristallstrukturen (PDB-ID: 2i65, 5f21, 5f10) mit der Software Pymol aufgearbeitet. Das Substrat NAD im aktiven Zentrum von CD38 ist als Stäbchenmodell dargestellt.

1.2. Nanobodies und Nanobody-basierte Schwereketten-Antikörper

Konventionelle Antikörper bestehen in der Regel aus zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten, die sich y-förmig zusammenlagern (**Abbildung 2**). Dabei besteht die leichte Kette aus einer variablen Domäne, gefolgt von einer konstanten Domäne, und die schwere Kette ebenfalls aus einer variablen Domäne und einem konstanten Teil, bestehend aus 3 Fragmenten (CH1, CH2 und CH3). Die CH1 Region wird über eine hinge-Region mit CH2 und CH3 verbunden. CH2 und CH3 bilden zusammen den Fc-Teil des Antikörpers (Chiu, 2016). Der Fc-Teil spielt durch die Interaktion mit Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von verschiedenen Immunzellen eine wichtige Rolle in Zellyse-Mechanismen. Die zweite wichtige Region ist die Antigenbindungsstelle. Diese ist gebildet durch die insgesamt 6 complementarity determining regions (CDR) der beiden variablen Domänen.

Kameliden bilden zusätzlich zu konventionellen Antikörpern eine zweite Klasse von Antikörpern, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen (Hoey, Eom, & Horn, 2019) (Chanier & Chames, 2019). Die Antigenbindungsstelle besteht also nur aus einer variablen Domäne, die als VHH (*Variable domain of the heavy chain of heavy chain only antibodies*) bezeichnet wird. Diese Domäne hat eine Größe im Nanometerbereich (~ 15 kDa, 4 nm lang und 2,5 nm breit). Daher wird diese Antikörper-Domäne auch als Nanobody (Nb) bezeichnet. Nbs können aus peripheren B-Lymphozyten von immunisierten Lamas über die Phagen-Display-Technologie spezifisch angereichert werden.

Nbs zeigen ein hohes Antigenbindungsrepertoire. Die Antigenpezifität ist determiniert durch die drei hypervariablen CDRs (De Genst & Silence, 2006). Dank ihrer einfachen Struktur, hohen Löslichkeit und Stabilität können Nbs kostengünstig und in hoher Ausbeute rekombinant produziert werden. Ein zusätzlicher Vorteil der hohen Löslichkeit und Stabilität von Nbs ist die einfache Klonierung in unterschiedliche multivalente Formate und die Generierung von Schwereketten-Antikörpern (Wesolowski & Alzogaray, 2009). Nbs können für diagnostische und therapeutische Anwendungen gegenüber konventionellen Antikörpern Vorteile zeigen, z.B. eine hohe Gewebeporosität und rasche renale Eliminierung (Gainkam & al., 2008) (Unger, 2012) (Bannas P., 2015).

Für die vorliegende Arbeit standen bereits CD38-spezifische Nbs aus der Arbeitsgruppe Nolte zur Verfügung (Koenigsdorf, 2016) (Unger, 2012) (Patentnr. WO2017081211A2, 2016,). Hierzu waren zwei Lamas mit rekombinant hergestelltem, deglykosyliertem, humanem CD38 (Unger, 2012) und zwei weitere Lamas mit Plasmid-DNA, die für das humane CD38 kodiert, immunisiert worden. Anschließend wurde das VHH-Repertoire mittels spezifischer Oligonukleotide PCR-amplifiziert und in den Phage Display Vektor pHEN2 kloniert. Phagenbibliotheken wurden durch Transformation des genannten Vektors in *E. coli* Bakterien generiert. Durch Panning an CD38-exprimierenden Zellen waren fünfzehn Nanobodyfamilien selektioniert und die Bindungsepitope einiger dieser Nbs durch Kristallographie definiert worden (**Abbildung 1**) (Unger, 2012) (Koenigsdorf, 2016) (Li, Qi, Unger, & Nan Hou, 2016). Nach Subklonierung wurden rekombinante Nb-Monomere und Nb-Dimere ohne Fc-Domänen sowie bivalente und tetravalente Schwereketten-Antikörper mit humanen Fc-Domänen als rekombinante Proteine in transient transfizierten HEK Zellen produziert (**Abbildung 2**).

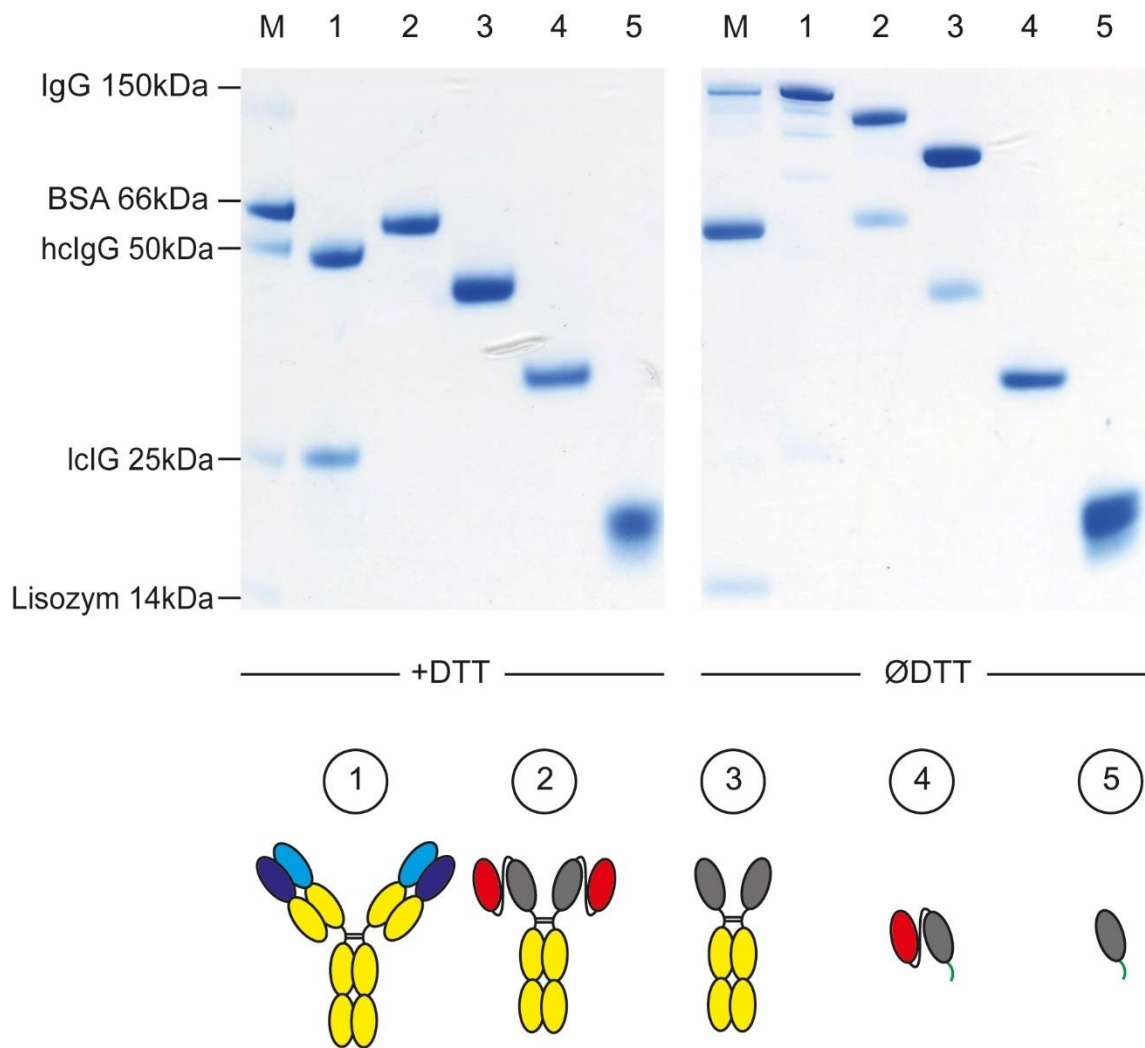


Abbildung 2 SDS-PAGE Analyse der im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper mit schematischer Darstellung des Aufbaus dieser Konstrukte. Die aufgereinigten Konstrukte wurden mit (+ DTT) oder ohne (Ø DTT) Reduktionsmittel mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. **1:** Konventioneller humaner IgG1 Antikörper, 150 kDa (variable Domänen in blau, konstante Domänen in Gelb). **2:** Tetravalenter Schwereketten-Antikörper, 120 kDa: Fusion eines Nb-Dimers an die Hinge- und Fc-Domänen von humanem IgG1. **3:** Bivalenter Schwereketten-Antikörper, 80kDa. **4:** Biparatopischer Nb-Dimer, 35 kDa, zwei über einen GS-Linker fusionierte Nbs. **5:** Monovalenter Nb, 16 kDa. Nb und Nb-Dimere wurden C-terminal an einen 6xHis-Myc Tag (grün) fusioniert.

1.3. Fc-Engineering für die Verstärkung der Ak-vermittelten Zytotoxizität

Über die Fc-Domänen können zwei für die Tumorthherapie bedeutende zytotoxische Effektor-Funktionen induziert werden: die Komplement-vermittelte und die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (CDC und ADCC) (Graziano & Engelhardt, 2019) (van de Donk, 2018).

Das Komplementsystem ist eine Gruppe kaskadenförmig interagierender Proteine des Blutplasmas (C1 bis C9). Die Kaskade wird unter anderem durch Bindung von C1q an die Fc-Enden von IgM- oder IgG-Antikörperklassen nach ihrer Bindung an ein Antigen ausgelöst. Die Komplementkaskade mündet nach mehrfachen proteolytischen Aktivierungsschritten in die Zytolyse durch den Membranangreifenden Komplex (complement dependent cytotoxicity, CDC). Daratumumab ist in der Lage, die komplementvermittelte Zytolyse zu aktivieren (Sanchez, Wang, Siegel, & Wang, 2016).

Bei der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) handelt es sich um einen Mechanismus der zellulären Immunreaktion, der zu einer Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität führt. Dabei zerstört eine Effektorzelle eine Zielzelle, an deren Oberflächenantigene spezifische Antikörper gebunden haben (Gonzalez-Rodriguez, Villa-Álvarez, Sordo-Bahamonde, Lorenzo-Herrero, & Gonzalez, 2019) (Muntasell, et al., 2017). Die Effektorzellen (NK-Zellen) interagieren über Fc-Rezeptoren, wie CD16 mit der Fc-Domäne der an die Zielzelle gebundenen Ak. Dies führt zu einer Ausschüttung von zytotoxischen Proteinen (Perforine, Granzyme), welche die Zielzelle lysieren bzw. ihre Apoptose auslösen.

Um die Zytotoxizität von Ak gegenüber Tumorzellen zu verstärken, sind in der Literatur verschiedene Mutationen zur Optimierung der CDC- und ADCC-Aktivität von humanem IgG1 beschrieben (**Abbildung 3**):

- a. Richards et al. zeigten, dass die Triple Mutation G236A (Glycin → Asparagin), S239D (Serin → Asparaginsäure) und I332E (Isoleucin → Glutaminsäure) eine Verstärkung der Affinität zu FcγRIIa und FcγRIIIa und damit eine Verstärkung der Phagozytose durch Makrophagen sowie auch eine NK-induzierte Zellyse (ADCC) erreicht (Richards, et al., 2008). (Ahmed, Keremane, Vielmetter, & Bjorkman, 2016).
- b. Die sogenannte Knob-in-Hole Mutation erlaubt die Herstellung biparatopischer Heterodimere. Dabei werden große Aminosäureseitenketten (Knob) in die CH3-Domäne einer schweren Kette eingeführt, die in einen entsprechend gestalteten Hohlraum in der CH3-Domäne der anderen schweren Kette passen. Die CH3-"Knopf"-Mutante wird hergestellt, indem eine kleine Seitenkette, Threonin, durch eine größere, Tryptophan T366W, ersetzt wird. Durch Mutation der Seitenketten T366S, L368A und Y407V entsteht eine CH3-"Loch"-Mutante, die sich in der Nähe des CH3-Knopfes auf der Partner CH3-Domäne befindet (Atwell, Ridgway, Welss, & Carter, 1997), (Ridgway, Presta, & Carter, 1996). Dabei ist die Konformationsstabilität der mutierten Fragmente ähnlich der des Wildtyps (Liu, et al., 2020).
- c. Die Aktivierung der Komplementkaskade erfordert die Bindung des C1q-Hexamers an einen Komplex aus sechs Antikörpern, in der Regel auf der Oberfläche der Zielzelle (Kishore & Reid, 2000). Mittels Fc-Engineering kann auch die antikörpervermittelte Zytotoxizität verbessert werden, indem die Bindung an den Komplementfaktor C1q bzw. die Fcγ-Rezeptoren zu dem Fc-Teil der Antikörper verstärkt wird. Diebolder et al. beschreiben, dass die Mutation E345R (Glutaminsäure → Serin) in der CH3 Domäne die Avidität von C1q gegenüber Antikörper-opsonierten Zellen um das Fünffache und die komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) um das Zehnfache (Diebolder, et al., 2014) verstärkt werden (Zhang, Goldberg, & Chiu, 2016) (Schütze, 2018).

- d. Umgekehrt ermöglicht das Fc-Engineering auch die Induktion von CDC und ADCC durch Antikörper weitgehend zu verhindern, indem die Bindung an C1q und Fc γ -Rezeptoren gehemmt wird. Michaelsen et al beschrieben dass die P329A Mutation die Bindung von C1q hemmt. (Michaelsen, et al., 2006). Eine weitere Mutation P329G (Prolin \rightarrow Glycin) an derselben Position wurde von Schlothauer et al. beschrieben, die sowohl die Bindung an Fc γ -Rezeptoren als auch an C1q hemmt und somit sowohl den CDC als auch den ADCC weitgehend aufhebt (Schlothauer, et al., 2016).

Um die Auswirkung der geschilderten Mutationen auf die Funktion von Nb-basierten Schwereketten-Antikörpern zu untersuchen, wurden diese im Rahmen dieser Arbeit in unsere CD38-spezifischen Schwereketten-Antikörper eingefügt.

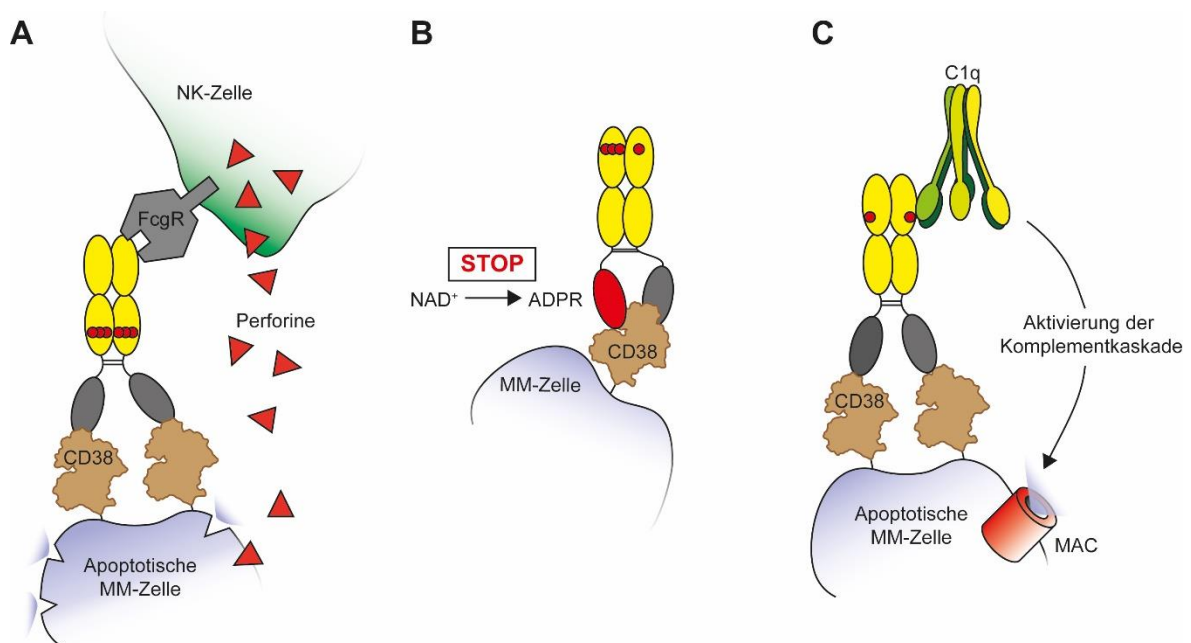


Abbildung 3: Fc-Engineering zur Erhöhung des zytolytischen Potenzials von Nb-basierten Schwereketten-Antikörpern. **A:** Die Einführung der Punktmutationen G236A / S239D / I332E (rot) steigert die Affinität für Fc-Rezeptoren (FcgR) und den ADCC. **B:** Die Knopf T366W und Loch T366S, L368A und Y407V Mutationen ermöglichen die Bildung von biparatopischen Antikörpern. Durch die Bindung eines weiteren Nb kann die Enzymaktivität von CD38 moduliert werden. **C:** Die Punktmutation E345R fördert die Hexamerisierung und die Bindung von C1q.

1.4. Zielsetzung

Ziele der Arbeit waren die Selektionierung neuer CD38-spezifischer Nbs aus immunisierten Lamas sowie die Klonierung und rekombinante Produktion von Nb-basierten Schwereketten-Antikörper-Chimären. Außerdem sollte das zytotoxische Potenzial dieser Schwereketten-Antikörper gegenüber humanen Lymphomzelllinien in ADCC- und CDC-Assays untersucht werden. Schließlich sollte die Zytotoxizität der Schwereketten-Antikörper durch Mutagenese der Fc-Fragmente (Fc-Engineering) verstärkt werden.

2. Material

2.1. Primer

Alle verwendeten Primer wurden eigenständig anhand der Targetsequenzen designet und bei Sigma-Aldrich produziert.

Sequenzierung der pCSE2.5 Vektoren		
CMV_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	
BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
PCR- Mutagenese		
f.cqa_up_E345R	GGCAGCCCCGACGACACAG GTGTACACCCTGC	Mutation E345R Forward
r.cqa_up_E345R	GCAGGGTGTACACCTGTGGT CGTCGGGGCTGCC	Mutation E345R Reverse
f.knobi_T366W	GAACCAGGTCAGCCTGTGGT GCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CC	Mutation KNOB T366W Forward
r.knobi_T366W	GGATAGAAGCCTTTGACCAG GCACCACAGGCTGACCTGGT TC	Mutation KNOB T366W Reverse
hlgG1_P329A_For	TCTCCAACAAAGCCCTCGCC GCCCCATC	Mutation P329A Forward
hlgG1_P329A_Rev	GATGGGGGCGGCGAGGGCT TTGTTGGAGA	Mutation P329A Reverse
hlgG1_P329G_For	TCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCATC	Mutation P329G Forward
hlgG1_P329G_Rev	GATGGGGGCGCCGAGGGCT TTGTTGGAGA	Mutation P329G Reverse

2.2. DNA-Sequenz der bestellten humanen Fc-Fragmente mit den entsprechenden Mutationen

Hole Mutation:

T366S/L368A/Y407V

ACGTGGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGGTGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGAGCTGCSCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCCTGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGG
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATAAATCTA GAACGTGG

ADCC Optimierung

S239D/I332E/G236A

GGGCCCAGATCTGCGGCCGCTAGCGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGCCC GGACCGSACGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCSAGGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGGTGACCAAGAACC
AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATAAATCTAGAAGCTCGTGATCAG

ADCC/CDC Optimierung:

S239D/I332E/G236A/E345R

GGGCCCAGATCTGCGGCCGCTAGCGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGCCC GGACCGSACGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCSAGGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGASGACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGGTGACCAAGAACC
CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATAAATCTAGAAGCTCGTGATCA
G

2.3. Enzyme

Bam H1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs,
NcoI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
PciI	New England Biolabs
Polymerase	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs

2.4. Chemikalien

2xYT	BD/Gibco
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	B. Braun
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Carbenicillin	Serva
Coomassie Färbelösung	Invitrogen
DNA-Ladepuffer, 6x	Fermentas
DTT	Invitrogen
eFluor450	eBioscience
F17	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Freestyle 293 Medium	Gibco
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen
Humanes Serum (gepoolt)	AG Nolte
Imidazol	Novex
JetPEI	Polyplus
KOD-Buffer	Novagen
L-Glutamin	Gibco
Ladepuffer 6x	Fermentas
LB Agar	BD/Difco
Luciferin	Biosynth
Natriumchlorid	Sigma
Natriumpyruvat	Gibco
Ni-NTA	Sigma-Aldrich
NuPAGE sample reducing agent, 10x	Invitrogen
NuPAGE SDS-PAGE sample loading buffer, 4x	Invitrogen
PBS	Gibco
Propidiumiodid	Sigmar
Polyacrylamidgel	NuPAGE Novex

Protein G	GE Healthcare
Roti-safe	Roth
RPMI 1640	Gibco
Trypsin, 10x	Invitrogen

2.5. Lösungen

F17 Kompletmedium	F17, 2% L-Glutamin, 0,1% Pluronic, 1% FCS, 0,005% G418
F17 Transfektionsmedium	F17, 2% L-Glutamin, 0,1% Pluronic
Feeding Medium	Transfektionsmedium, 20% Tryptone
RPMI Kompletmedium	RPMI 1640, 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glukose
Luciferin-Arbeitslösung	10µl Luciferin (Stock 30µg/µl) auf 2ml PBS (working solution 150µg/ml)

2.6. Enzyme

Die Enzyme, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen: New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe).

2.7. Größenstandards für Proteine und doppelsträngige DNA

DNA	
GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Proteine	
Supermarker: Albumin (65 kDa), IgG (150 kDa), Lysozyme (14 kDa)	Eigene Herstellung

2.8. Verwendete Kits (kommerziell erhältlich)

Pierce BCA Protein-Assay-Kit	Thermo Scientific™
Gelextraktion NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
Plasmid-Präparation QIAprep	QIAGEN GmbH (Hilden)
QuickChange Site - Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Novex colloidal blue staining Kit	Invitrogen™ Novex™

2.9. Antikörper

Zielantigen	Fluorochrom	Firma
cMycTag	FITC	SERO
cMycTag	AF647	AG Nolte
hu IgG(H+L)	FITC	DIANOVA
hu IgG(H+L)	PE	DIANOVA
C1q	FITC	DAKO
hu CD38 36 his	AF647	AG Nolte
hu CD38 36 hFc	AF647	AG Nolte
hu CD38 211 his	AF647	AG Nolte
hu CD38 211 hFc	AF647	AG Nolte
hu CD38 1067 his	AF647	AG Nolte
hu CD38 1067 hFc	AF647	AG Nolte
hu CD38 scFv Dara his	AF647	AG Nolte
hu CD38 scFv Dara hFc	AF647	AG Nolte
hu CD38 Daratumumab	Unkonjugiert.	AG Nolte
hu CD38 Daratumumab	Unkonjugiert	Janssen-Cilag AG
CDTA I-15 his	AF647	AG Nolte
CDTA I-15 hFc	AF647	AG Nolte

3. Methoden

3.1. Phagendisplay

Das Phagendisplay dient der Selektion von antigenspezifischen Antikörpern aus vorgefertigten Immunbibliotheken. Die erzielte genetische Information ist in Form von Bakteriophagen, die eine Kombination aus Phänotyp und Genotyp darstellen, zu finden. Es wurden im Vorfeld 4 Lamas immunisiert. Die genetische Information wurde aus den Lymphozyten extrahiert, mit Nb spezifischen Primern amplifiziert und in den Phagemidvektor pHEN2 subkloniert. Nach Transformation von *E. coli*-Stämmen und Superinfektion mit Helferphagen wurden aus den primären Bakterienbibliotheken Phagenbibliotheken erstellt. Anschließend wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit und der von Mandy Unger und Julia Königsdorf aus der gleichen Arbeitsgruppe CD38-spezifische Nbs mit der Methode des Phagendisplays herausselektioniert.

3.2. Selektion an CD38 exprimierenden Zellen nach Blockade bekannter Epitope

Im ersten Schritt wurde eine Negativselektion der Phagen vollzogen. Dies diente der Eliminierung von unspezifischen Phagen durch ihre Bindung an nicht erwünschte Antigene. Dafür wurden zunächst 50µl der Phagenbibliothek in einem Verhältnis von 1:9 1 h bei Raumtemperatur in Block-Puffer I (auf RPMI Basis, 5% Milchpulver) vor-inkubiert. Anschließend folgte die Negativselektion mit der Zelllinie YAC-1, die kein hCD38 an ihrer Oberfläche exprimiert. 10^7 YAC-1-Zellen wurden für 5 Minuten bei 2500rpm zentrifugiert und zusammen mit den Phagen 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss pelletiert (1300rpm, 5 Minuten, 4°C). Zur Selektion von Antikörpern, die unabhängig von bereits bekannten Nbs binden, wurden 10^7 hCD38 stabil transfizierte YAC-1-Zellen mit je 10 µl einer 2mg/ml konzentrierten Nb-Suspension vor-inkubiert. Das Panning wurde wie folgt durchgeführt:

- A. Mit den aus der Immunisierung von Lama 538 erstellten Phagen wurden drei Panningrunden durchgeführt. Für die erste Panningrunde wurden MU274

- (Epitop 1), die zweite MU274 und Jk2 (Epitop 2) und für die dritte MU274, Jk2 und Jk36 (Epitop 3) als blockierende Nbs benutzt.
- B. Mit den aus Lama 539 isolierten Phagenbibliotheken wurden zwei Panningrunden durchgeführt. Für die erste Panningrunde wurde MU274 und für die zweite MU274 und Jk36 als blockierende Nbs benutzt.
 - C. Mit den aus Lama 10 isolierten Phagen wurden zwei Panningrunden durchgeführt. Für die erste Panningrunde wurde MU274 und für die zweite MU274 und ein Art2-spezifischer Nb als blockierende Nbs benutzt.
 - D. Mit den aus Lama 25 isolierten Phagen wurden zwei Panningrunden durchgeführt. Für die erste Panningrunde wurde MU274 und für die zweite MU274 und MU1067(Epitop 2) als blockierende Nbs benutzt.

Der Überstand aus der Negativselektion wurde zu den prä-inkubierten CD38 stabil transfizierten YAC-1- Zellen gegeben und für zwei weitere Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen unter zweimaligem Wechsel des Gefäßes zehnmal mit Block-Puffer I, und II (5% Milchpulver + PBS -/-) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, an denen nun im Optimalfall nur die spezifisch bindenden Phagen hafteten, pelletiert. Nach Elution mit 500µl Trypsin und 5 minütiger Zentrifugation bei 13000rpm wurden die im Überstand befindlichen Phagen abgenommen. Um eine Protease-Aktivität zu verhindern, wurde der Überstand anschließend zu 50µl AEBSF pipettiert. Jede Bibliothek wurde zwei bis drei Selektionsrunden unterzogen (**Abbildung 4**).

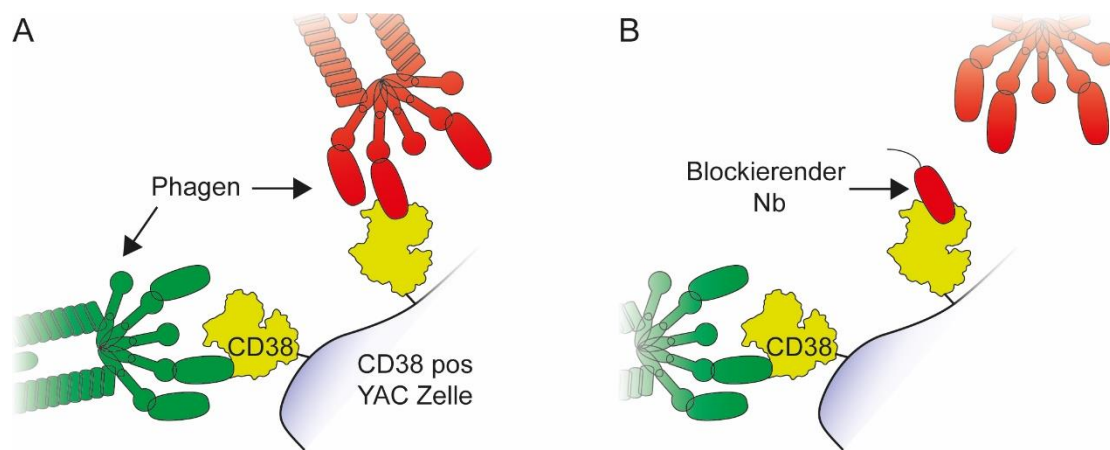


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Nanobody Selektion nach Blockade einiger Epitope. **A** Konventionelle Phagedisplay-Methode. Inkubation der CD38-positiven Zellen mit den Phagen nach der negativen Selektion. Hier werden zwei Epitope erkannt und die gebundenen Phagen werden nach dem Elutionsvorgang selektiert. **B** Prä-inkubation der CD38 transfizierten YAC-1-Zellen mit einem CD38-spezifischen Antikörper (rot). Der entsprechende Phage kann nicht binden und wird mit dem nächsten Waschvorgang entfernt. Somit wird bevorzugt der grüne Phage selektiert.

3.3. Reinfektion der TG1 *E. coli* Bakterien

Um die DNA weiter verarbeiten zu können, muss die nun selektierte genetische Information in Form der selektierten Phagen zunächst wieder in Bakterien gelangen. Dafür wurden 5ml einer TG1 *E. coli* Kultur mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ mit 250 μ l Phagen-Eluat für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen pelletiert (4000rpm, 10 Minuten, 4°C), auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert und ca. 8 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.4. Isolierung von Plasmiden aus gepickten Klonen

Es wurden pro Phagedisplay-Runde 12 Klone gepickt und einzeln erneut für ca. 8 h in 5 ml 2xYT-Medium mit 0,1% Carbenicillin bei 37°C und 240 rpm hochgezüchtet. Die Plasmide aus diesen Kulturen wurden nach Herstellerangaben des QIAGEN Spin Miniprep Kit aufgereinigt. 600-700 ng der Plasmid-DNA wurden mit 20 pmol der spezifischen Primer und ddH₂O vermengt und zur Firma Seqlab GmbH, Göttingen, zur Sequenzierung gesendet. Mit dem Programm 4Peaks wurden die Sequenzen analysiert und auf Vollständigkeit der Nb-Sequenz überprüft.

Klone, die häufiger als einmal vorkamen oder von denen mehrere Klone mit wenigen Aminosäuresubstitutionen in den CDR Regionen gefunden werden konnten, wurden als Familie definiert.

3.5. Transformation und periplasmatische Expression in *E. coli*

Zur Produktion der Antikörper wurde zunächst mit der Proteinsynthese durch *E. coli* begonnen. Für die korrekte Faltung der Antikörper wird ein nicht reduzierendes Milieu benötigt. Dies ist im periplasmatischen Raum der Bakterien gegeben, in dem das Protein durch die pelB-Leaderssequenz des pHEN2 Vektors produziert wird.

Zunächst erfolgte die Transformation von HB2151 *E. coli*-Stämmen. Für die Proteinexpression der ausgewählten Nbs wurden zuerst 30µl HB2151 *E. coli* mit 1-2µl der DNA der entsprechenden Nbs inokuliert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock: nach 30 Minuten auf Eis kamen die Bakterien für 30 Sekunden in ein Wasserbad bei 42°C und anschließend erneut für 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 300µl SOC-Medium inkubierten die Bakterien bei 37°C und 240 rpm für 1 h. 50 µl der Ansätze auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin wurden dann ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ein gepickter Klon wurde in 5 ml mit 1:1000 Carbenicillin versetztem 2xYT-Medium bei 37°C und 240rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ kultiviert. Der Zusatz von Carbenicillin ergab die Sicherheit, einen transformierten Bakterienklon zu picken, da im Vorfeld eine Carbenicillinresistenz-Kassette in den pHEN2 Vektor eingebaut wurde.

Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 5 µl 1nM IPTG erreicht. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Bakterien mehrfach 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen. Das trockene Pellet wurde dann in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis lysiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde steril filtriert, um bakterielle Kontaminationen zu verhindern. Die Expressionsrate wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

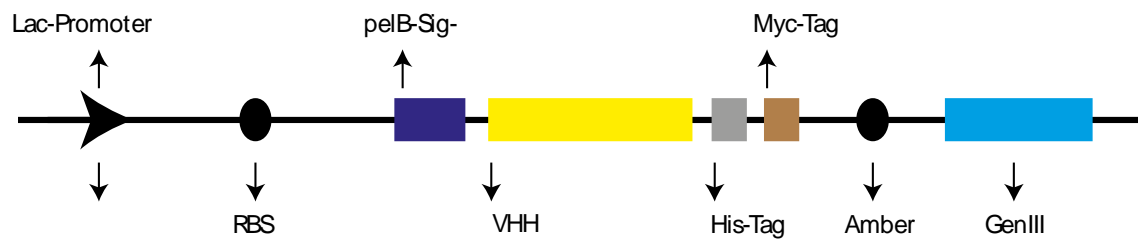


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Phagemidvektors pHEN2, adaptiert nach Unger. Die Nbs (gelb VHH) werden mit dem verkürzten Gen des Hüllproteins gIII des Phagen im pHEN2-Vektor in Reihe kloniert. Die Proteine werden durch das Signalpeptid pelB ins Periplasma der Bakterien transportiert und falten sich dort zu einer funktionalen Nb-Domäne. Die ribosomale Bindungsstelle RBS wird von den Ribosomen erkannt und markiert den Startpunkt der Translation. Der Lac-Promoter induziert die Proteinexpression in Anwesenheit von IPTG. Der His-Tag dient der Affinitätsreinigung und der Myc-Tag kann für die FACS-Analysen genutzt werden. Zwischen den Tags und dem Hüllprotein des Phagen befindet sich ein zusätzliches Amber-Codon, welches nur von bestimmten *E. coli* - Stämmen erkannt wird.

3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um ein DNA-Fragment zu amplifizieren wird ein dreiteiliges Verfahren durchgeführt, das zyklisch wiederholt wird. Diese Methode wurde 1983 von dem Biochemiker Kary Mullis entwickelt. Zehn Jahre später bekam er dafür den Nobelpreis und bis dato ist die PCR immer noch wichtiger Bestandteil der modernen Molekularbiologie.

Denaturation: Der DNA-Doppelstrang wird bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und somit entzweit.

Annealing: Hier haben synthetische Oligonukleotide (Primer) die Gelegenheit, sich an ihre komplementären DNA-Fragmente, welche die zu amplifizierende Sequenz beinhalten, anzuheften

Elongation: Durch hitzestabile Polymerase werden Komplementärstränge aus freien dNTPs synthetisiert

Diese Schritte werden zyklisch im Thermocycler mit einem vorgewählten Programm wiederholt und führen zu einer exponentiellen Amplifikation des gewählten DNA-Fragmentes.

3.7. Fc-Fragment - Mutagenese

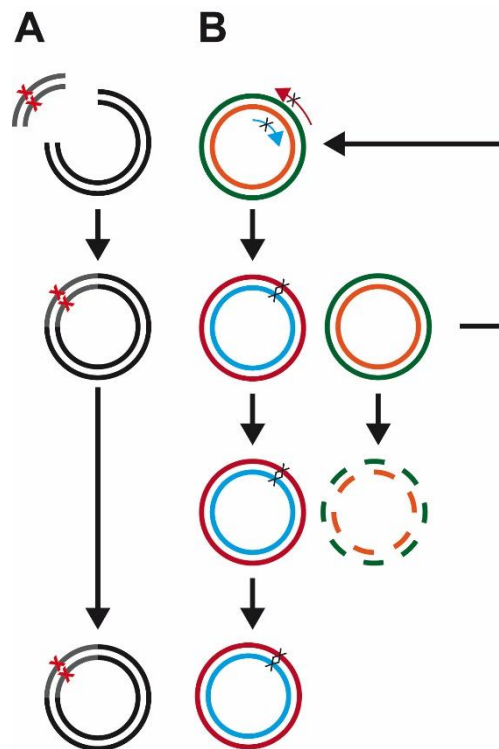


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mutagenese eines doppelsträngigen DNA Stranges. **A:** Restriktionsverdau und Subklonierung eines synthetischen Oligonukleotids. **B:** PCR-Mutagenese. Nach Denaturierung des DNA-Stranges werden unter Berücksichtigung der optimalen Schmelztemperatur Primer hinzugefügt, welche die gewünschte Mutation beinhalten. Mittels PfuUltraDNA Polymerase werden diese Primer dann verlängert. Mittels DpnI wird die methylierte Template-DNA verdaut. Anschließend werden die mutierten DNA-Stränge durch Transformation von kompetenten XL10 Gold *E. coli* Zellen amplifiziert. Zuletzt wird die DNA extrahiert und zur Erfolgsüberprüfung sequenziert.

3.7.1. Einführung einer Punktmutation durch PCR-Mutagenese

Die PCR lässt sich ebenfalls zur Herstellung von Punktmutation einsetzen. Bei dieser Arbeit wurden 4 verschiedene Punktmutationen am Fc-Fragment des humanen IgG1 erzielt:

- E345R zur Verstärkung der Bindung am Komplementfaktor C1 durch bessere Hexamerbildung (Diebolder, et al., 2014)
- T366W zur Bildung eines Heterodimers durch die Knob-in-Hole Technik. Eine CH3-"Knopf"-Mutante wird hergestellt, indem die Seitenkette des Threonins an Position 366 durch die größere Seitenkette des Tryptophans ersetzt wird. Eine

passende „Loch“-Mutante wird in der Nähe des Knopfes auf der Partner-CH3-Domäne (Atwell, Ridgway, Welss , & Carter , 1997) durch drei Mutationen erzeugt: T366S (Threonin zu Serin), L368A (Leucin zu Alanin) und Y407V (Tyrosin zu Valin) (Siehe 3.7.2.)

- c) P329A zur Inaktivierung der komplementabhängigen Zellyse (Michaelson, et al., 2006)
- d) P329G zur Inaktivierung der Immuneffektorfunktion des IgG-Antikörpers durch vollständig aufgehobene FcγR- und C1q-Wechselwirkungen. Dies wird erreicht durch die Störung der Bildung des Prolin- Sandwich-Motivs mit den FcγRs (Schlothauer, et al., 2016).

Dafür wurden über die Firma GENEWIZ je zwei Primer synthetisiert, die an dem Wildtyp DNA-Strang anheften und die erwünschte Mutation beinhalten. Die Durchführung wurde nach der Herstelleranleitung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

3.7.2. Einführung der Mutationen durch Subklonierung

Um mehr als eine Mutation im Fc-Fragment des humanen IgG1 zu inserieren, wurde im Fall der Mutation Hole (T366S/L368A/Y407V) ein DNA-Fragment mit den flankierenden Restriktionsstellen SacII x XbaI , für die Mutationen zur ADCC-Optimierung (S239D/I332E/G236A) und ADCC/CDC-Optimierung (S239D/I332E/G236A/E345R) DNA-Fragmente mit den Restriktionsstellen NotI x XbaI synthetisiert (GENEWIZ bzw. Integrated DNA Technologies). Nach dem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde eine Subklonierung in ein bestehendes pCSE2.5 DNA-Plasmid durchgeführt. Der Erfolg der Subklonierung wurde nach Transformation von *E. coli*-Stämmen und DNA-Extraktion mittels Sequenzierung überprüft.

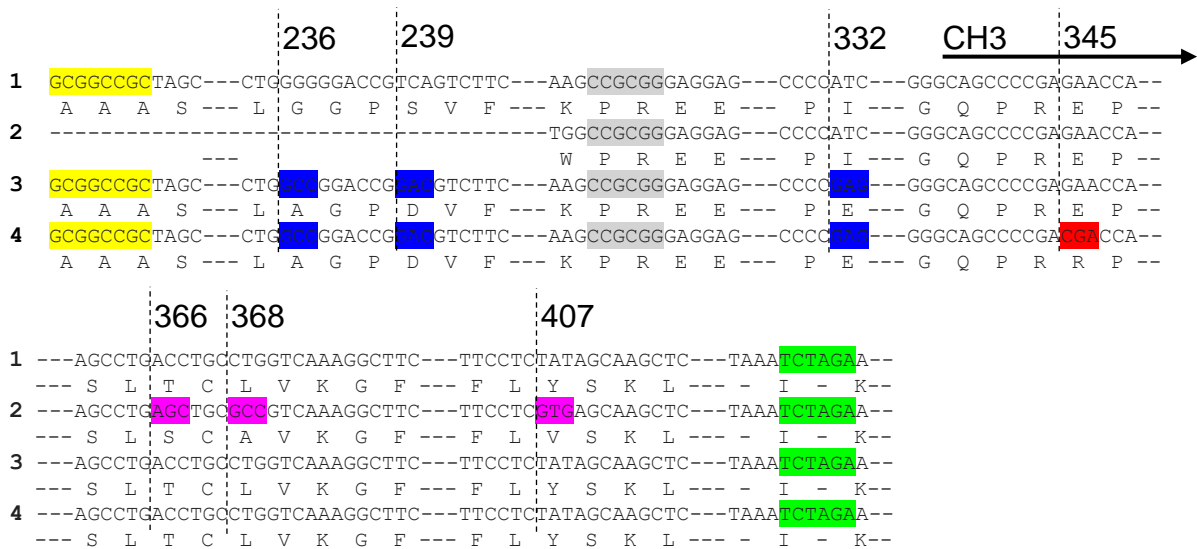


Abbildung 7: Sequenz-Alignment der bestellten DNA-Fragmente zur Inserieung einer mehrfachen Punktmutation im Fc-Fragment des hlgG1. Die SacII und XbaI Restriktionsschnittstellen sind respektiv in Grau und Grün hinterlegt. **1:** Wildtyp IgG1. **2:** hlgG1 Hole mutiert (T366S/L368A/Y407V) Mutationen sind in Lila hinterlegt. **3:** hlgG1 mutiert zur ADCC Optimierung (S239D/I332E/G236A) in Blau hinterlegt und in **4** mit der zusätzlichen E345R Mutation zur CDC Optimierung in Rot hinterlegt.

3.8. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Um DNA-Fragmente für eine spätere Umklonierung zu isolieren, wurden sie durch Restriktionsendonukleasen, bevorzugt innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz, geschnitten. Dieser Restriktionsverdau erfolgte mit den jeweils passenden Restriktionsendonukleasen und Puffern des Herstellers New England Biolabs GmbH unter Einhaltung der empfohlenen Temperaturen und Pufferbedingungen.

Reaktionsansätze:

Gesamt Volumen 20µl

1µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen,

2µl des entsprechenden Puffers

2µl BSA

0,5-3µg DNA

ddH2O.

Die Spaltung der DNA erfolgte für etwa 4 Stunden bei 37°C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65°C für 20 Minuten.

3.9. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung der spontanen Religation und Rezyklisierung von restriktionsverdauten Plasmiden wurden diese endständig dephosphoryliert. Dafür wurde dem Vektor nach dem Restriktionsverdau Antarctic Phosphatase und der entsprechende Puffer beigemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 65°C.

3.10. Agarose-Gelelektrophorese

Im Vergleich zu der SDS-Page Gelelektrophorese, die für die Auftrennung von Proteinen benutzt wird, werden mittels Agarose-Gelelektrophorese DNA-Moleküle durch ihr Wanderungsverhalten in einem elektrischen Feld aufgetrennt und isoliert. Es wurden dafür 1%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde Agarose in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst und zum Auskühlen in eine Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung des Gels erfolgte die Überführung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer. Die DNA-Proben wurden zunächst mit 4 µl Roti - Safe angefärbt, mit DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zur späteren Analyse wurde ebenfalls ein DNA-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90-120 V für 40-90 Minuten. Durch die Roti-Safe-Anfärbung konnte unter UV-Licht die DNA dargestellt werden. Somit konnte eine Dokumentation und/oder die Extraktion der aufgetrennten DNA-Fragmente durchgeführt werden.

3.11. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mithilfe des Gelextraktion-Kits NucleoSpin Extract II von Macherey-Nagel entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung der so isolierten DNA erfolgte mittels Nanodrop (ThermoScientific).

3.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Inserts in Plasmidvektoren einzubringen, werden sie mithilfe der Ligase miteinander verbunden. Das Enzym katalysiert in Anwesenheit des entsprechenden Puffers die Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Fragmentes mit der 3'-Hydroxygruppe eines anderen Fragments, nachdem die zwei Fragmente mit der

gleichen Restriktionsendonuklease verdaut wurden. Die Reaktion erfolgt für 16 Stunden bei 16°C gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 Minuten.

3.13. Transformation und Kultivierung von kompetenten *E. coli* Zellen

Die Ligationsprodukte wurden zur Vervielfältigung in kompetente bei 4°C aufgetaute *E. coli* XL-2-Blue oder *E. coli* XL-10-Gold Bakterien transformiert. Das weitere Prozedere wurde vorab in Abschnitt 3.5 beschrieben. Für die Kultivierung wurden 5 ml von carbenicillinhaltigem 2YT- Medium (1:1000) mit gepickten Einzelklonen angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 240 rpm inkubiert. Die Isolierung und Aufreinigung von DNA erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Vorgängen.

3.14. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA aus den Bakterienkulturen wurde mithilfe des Spin Miniprep- oder Maxiprep-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.15. Kultivieren und Passagieren von Zellen

Es sind bereits vor Beginn dieser Arbeit eukaryotische Zelllinien im Labor etabliert worden. Die Kultivierung der Zelllinien in den jeweiligen Zellkulturmedien erfolgte im Brutschrank bei 37°C unter 5 prozentiger CO₂-Atmosphäre. Die Arbeit zur Weitererhaltung der Zellen wurde ausschließlich an einer sterilen Werkbank ausgeführt. Die murinen Lymphomzellen YAC-1 (DSMZ Nr. ACC96) wurden nach Transfektion mit CD38 für die Analyse der Spezifität der Antikörper verwendet. Die Fähigkeit der Schwerekettenantikörper Zytolyse via CDC oder ADCC auszulösen wurde an YAC-1-hCD38 sowie an der humanen Multiplen Myelomzelllinie LP-1 (DSMZ Nr.: ACC-41) und an den Burkitt Lymphomzelllinien Daudi (DS38MZ Nr.: ACC-78) und CA46 (DSMZ Nr.: ACC-73) getestet und untersucht. Mit dem Fc-Rezeptor CD16 stabil transfizierte natürliche Killerzellen NK-92 (DSMZ Nr.: ACC-488) wurden als Effektorzellen benutzt. Alle Suspensionszellen wurden in RPMI-Komplettmedium dreimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde ein Aliquot in einer neuen Kulturschale mit dem Faktor 1:2 bis 1:40 verdünnt.

Die humane embryonale Zelllinie HEK293-6E wurde zur Proteinproduktion verwendet. Sie wurden in Freestyle-Komplettmedium kultiviert. Diese Zellen wurden zum Passagieren zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin abgelöst, mit frischem Medium gewaschen und in Verdünnung von 1:2 bis 1:10 je nach Bedarf und Zustand der Zellen geteilt. Die Zellen wurden vor jedem Versuch mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und bei 1600 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

3.16. Transfektion und transiente Expression in HEK293-6E Zellen

Zur Synthese der rekombinanten Proteine wurden HEK-6E-Zellen (AG Schirrmann, Braunschweig) mithilfe des Transfektionsreagenz JetPEI transfiziert. Dieses verpackt die DNA der entsprechenden Konstrukte in positiv geladene Partikel und ermöglicht somit die Aufnahme dieser Komplexe in das Zytosol der zu transfizierenden Zellen. Für die Bildung der Komplexe wurden zunächst 10µg DNA und JetPEI separat in Transfektionsmedium gelöst und anschließend zur 30-minütigen Inkubation gemischt. Die so erzeugten Komplexe wurden dann auf die Zellen gegeben. Zur Produktion von konventionellen Antikörpern wurden 10µg einer äquimolaren Mischung der beiden Plasmide (jeweils für die schwere und die leichte Kette des Antikörpers kodierend) für die Transfektion benutzt. Nach 24h Inkubation der transfizierten Zellen bei 37°C erfolgte die Zugabe von Feedingmedium, und nach weiteren 5 Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen, 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und steril filtriert. Um den Erfolg der Transfektion zu verifizieren, wurden 10 µl der jeweiligen HEK-Zellüberstände für die SDS-Gelelektrophorese Analyse entnommen (Abschnitt 3.19).

3.17. Aufreinigung von HEK-Zellüberständen

Der Überstand der HEK-Zellen beinhaltet zusätzlich zu den erwünschten Proteinen weitere Verunreinigungen aus lysierten Zellen oder weitere von den Zellen produzierte Proteine. Somit ist eine Aufreinigung dieser Überstände notwendig. Abhängig von dem „Tag“ der Proteine (His-Myc oder Fc-Fragment) werden entsprechend entweder Ni-NTA Säulen oder Protein A Säulen benötigt.

3.17.1. Aufreinigung der Zellüberstände mittels Ni-NTA Säulen zur Gewinnung von 6His-Myc tragenden Proteinen

Der c-Myc-6His-*tag* kann aufgrund seines Histidin-Anteils spezifisch an Nickel-Ionen der Ni-NTA Säulen binden. Somit werden die Zellüberstände spezifisch aufgereinigt.

Nach dem Beladen der Säulen mit den Zellüberständen erfolgte die Elution mit Imidazol. Die Eluate wurden dann mit PD-10 Säulen umgepuffert und in PBS+/- eluiert. Die genaue Einstellung der Konzentration erfolgte in Amicon-Säulen durch Zentrifugation. Eine semi-quantitative Kontrolle erfolgte mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.19)

3.17.2. Aufreinigung der Zellüberstände mittels Protein G Säule zur Gewinnung von Fc-Tag tragenden Proteinen

Das Protein G ist ein in der Zellwand von Streptokokken vorkommendes Protein, das Bindungsdomänen besitzt, welche eine hohe Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps G aufweisen. Diese Eigenschaft kommt uns bei der Aufreinigung der Zellüberstände zunutze, die Nb-Schwereketten-Antikörper beinhalten. Hier wurde nach Beladung der Protein G Säulen eine 0.1 Molare Glycin-HCl- Lösung als Elutionspuffer verwendet. Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wurde in den Auffanggefäßen zur Neutralisation eine 1 M Tris-HCl- Lösung verwendet. Die Umpufferung, Konzentrationseinstellung sowie Kontrolle erfolgte analog zu den in 3.17.1.ausgeführten Vorgängen.

3.18. Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen wurde spektrometrisch gemäß den Herstellerangaben mittels des BCA Protein-Assay Reagent-Kits (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dabei wurden eine Konzentrationsreihe des zu analysierenden Proteins und eine parallel angesetzte BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration verglichen.

3.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Analyse von Proteinen verwendet. Diese wandern in Abhängigkeit zu ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld durch die Poren eines 12%- Polyacrylamidgels. Dafür wurden die Proteine zunächst mit einem Beladungspuffer und ddH₂O vermischt. Abhängig von der Fragestellung wurde ein reduzierendes Mittel dazugegeben. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei 70°C inkubiert und in die Taschen des Gels gefüllt. Ein gleich behandelter Proteinmarker aus eigener Produktion wurde zur Semiquantifizierung und zum Vergleich der Proteingröße ebenfalls aufgetragen. Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit MES-Puffer bei einer Spannung von 200 V für 45 Minuten der Elektrophorese unterzogen.

3.20. Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Die Coomassie-Färbung dient der Visualisierung der Proteinbanden in SDS-Gelen. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mit dem Protein-Färbe-Kit über Nacht angefärbt und bis zur gewünschten Farbtintensität mit einem Aktivkohlebeutel in de-ionisiertem Wasser entfärbt. Für die Konservierung des Gels wurde dieses 5 Minuten in einer Geltrocknungslösung geschwenkt und anschließend zwischen zwei Blättern Cellophanfolie in einen Rahmen eingespannt, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

3.21. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) ist eine Methode, die zur Analyse der Expression von Oberflächenproteinen eingesetzt wird. Dabei werden Zielantigene an die Oberfläche der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern spezifisch gebunden und die Zellen nach ihrer

Morphologie sowie das aus dem angeregten Fluorochrom emittierte Licht analysiert. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie am FACS CANTO II verwendet um einerseits die Epitopenkartierung, die Spezifität und die Avidität der selektionierten Antikörper zu ermitteln und andererseits ihre Fähigkeit zur Zelllysenaktiverierung durch CDC und ADCC zu analysieren.

3.21.1. Spezifizitäts-Assay

CD38-positive Zellen wurden mit einem Fluorochrom-konjugierten CD38-spezifischen Antikörper inkubiert. Wurde ein unkonjugierter Antikörper verwendet, beispielsweise bei Verwendung eines Antikörpers aus dem Periplasmalysat oder aus HEK-Zellüberständen, erfolgte eine weitere Inkubation mit einem Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörper mit Spezifität für den Tag des ersten Antikörpers. Die pHEN2- und pCSE2.5-HIS-Myc-Vektoren enthalten beide eine Sequenz, die für einen Myc-Tag kodiert. Analog dazu kann das Fc-Fragment eines Nb-Schwereketten-Antikörpers, kodiert durch den pCSE2.5-hFc-Vektor, als Ziel für die Detektion verwendet werden.

Überschüssige Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurden beseitigt durch das mehrfache Waschen durch Zentrifugation und Resuspendieren der Zellen. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und analysiert. Detektiert wurde bei den Nb-His/Myc Konstrukten mit einem anti cMyc-FITC konjugierten Antikörper sowie bei den Nb-hcAb-Konstrukten mit einem anti humanen IgG FITC konjugierten Antikörper.

Die Analyse erfolgte an einem Durchflusszytometer (FACS Cantoll). Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Flowjo durchgeführt.

3.21.2. Titrations-Assay

Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsaffinitäten der Antikörper wurde zunächst eine $\sqrt{10}$ -Verdünnungsreihe der zu analysierenden Antikörper hergestellt. Nach Inkubation der CD38-positiven YAC-1-Zellen wurden diese anschließend via FACS analysiert.

3.21.3. Aviditäts-Assay

Um die Bindungsstärke der Antikörper zu ermitteln, wurden mit eFluor450 vorgefärbte CD38 exprimierende YAC-1-Zellen mit den zu analysierenden Antikörpern vor-inkubiert und mit PBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. CD38 tragende unmarkierte YAC-1-Zellen wurden dann hinzugefügt. Bindungsschwache Antikörper lösen sich von ihrem spezifischen Antigen und können an freie Oberflächenantigene der unmarkierten Zellen binden. Die zwei Zellgruppen wurden vor und nach Beimengung im zeitlichen Verlauf nach Zugabe eines Myc-tag-spezifischen Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörpers via FACS analysiert.

3.21.4. Kreuzblockade-Assay

Die relative Bindungsstelle der Antikörper an das Zielprotein wurde durch das Kreuzblockaden-Assay ermittelt. Hierfür wurden CD38 exprimierende Zellen zunächst mit 2µg unkonjugierten Nbs 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Wahl der ersten Antikörper richtete sich nach den mit Kristallographie bereits gesicherten Bindungsepitopen. Als Sekundärantikörper wurden 500 ng CD38-spezifische Fluorochrom-konjugierte Nbs hinzugefügt. Nach einer erneuten 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen gewaschen und im Anschluss eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Daten wurden mit der Flowjo-Software analysiert.

3.21.5. CDC-Assay

Nach der Bindung von C1q an den Fc-Teil des spezifischen Antikörpers wird die Membran der CD38 tragenden Zellen durch die Bildung des membran-angreifenden Komplexes durchlässig und die Zellen somit in Apoptose geführt. Diese Durchlässigkeit nutzen wir aus, um den Zelltod mittels Propodium Iodid zu ermitteln. Propodium Iodid ist ein Farbstoff, der die DNA der Zellen bindet. Dies geschieht aber nur, wenn die apoptotischen Zellen eine durchlässige Membran bekommen. Zunächst wurde humanes Serum von verschiedenen gesunden Spendern gepoolt. Um zu verhindern, dass sich unspezifisch bindende Antikörper, welche Zytotoxizität auslösen, im Serum befinden, wurden diese aus dem Serum entfernt. Dafür wurden 250µl des Serums mit 750µl PBS verdünnt und auf eine mit PBS äquilibrierte 1 ml

G-Sepharose Säule aufgetragen. Der IgG depletierte Durchfluss wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Durchführung der CDC-Assays wurden 10^5 bis 10^6 CD38 tragende Zellen mit ca. 1µg Antikörper vor-inkubiert. Anschließend wurden 20µl des gepoolten Serums hinzugefügt. Als Kontrolle wurde sowohl ein Teil des Serums bei 56°C 30 Minuten hitzeinaktiviert als auch ein Teil der Zellen ohne Serum behandelt. Die Ansätze wurden anschließend bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen pelletiert und gewaschen. Nach Zugabe von Propidiumiodid in einer Konzentration von 1:100 wurden die Ansätze mittels FACS analysiert.

3.22. ADCC-Assay

Die selektionierten Antikörper sowie die generierten Mutanten wurden in ihrer Fähigkeit, eine antikörpervermittelte Zelllyse zu induzieren, analysiert. Durch die Bindung der Antikörper an ein Zielantigen lysiert eine Effektorzelle die Zielzelle durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen.

3.22.1. Vorarbeit

Die hier verwendete Analyse wurde durch Frau Kerstin Schütze in ihrer Dissertation mithilfe von Dr. Kristoffer Rieken und der AG Fehse, (UKE, Hamburg), etabliert. Hierbei wurden im Rahmen der Generierung geeigneter Effektorzellen NK92-Zellen (DSMZ Nr. ACC-488) erfolgreich mit einem Vektor transduziert, der für den humanen $Fc\gamma$ Rezeptor hCD16 kodiert. Im Anschluss konnte Frau Schütze die Tötungskapazität der NK92-hCD16-Zellen nachweisen. Die verwendeten Zielzellen wurden mithilfe einer lentiviralen Transduktion mit einem für eine Luciferase (luc) kodierenden Plasmid transduziert. Die Zellen sind somit befähigt das Substrat Luciferin unter Erzeugung eines Biolumineszenzsignals (BLI) umzusetzen. Für diesen Vorgang ist allerdings Energie in Form von ATP notwendig. Vitale Zellen, die ATP produzieren, sind durch das BLI-Signal detektierbar.

3.22.2. Biolumineszenz-Versuche

Für die ADCC-Analysen wurde ein Assay auf Basis der Biolumineszenz von lebendigen Luciferase-transduzierten Zellen durchgeführt. Zunächst wurden $\sqrt{10}$ Verdünnungsreihen der verschiedenen Antikörper erstellt. Anschließend wurden CD38-positive luc transduzierte Zielzellen (Z) hinzugeben. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Effektorzellen (E) in einem Verhältnis von 1:3 Z:E hinzugegeben. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und in Luciferinlösung aufgenommen. Die Detektion der Biolumineszenz wurde am VIKTOR3 Multilaber Reader (PerkinElmer) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in drei Abschnitten präsentiert. Der erste Abschnitt beschreibt die Selektion CD38-spezifischer Nbs aus vier immunisierten Lamas sowie die Klonierung und Charakterisierung Nb-basierter humaner Schwereketten Antikörper. Der zweite Abschnitt behandelt die Modifikation der Schwereketten-Antikörper mittels Fc-Engineering und der dritte Abschnitt die Untersuchungen zur spezifischen Zytotoxizität der Schwerekettenantikörper gegenüber humanen Lymphomzelllinien. Für die Selektion CD38-spezifischer Nbs wurden YAC-1 Maus-Lymphomzelllinien (DSMZ Nr. ACC96) verwendet, die mit einem linearisierten Expressionsvektor für humanes CD38 transfiziert worden waren. Stabile YAC-1-hCD38 Transfektanten wurden in Blasticidin-haltigem Medium selektioniert und mittels FACS auf hohe CD38-Expression sortiert. Die Produktion rekombinanter Nbs und Schwerekettenantikörper erfolgte in HEK-6E Zellen (National Research Council, Canada). Die Fähigkeit der Schwerekettenantikörper Zytolyse via CDC oder ADCC auszulösen wurde an YAC-1-hCD38 sowie an der humanen Multiplen Myelomzelllinie LP-1 (DSMZ Nr.: ACC-41) und an den Burkitt Lymphomzelllinien Daudi (DS38MZ Nr.: ACC-78) und CA46 (DSMZ Nr.: ACC-73) getestet und untersucht. Mit dem Fc-Rezeptor CD16 stabil transfizierte natürliche Killerzellen NK-92 (DSMZ Nr.: ACC-488) wurden als Effektorzellen benutzt.

4.1. Selektion und Charakterisierung von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern

4.1.1. Bestätigung der CD38-Expression der verwendeten Zellen

Die Stärke der Expression von CD38 auf der Oberfläche von verfügbaren Tumorzelllinien wurde durchflusszytometrisch mithilfe von Fluorochrom-konjugierten α CD38 Antikörpern analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass murine YAC-1-Zellen humanes CD38 nicht exprimieren (**Abbildung 8**). Stabil mit CD38 transfizierte YAC-1-Zellen sowie die Myelomzelllinie LP1 und die Lymphomzelllinien Daudi und CA46 jedoch exprimieren ein hohes Niveau von CD38 auf ihrer Oberfläche.

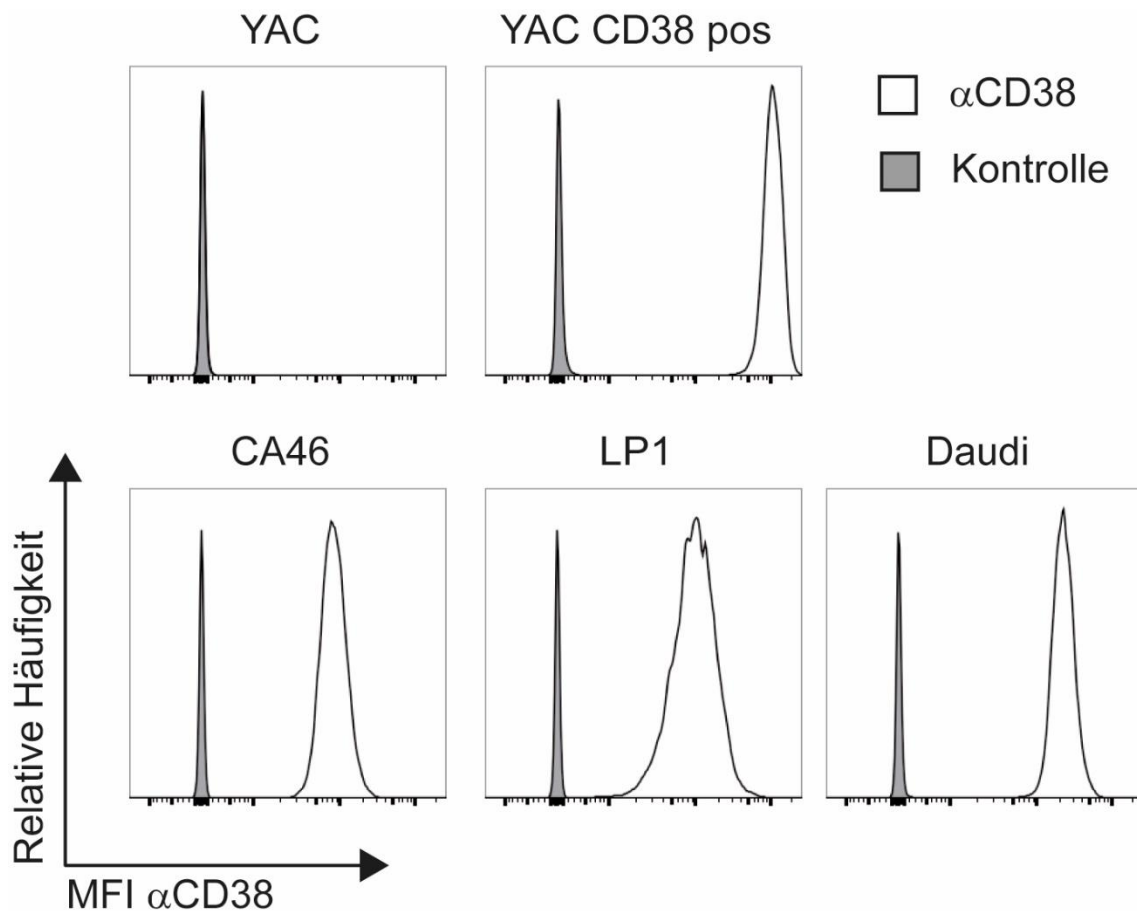


Abbildung 8: Tumorzelllinien zeigen eine hohe Zelloberflächen-Expression von CD38. Die angegebenen Zelllinien wurden mit dem FITC Fluorochrom-konjugierten CD38-spezifischen Antikörper (Maus α hCD38, Klon HIT2, eBioscience) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durchflusszytometrisch detektiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem CD38-unspezifischen Antikörper inkubiert.

4.1.2. Selektion der CD38-spezifischen Nanobodies

In früheren Untersuchungen waren bereits CD38-spezifische Nbs selektioniert worden, die an drei unterschiedliche Epitope binden (Unger, 2012) (Koenigsdorf, 2016). Die Bindungsstelle des Nb MU274 wurde als Epitop 1 definiert, die Bindungsstellen von JK2 und MU1067 als Epitop 2 und die von JK36 als Epitop 3. Um bevorzugt Nbs zu selektionieren, die an neue Epitope von CD38 binden, wurden bereits bekannte Epitope beim Panning durch entsprechende Antikörper blockiert. Eine Vorselektion erfolgte an parentalen, CD38-negativen YAC-1-Zellen, um unspezifisch bindende Phagen herauszufiltern. Dafür wurde ein Aliquot der bereits erstellten Phagenbibliotheken aus den vier mit CD38 immunisierten Lamas L538,

L539, L10 und L25 zu den YAC-1-Zellen gegeben. Nach Entfernung der Phagen-gebundenen Zellen durch Zentrifugieren wurde der Zellüberstand im zweiten Schritt auf die mit blockierenden Nbs vor-inkubierten CD38-transfizierten YAC-1-Zellen gegeben. Die erste Panningsrunde erfolgte für alle vier Phagenbibliotheken mit Blockierung des Epitops 1 durch Nb MU274. Nach Inkubation mit der Phagenbibliothek wurden die Zellen ausgiebig gewaschen, gebundene Phagen von den Zellen eluiert und in TG1 *E. coli* Bakterien infiziert. Somit wurde die DNA-Information auf die Bakterien überführt. Nach Ausplattieren der Bakterien wurden pro Panningsrunde 24 Klone gepickt und hochgezüchtet. Die Phagen-DNA wurde extrahiert und sequenziert. Die Ergebnisse zeigen die Anreicherung von Nbs aus unterschiedlichen Familien (Tabellen 1-4).

Durch MU274 blockiertes Epitop **E1**

Name	WF#	CDR3	Epitop
I-12b	14	DRFSVVAVEYDY	3
I-9.1c	1-6;8;10- 11,15;18;22-24 ≈ Jk2	WHYAAGRDY	2
I-8.1b	9 ≈ Jk54	AHTFSGSF	3
I-8.2b	16 ≈ Jk43	DHTFAGNY	3

Durch MU274 und JK2 blockierte Epitope **E1** und **E2**

Name	WF#	CDR3	Epitop
I-9.1c	159;161;165 ≈ Jk2	WHYAAGRDY	2
I-8.2b	147;158;168 ≈ Jk43	DHTFAGNY	3
I-8.2c	153;157 ≈ Jk43	AHTFAGNY	3
I-8.1b	152 ≈ Jk54	AHTFSGSF	3

Durch MU274, JK2 und JK36 blockierte Epitope **E1**, **E2** und **E3**

Name	WF#	CDR3	Epitop
s-16a	211	RLRGWITTRKPNEYDY	1

Tabelle 1: Charakteristika der selektionierten Nanobody-Familien aus Lama 538. Selektionierte Nbs wurden aufgrund von Länge und Sequenz der CDR3-Region verschiedenen Familien zugeordnet. Die Namen geben das Vorhandensein einer kurzen (s) oder langen hinge Region (l), das Fehlen (-) oder Vorhandensein (+) eines zusätzlichen Zystein-Paars, sowie die Länge der CDR3 in Anzahl von Aminosäureresten an. Klone wurden sequentiell nummeriert (WF#). Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Nbs sind durch ≈ # markiert. Aufgrund der Sequenzidentität zu bekannten Nb-Familien sowie bereits durch Blockade-Assays konnten die selektionierten Nbs einem der drei bekannten Epitope zugeordnet werden: Epitop 1 (≈ **MU274** rot), Epitop 2 (≈ **JK2** grün), Epitop 3 (≈ **JK36** blau). In drei Panningrunden konnten aus Lama 538 zwei unbekannte (gelb hinterlegt) und sieben bereits bekannte Nb-Familien (grau hinterlegt) selektioniert werden.

Mit der Phagenbibliothek aus Lama 538 wurden drei Panningrunden durchgeführt. Die erste Runde mit Blockierung des Epitops 1 durch Nb MU274 ergab 14 Sequenzen, die eine ähnliche CDR3-Sequenz wie der Nb JK2 (Epitop 2) besaßen (Tabelle 1). Zwei weitere Klone (WF#9, WF#16) zeigten Sequenz-Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Epitop 3 Nbs. Ein Klon mit bisher unbekannter Sequenz (WF#14)

konnte durch Blockade-Analysen ebenfalls dem Epitop 3 zugeordnet werden. Die zweite Panningrunde wurde mit Blockierung der Epitope 1 (MU274) und 2 (JK2) durchgeführt. Dabei reicherten sich weitere Klone der JK2 Familie sowie der Familien von JK43 und JK54 (Epitop 3) an. Eine letzte Panningrunde erfolgte mit Blockierung der Epitope 1 (MU274), 2 (JK2) und 3 (JK36).

Mit der Phagenbibliothek aus Lama 539 wurden zwei Panningrunden durchgeführt. Fünf selektionierte Klone aus dieser Runde gehörten zu der Familie I-8, zu der auch die Epitop 3 Familie JK36 gehört (Tabelle 2). Zwei bisher unbekannte Nb Familien konnten aufgrund von Blockadeanalysen ebenfalls dem Epitop 3 zugeordnet werden. Dabei reicherte sich ein Klon mit bisher unbekannter Sequenz an (WF211), der aufgrund von Blockadeanalysen ebenfalls dem Epitop 3 zugeordnet werden konnte.

Durch MU274 blockiertes Epitop **E1**

Name	WF#	CDR3	Epitop
I-8.3a	42	VIRTYSTY	3
I-8.2f	32	WHVFRGNY	3
I-8.2a	28;34-37 ≈ Jk36	DHTFAGVY	3
I-8.2b	39;40 ≈ Jk32	EHTFMGAY	3
I-8.2c	41 ≈ Jk24	HHTFAGAY	3

Durch MU274 und JK36 blockierte Epitope **E1** und **E3**

Name	WF#	CDR3	Epitop
I-9	192 ≈ Jk2	WHYAAGRDY	2
I-8.2d	178;187 ≈ Jk24	EHTFAGAY	3

Tabelle 2: Charakteristika der selektionierten Nanobody-Familien aus Lama 539. Die Benennung und Zuordnung der selektionierten Klone zu bereits bekannten Nb-Familien (grau hinterlegt) erfolgte aufgrund von Sequenzähnlichkeiten. Die bisher nicht bekannten (gelb hinterlegt) Sequenzen von WF42 und WF32 wurden aufgrund von Blockade-Assays dem Epitop 3 zugeordnet.

Mit der Phagenbibliothek aus Lama 10 wurden zwei Panningrunden durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten 4 Klone (WF53, WF71, WF67, WF69) mit einer Sequenzidentität zu bereits bekannten Epitop 3 (MU725, MU1105) bzw. Epitop 1 (MU738) Nbs. Darüber hinaus zeigten 13 Klone eine identische Sequenz zu dem im Labor klonierten Art2-spezifischen Nb s+16a. Es ist wahrscheinlich, dass dies auf eine Kontamination bei der Herstellung der Phagenbibliothek zurückzuführen ist. Art2 ist ein murines Oberflächenmolekül, das ebenfalls auf der Oberfläche von YAC-1-Zellen exprimiert wird. Es erfolgte eine zweite Panningrunde mit Blockade von Epitope 1 (MU274) und Art2 (s+16a). Bei dieser Runde wurden 7 weitere Klone mit Ähnlichkeit zu der Epitop 3 Familie MU1105 selektioniert.

Durch MU274 blockiertes Epitop E1

Name	WF#	CDR3	Epitop
s-24	53;71 = MU725	DVTLNPFTGWNTRSGPMYRYEYDY	3
#	67 = MU1105	DVTLNPFTGWDTRSGPMYRYEYDY	3
s+16a (α Art2)	49;51;55;57;59- 66;72	<i>IPFCNEFMRGDLDRAI (αArt2)</i>	-
s-14	69 = MU738	DRFVVAAGTHLDY	1

Durch MU274 und s+16a blockierte Epitop E1 und Art2

Name	WF#	CDR3	Epitop
I-24	97 = MU1105	DVTLNPFTGWDTRSGPMYRYEYDY	3
s-24	98;100;112;114;1 16 = MU1105	DVTLNPFTGWDTRSGPMYRYEYDY	3

Tabelle 3: Charakteristika der selektionierten Nanobody-Familien aus Lama 10. Die Benennung und Zuordnung der selektionierten Klone zu bereits bekannten Nb Familien (grau hinterlegt) erfolgte aufgrund von Sequenzähnlichkeiten.

Mit der Phagenbibliothek aus Lama 25 wurden zwei Panningrunden durchgeführt. In der ersten Runde wurden 18 Klone mit Sequenzidentitäten zu drei bekannten Epitop 2 Nb-Familien sowie vier Klone von zwei bisher unbekannt Familien (I-17a, I-17b) angereichert. Letztere wurden durch Blockadeassays dem Epitop 3 zugeordnet. In der zweiten Runde wurden zusätzlich zum Epitop 1 (MU273) das Epitop 2 mit MU1067, dem dominierenden Klon aus der ersten Runde, blockiert. Nach dieser Panningrunde wurden sechs bzw. sechzehn weitere Mitglieder der I-

17a und I-17b Familien sowie zwei zusätzliche bisher unbekannte Sequenzen (WF139, WF124) (gelb hinterlegt) selektioniert.

Durch MU274 blockiertes Epitop **E1**

Name	WF#	CDR37	Epitop
I-19.2a	75;76;79;84;86;88;90;93;94 = MU1067	RYQPRYYDSGDMDGYEYEF	2
I-19	73;77;89;91= MU1065	QYQERYYSDFSLKEKGMEY	2
I-19.1a	78;80;85;87;95= MU523	QYQDRYYDEFTWKEKDMDY	2
I-17a	96	ARSAELGSSRKIQQYDQ	3.
I-17b	74;82;83	ARSAGLGSSRRIEGYDK	3.

Durch MU274 und MU 1067 blockierte Epitope **E1** und **E2**

Name	WF#	CDR37	Epitop
s-19b	139	ADFRGWATWRDDPDQYDY	3
s-19a	124	VDRSTGWDSWRDDPDQYDY	3
I-17a	127;141;130;133	ARSAELGSSRKIQQYD	3
I-17b	129;144;121-123;125;128;131;132;134-136;138-142;143	ARSAGLGSSRRIEGYDK	3.
I-15.1c	140 ≈ MU1068	DRLVITKLSIADPGY	1

Tabelle 4: Charakteristika der selektionierten Nanobody-Familien aus Lama 25. Die Benennung und Zuordnung der selektionierten Klone zu bereits bekannten Nb-Familien (grau hinterlegt) erfolgte aufgrund von Sequenzähnlichkeiten. Die bisher nicht bekannten Sequenzen der Nbs aus den Familien I-17a, I-17b, s-19a und s-19b (gelb hinterlegt) wurden aufgrund von Blockade-Assays dem Epitop 3 zugeordnet.

Abbildung 9 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der Panningrunden mit den Phagenbibliotheken aus den vier mit CD38 immunisierten Lamas. Die Ergebnisse deuten an, dass die Blockade des Epitops 1 in der ersten Panningrunde weitgehend erfolgreich war. Nur einer der selektionierten Klone (WF69 aus Lama 10) war Epitop 1-spezifisch. Auch die Kontamination mit dem Art2-spezifischen Nb s+16a in der

Phagenbibliothek von Lama 10 wurde in der zweiten Runde durch Blockade mit s+16a vollständig unterdrückt. Weitere dominante CD38-spezifische Klone konnten ebenfalls durch Blockade der entsprechenden Epitope unterdrückt werden.

Insgesamt zeigten 32 von 236 CD38-spezifischen Klonen bisher noch unbekannte Sequenzen (gelb hinterlegte CDR3 Sequenzen in den Tabellen 1 bis 4):

- WF14 der Familie I-12 und WF211 der Familie s-16 aus der Phagenbibliothek Lama 538,
- WF32 und WF42 der Familie L-8 aus der Phagenbibliothek Lama 539.
- 26 Klone der Familien I-17a und I-17b sowie WF139 und WF124 der Familien s-19a und s-19b aus der Phagenbibliothek Lama 25.

Aus der Phagenbibliothek von Lama 10 konnten keine neuen Klone selektioniert werden.

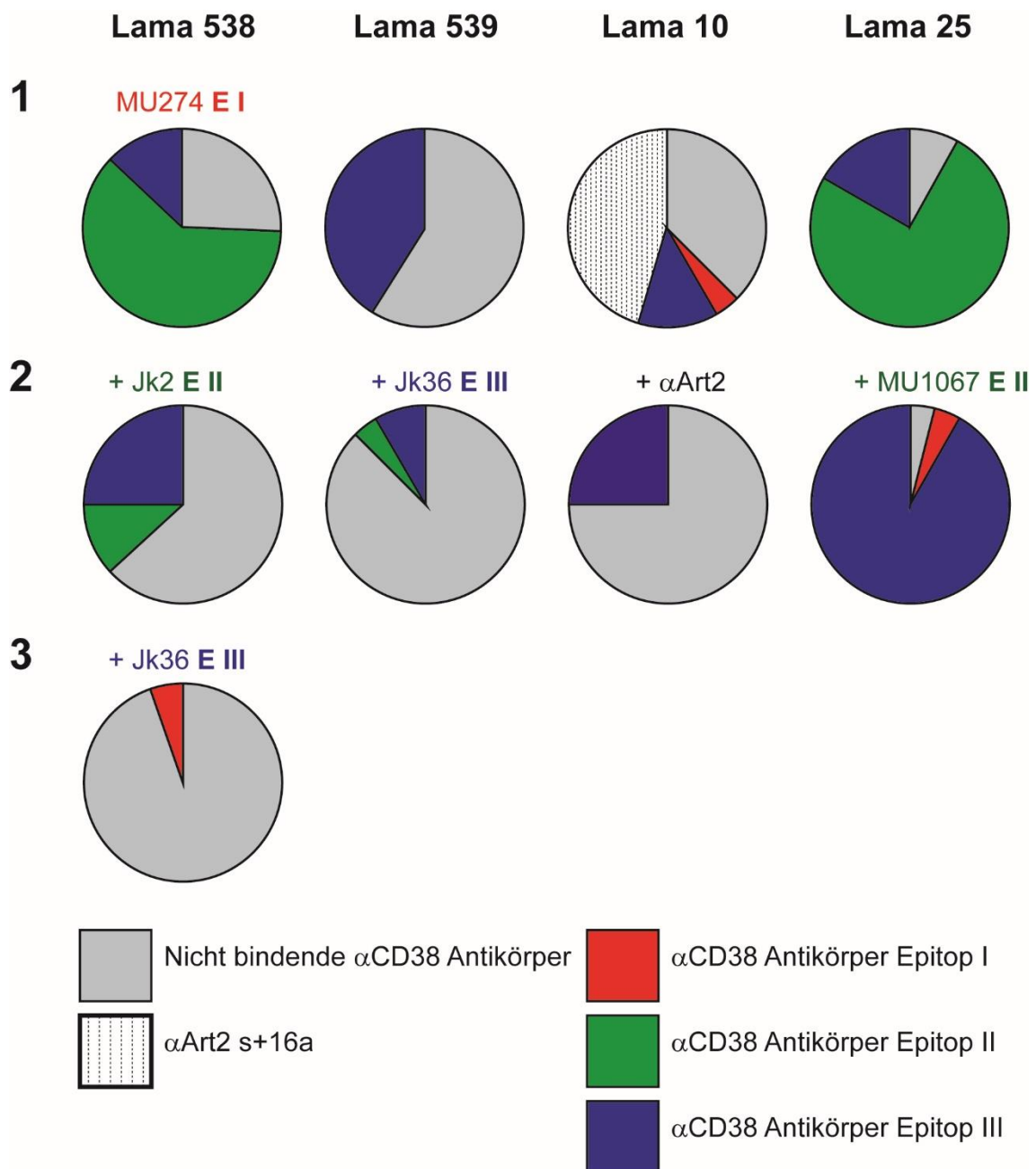


Abbildung 9: Anreicherung Epitop-spezifischer Nbs in sequentiellen Panningrunden. Für jede Phagenbibliothek aus den Lamas 538, 539, 10 und 25 wurden 2 oder 3 Panningrunden durchgeführt. Die erste Runde wurde jeweils unter Blockade des Epitops 1 mit Nb MU274 durchgeführt. Die Sequenzen der selektierten Klone wurden mit den Sequenzen bereits bekannter Nbs verglichen. Der Anteil der an Epitop 1 (rot), Epitop 2 (grün) bzw. 3 (blau) bindenden Nbs ist farblich hervorgehoben. Die Kontamination der Phagenbibliothek aus Lama 10 durch den ART2-spezifischen Nb s+16a wurde in der zweiten Panningrunde durch die Blockade mit s+16a vollständig unterdrückt.

4.1.3. Periplasmatische Expression und Bindungskontrolle der selektionierten Nanobodies

Zur Produktion der selektionierten Nbs wurden *E. coli* H2151 verwendet, die das Amber Stop Codon zwischen den kodierenden Regionen für den Nb mit C-terminalem His6x-cMyc tag und das gp3 Kapsidprotein des M13 Phagen erkennen. Der pHEN2 Vektor kodiert zudem für eine N-terminale bakterielle Signalsequenz, die den Proteinexport in das Periplasma ermöglicht (**Abbildung 5**). Proteine in den gewonnenen Periplasmalysaten wurden mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie Färbung analysiert (**Abbildung 10**). Die Ergebnisse zeigen eine prominente Bande auf der erwarteten Höhe von ~17 kDa in den Periplasmalysaten der aus Lama 523 selektionierten Klone WF14 und WF211. Die untere Bande bei ca. 14kD besteht möglicherweise aus Nbs, die ihren His6x-cMyc Marker durch proteolytische Degradierung verloren haben. Entsprechende Analysen der weiteren selektionierten Klone zeigten ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt).

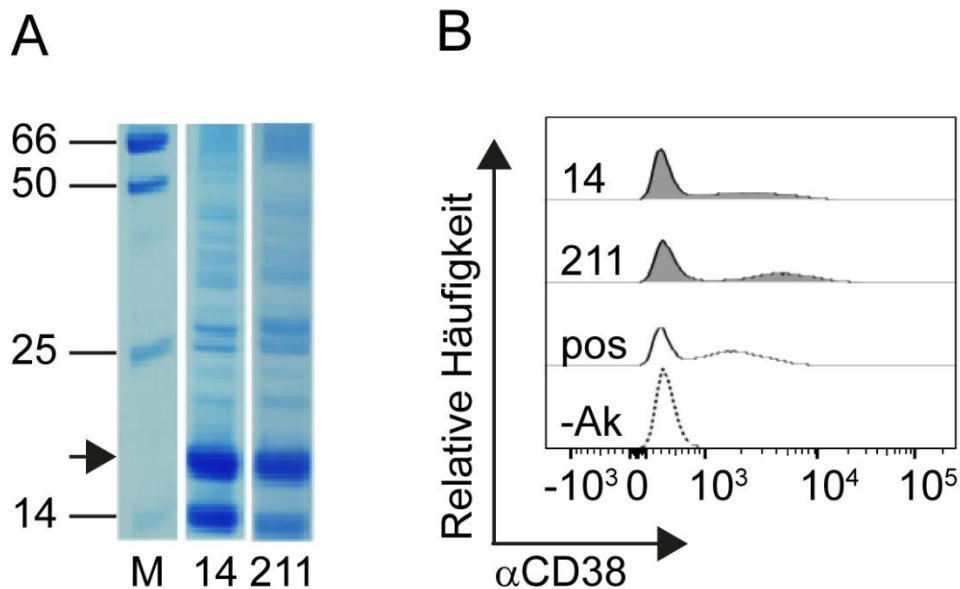


Abbildung 10: Expression und Bindungsanalyse der selektionierten Nbs WF14 und WF211. **A:** Proteine in *E. coli* Periplasmalysaten wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und mit Coomassie angefärbt. Der Pfeil markiert die Bande in der erwarteten Größe der Nbs (~ 17 kDa). M = Marker (Albumin 1 µg 66 kDa, IgH 0.5 µg 50 kDa, IgL 0.25 µg 25 kDa und Lysozym 0.1 µg 14kDa). **B:** Eine 50:50 Mischung aus CD38-negativen und CD38-transfizierten YAC-1-Zellen wurde jeweils mit Nb-haltigem Periplasmalysat inkubiert. Als Negativ- und Positivkontrollen wurden PBS (-Ak) bzw. Nb MU1067 (pos) eingesetzt. Gebundene Nbs wurden mit FITC-konjugiertem cMyc-Tag-spezifischen Antikörper 9E10 mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Der C-terminale cMyc-Tag ermöglicht die Untersuchung der spezifischen Bindung der Nbs mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurde eine Mischung aus CD38-negativen und CD38 transfizierten YAC-1-Zellen mit Nb-haltigem Periplasmalysat mit dem CD38 spezifischem Nb1067 als Positivkontrolle bzw. ohne Antikörper inkubiert. Ein sekundärer FITC-konjugierter α Myc-Tag-Antikörper wurde zur Detektion gebundener Nbs via Durchflusszytometrie angewendet (**Abbildung 10B**). Die Ergebnisse bestätigen die Spezifität der Nbs WF14 und WF211. Im Vergleich zur negativen Kontrolle zeigt der doppelgipflige Verlauf der Histogramme von WF14 und WF211 und der Positivkontrolle die spezifische Bindung an das Oberflächenprotein CD38. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die anderen neu selektionierten Nbs aus Lamas 538, 539 und 25 spezifisch an CD38 binden.

4.1.4. Umklonierung der Nanobodies in den eukaryotischen pCSE2.5 Vektor und Produktion rekombinanter Nanobodies und Schwerekettenantikörper in HEK-6E Zellen

Nach Bestätigung der Bindung der selektionierten Nbs an CD38 wurde für die weitere Analyse und im Hinblick auf die Tumorthherapie *in vivo* die Produktion der rekombinanten Antikörper in Säugetierzellen (HEK-6E) angestrebt. Dafür erfolgte die Umklonierung der Nb-kodierenden DNA-Sequenz aus dem Phagemidvektor pHEN2 in die Vektoren pCSE2.5 His/Myc und pCSE2.5 hFc IgG1. Der C-terminale His/Myc-Tag ermöglicht wieder die Detektion des Tags in durchflusszytometrischen Untersuchungen und damit die Charakterisierung der Nbs bezüglich ihrer Spezifität, ihrer Bindungsaffinität und ihres Bindungsepitops. Die Fusionierung der Nbs an die hinge-, CH2- und CH3-Domänen von human IgG1 Fragment erlaubt die Produktion von Schwereketten-Antikörpern und somit die Auslösung Fc-vermittelter Effektorfunktionen.

Die Überprüfung der erfolgreichen Umklonierung erfolgte durch DNA-Sequenzierung. Die Ergebnisse zeigten, dass alle selektionierten Nbs erfolgreich in den Vektor pCSE2.5 His/Myc und pCSE2.5 hFc IgG1 überführt wurden. Nach Bestätigung der Bindung der selektionierten Nbs an CD38 wurde für die weitere Analyse und im Hinblick auf die Tumorthherapie *in vivo* eine eukaryotische Expression der Proteine erzielt. Dafür erfolgte die Umklonierung der entsprechenden DNA-Sequenz im pCSE2.5 Vektor. Die Inserts aus dem Phagemidvektor pHEN2 und den Vektoren pCSE2.5 His/Myc und pCSE2.5 hFc IgG1 wurden durch die Restriktionsenzyme Nco1 x Not1 (Pci1xNot1 bei Vorhandensein einer internen Schnittstelle) verdaut.

Durch den C-Terminal His/Myc-Tag und die Möglichkeit der Detektion des Tags in den durchflusszytometrischen Untersuchungen ist eine Charakterisierung der Nbs bezüglich ihrer Spezifität, ihrer Bindungsaffinität und ihres Bindungsepitops möglich. Die Fusionierung der Nbs am humanen Fc IgG1 Fragment erlaubt dann die Auslösung der immunologischen Antworten *in vitro* und *in vivo*.

Nach Ligation wurden XL2Blue *E. coli* Stämme transformiert. Die eingebaute Carbenicillin-Resistenz in den pCSE2.5 Vektoren erlaubte das Wachstum der Bakterienstämme nach erfolgreicher Transformation und ihrem Ausstrich auf

Carbenicillin enthaltenden Agarplatten. Einzelne Klone wurden gepickt, amplifiziert und die DNA extrahiert.

Eine weitere Überprüfung der Umklonierung erfolgte durch Sequenzierung und Analyse der DNA-Sequenz. Alle selektionierten Nbs wurden erfolgreich in den Vektor pCSE2.5 His/Myc und pCSE2.5 hFc IgG1 überführt. **Abbildung 11** zeigt exemplarisch die Aminosäuresequenz der Konstrukte WF211 His/Myc und WF211-hcAb.



Abbildung 11: Aminosäuresequenzen von WF211-His und WF211-hIgG1. Nach Umklonierung der Nb-kodierenden Sequenzen aus dem Phagemidvektor pHEN2 in die Vektoren pCSE2.5 His/Myc (**A**) und pCSE2.5 hFc IgG1 (**B**) wurden die DNA-Sequenzen analysiert und in Aminosäure-Sequenzen übersetzt. Die drei CDR Schlaufen von WF211 sind fett hervorgehoben, ebenso wie der C-terminale His6x-cMyc tag des monovalenten Nbs. Die hinge Region des bivalenten Schwerekettenantikörpers ist ebenfalls fett hervorgehoben, der Anfang der Sequenzen der CH2 und CH3 Domänen sind mit dem Pfeil angedeutet.

Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Aminosäuresequenz erfolgte die Proteinproduktion der Nb-Konstrukte in den für sezernierte Proteine optimierten HEK-6E Zellen. Die Transfektion der Zellen durch die Plasmide erfolgte mithilfe von JetPEI. Letzteres bildet durch seine kationische Eigenschaft einen Komplex mit der negativ geladenen DNA und erleichtert dadurch die Aufnahme in die Zellen. Nach sechstägiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden die Überstände geerntet und die Proteinproduktion mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse des HEK-Zellüberstandes nach Transfektion mit den Plasmiden pCSE2.5 WF211 His/Myc (A) und pCSE2.5 WF211hcAb IgG1 (B). Es zeigen sich deutliche Banden an den zu erwartenden Stellen bei ~17 kDa für Monomere (A) und ~40 kDa für Schwereketten (B). Die zusätzlichen schwachen Banden entsprechen endogenen Proteinen aus den HEK-Zellen. Der Vergleich mit Markerproteinen bekannter Molekularmasse und Konzentration erlaubt zudem eine Abschätzung der Proteinkonzentration (ca. 1 mg Protein/10 ml Überstand).

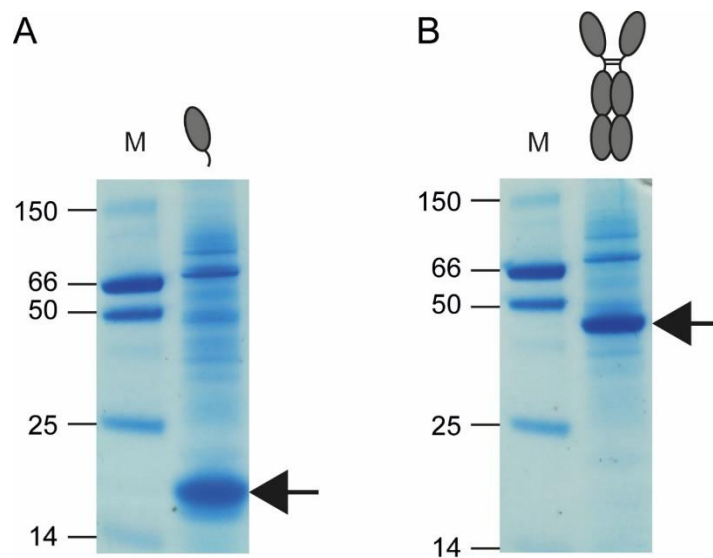


Abbildung 12: Produktion von rekombinantem WF211His/Myc und WF211-hlgG1 pCSE2.5 his/Myc und pCSE2.5 hFc IgG1 Plasmide wurden zur Transfektion von HEK-6E Zellen verwendet. Nach 6 Tagen Kultur in serumfreiem Medium erfolgte die Ernte und Analyse der Überstände mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (10 µl/Well) unter reduzierenden Bedingungen. Die Pfeile zeigen auf die Banden in der erwarteten Größe von ~17 kDa für Nb Monomere (A) und ~40 kD für einzelne Ketten der Nb-Schwereketten-Antikörper (B).

Für die nachfolgend geschilderten Versuche wurden die in **Tabelle 5** aufgeführten 6 Nbs (je ein Mitglied der 6 neu selektierten Nb-Familien aus den Lamas 538, 539, und 25, s. Tabellen 1-4) als His-Myc getagte Monomere sowie als humane IgG1 Schwerekettenantikörper verwendet:

Lama	Name	Familie	Epitop
538	WF211	s-16a	1
	WF14	l-12b	3
25	WF121	l-17b	3
	WF124	s-19a	3
539	WF32	l-8.3a	3
	WF42	l-8.2f	3

Tabelle 5: Für weitere Untersuchungen erfolgreich umklonierte und produzierte Nanobody-Schwereketten-Antikörper. Die Eigenschaften der noch nicht zuvor selektionierten Nbs wurden im weiteren Verlauf untersucht. Die Nbs WF121 und WF124 der respektiven Familien l-17b und s-19a aus Lama 25 wurden willkürlich ausgewählt. Die restlichen 4 Nbs sind die einzigen Mitglieder ihrer jeweiligen Familien.

4.1.5. Monovalente Nanobody-His/Myc und bivalente Nanobody-hlgG1 Schwereketten-Antikörper binden spezifisch an CD38 exprimierende Zellen

Zur Überprüfung der Spezifität der rekombinanten Nbs und Schwereketten-Antikörper wurden FACS Analysen an CD38-negativen und CD38-transfizierten YAC-1 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit 10 µl der HEK Zellüberstände inkubiert, überschüssige Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und gebundene Antikörper mit sekundären Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert (Myc-Tag-spezifischer Antikörper 9E10 für Nb-His/Myc Konstrukte und ein humaner IgG-spezifischer Antikörper für die Schwereketten-Antikörper) (**Abbildung 13**). Die Ergebnisse bestätigen die spezifische Bindung von WF211-His/Myc und WF211-hlgG1 Schwereketten-Antikörpern an CD38-transfizierte YAC-1-Zellen, aber nicht an CD38-negative parentale YAC-1 Zellen.

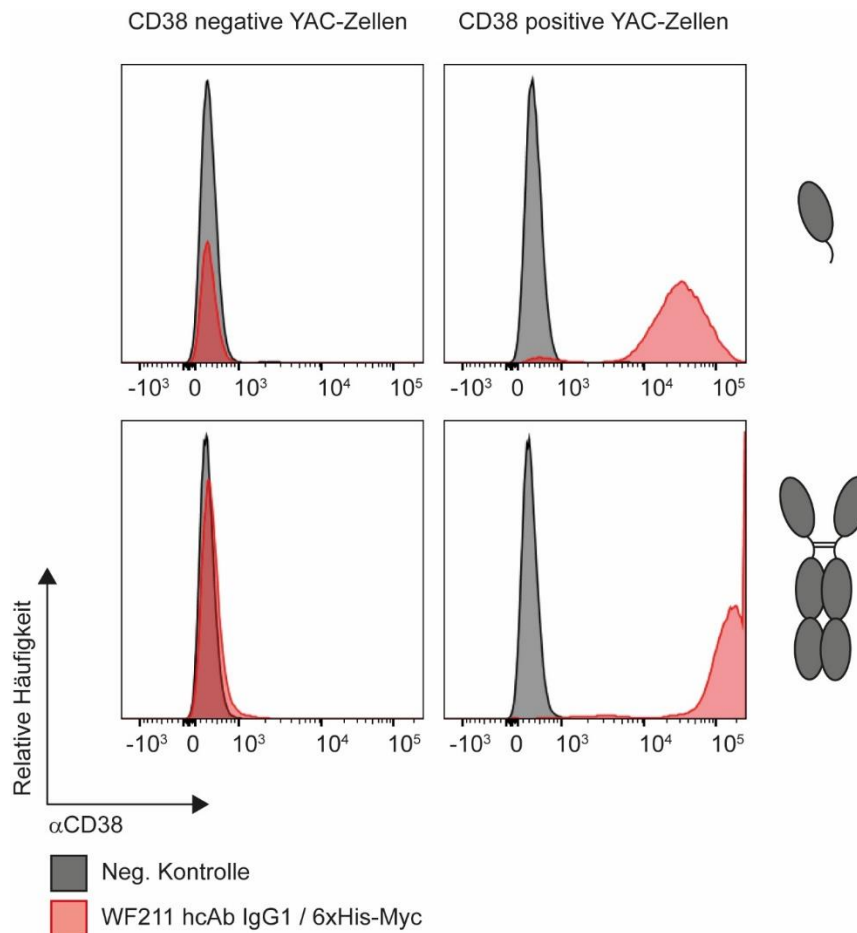


Abbildung 13: WF211-His/Myc und WF211-hlgG1 Schwereketten-Antikörper binden spezifisch an CD38-transfizierte YAC-1-Zellen. CD38-negative bzw. CD38-transfizierte YAC-1-Zellen wurden entweder mit WF211-His/Myc oder WF211-hlgG1 haltigen HEK-6E-Überständen inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht bindende Ak eingesetzt. Die Zellen wurden mehrfach mit PBS gewaschen und mit FITC-konjugiertem α Myc-Tag (oben) oder mit α hlgG1 (unten) inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

4.1.6. Ermittlung der relativen Bindungsstärken der rekombinanten Nanobodies und Schwereketten-Antikörper

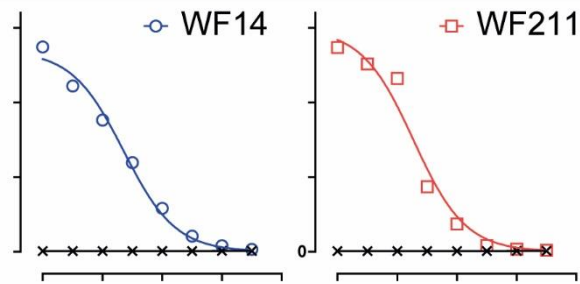
Um die relative Bindungsstärke der rekombinanten Nbs und Antikörper zu ermitteln, wurden Titrations- und Dissoziationsanalysen durchgeführt.

4.1.6.1. Titrationsversuche

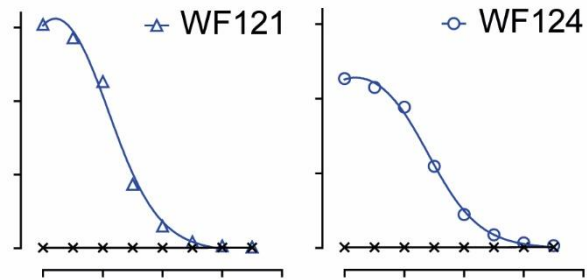
Die Konzentration eines Antikörpers bei halbmaximaler Signalstärke stellt ein indirektes Maß für die Affinität des Antikörpers dar. Zu diesem Zweck wurde eine $\sqrt{10}$ Titrationsreihe mit Konzentrationen von 1 μ M bis zu 0,1 nM der Nb-His

Konstrukte zu den CD38-positiven YAC-1-Zellen hinzugegeben. Nach Waschen der Zellen wurden die gebundenen Nbs mit einem Fluorochrom-konjugierten α Myc-Sekundärantikörper detektiert. Aus den ermittelten MFI Werten wurden nonlineare Regressionkurven mittels der GraphPad PRISM Software erzeugt (**Abbildung 14**) und die jeweiligen KD errechnet (**Tabelle 6**). Diese liegen für alle 6 Nbs im ein- bzw. zweistelligen nanomolaren Bereich.

L538



L25



L539

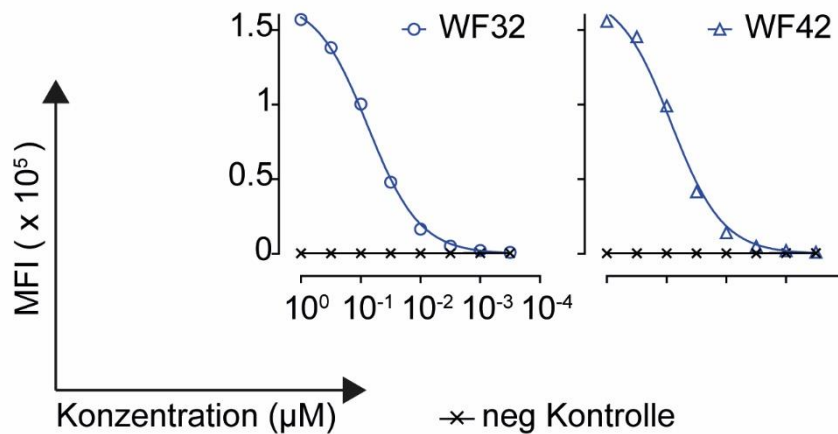


Abbildung 14: Titrationsanalyse der CD38-spezifischen rekombinanten Nanobodies aus den Lamas 538, 539 und 25. CD38-transfizierte YAC-1-Zellen wurden mit Nbs in Konzentration von 1 μM bis 0,1 nM inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein nicht CD38 bindender Nb eingesetzt. Die Detektion gebundener Nbs erfolgte mit APC-konjugiertem αMyc -Antikörper am FACS. Die Kurven in blau kennzeichnen die sechs Nbs, die an Epitop 3 binden; die Kurve in rot den Nb WF211, der an Epitop 1 bindet.

Lama	Name	Familie	KD(nM)	Epitope
538	WF211	s-16a	13.2	1
	WF14	l-12b	6.6	3
25	WF121	l-17b	25	3
	WF124	s-19a	6.1	3
539	WF32	l-8.3a	4	3
	WF42	l-8.2f	10	3

Tabelle 6: Dissoziationskonstante der untersuchten Nanobodies. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde für jeden Nb aus den respektiven nonlinearen Regressionskurven ermittelt (s. Abb. 14). Alle KD liegen im nanomolaren Bereich. Nb WF32 aus Lama 539 zeigt die höchste Bindungsaffinität. Respektiv zeigt Nb WF 121 aus Lama 25 die niedrigste Affinität.

4.1.6.2. Dissoziations-Assay

Um die Bindungsstärke der monomeren Nb-His/Myc-Konstrukte weiter zu charakterisieren, wurde ihre Dissoziation von CD38-transfizierten Zellen im zeitlichen Verlauf analysiert. Zu diesem Zweck wurden CD38-transfizierte YAC-1-Zellen mit eFluor 450 markiert. Ein zweites Aliquot CD38-positiver YAC-1-Zellen wurde mit dem jeweiligen CD38-spezifischen Nb-His/Myc vor-inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die beiden Aliquots vor Beimengung sowie 120 Minuten nach Beimengung mit dem Durchflusszytometer untersucht (**Abbildung 15**). Kurz vor jeder Untersuchung wurde ein FITC-konjugierter α Myc-Antikörper hinzugegeben, um die zelloberflächengebundenen Nbs zu detektieren. Die Relation der Abnahme der FITC-Fluoreszenzintensität der Nb-behandelten eFluor450-negativen Zellen im Zeitverlauf zur zunehmenden FITC-Fluoreszenzintensität der eFluor450-positiven Zellen im Zeitverlauf ist ein Maß für die Dissoziationsgeschwindigkeit der Nb-His Konstrukte. Die Ergebnisse zeigen für die Nbs WF121, WF32 und WF42 wenig Ablösung von der Gruppe der prä-inkubierten Zellen bei gleichzeitig nur geringer FITC-Anfärbung der eFluor450 markierten Zellen. Nbs WF211 und WF124 zeigen eine intermediäre Dissoziation und WF14 die stärkste Dissoziation, d.h. die niedrigste Bindungsstärke.

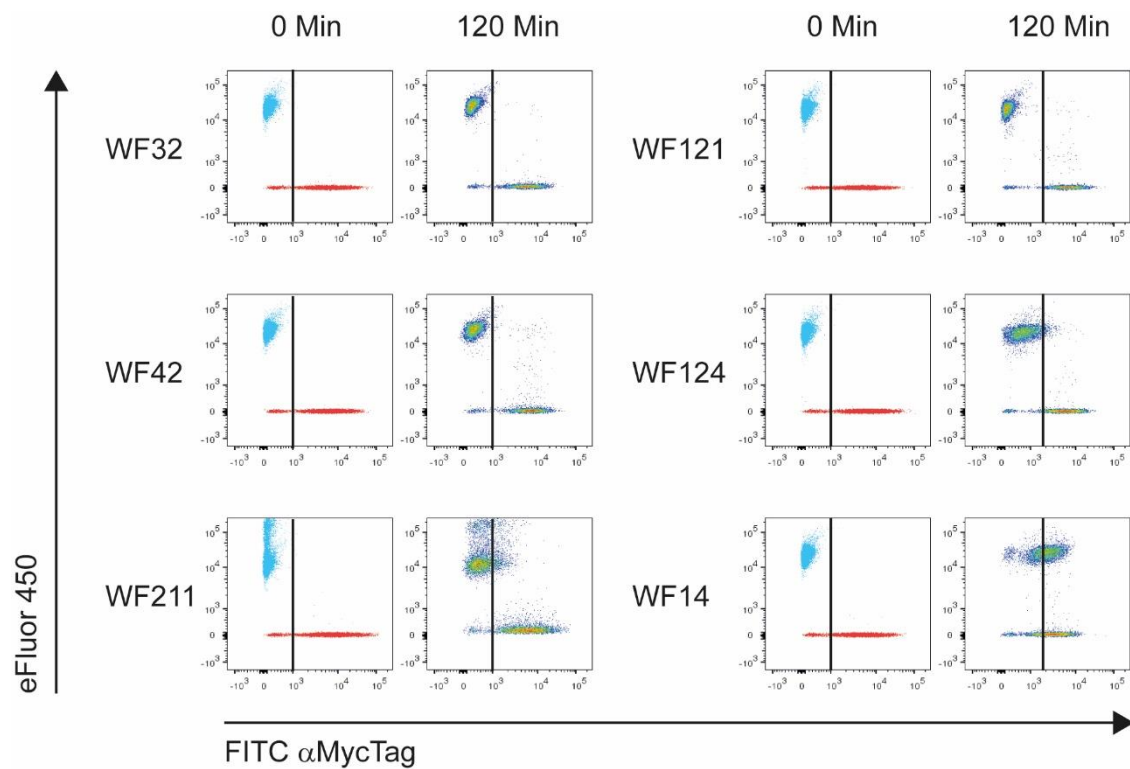


Abbildung 15: Dissoziationsanalyse der CD38-spezifischen rekombinanten Nanobodies aus den Lamas 538, 539 und 25. CD38-transfizierte YAC-1-Zellen wurden mit den jeweiligen CD38-spezifischen Nb-His/Myc Konstrukten inkubiert. Nach mehrmaligen Waschgängen wurde die durchflusszytometrische Untersuchung vor (Spalte links) und 120 Minuten nach Beimengung (Spalte rechts) der gleichen Anzahl mit eFluor vormarkierten CD38-positiven YAC-1-Zellen durchgeführt. Die FACS Plots der linken Spalten resultieren aus einer Superposition der Analysen beider Zellgruppen vor Beimengung. Detektion mit einem FITC konjugierten α Myc-Tag-spezifischen sekundären Antikörper. Durch schwache Bindung lösen sich Konstrukte ab und binden an zuvor unmarkierte Zellen. Die Bindungsstärke der untersuchten Nbs nimmt von links oben (WF32) nach rechts unten (WF 14) ab.

4.1.7. Epitopkartierung

Mittels Kristallographie waren zwei distinkte Nb-Bindungsepitope auf CD38 identifiziert worden (Li, Qi, Unger, & Nan Hou, 2016): MU274 = Epitop 1 und MU1067 = Epitop 2. JK36 bindet unabhängig von diesen Nbs und wurde deshalb dem Epitop 3 zugeordnet. Um zu untersuchen, ob die neu selektionierten Nbs überlappende oder unterschiedliche Epitope auf CD38 binden, führten wir Kreuzblockadeanalysen durch. Dazu wurden Zellen vorab mit einem nichtmarkierten Nb vor-inkubiert und dann die Bindung eines zweiten Fluorochrom-konjugierten Nbs per Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 16**). Die Ergebnisse von Kontrollanfärbungen zeigen, dass die drei genannten Nbs sich jeweils nur selbst, aber nicht gegenseitig blockieren.

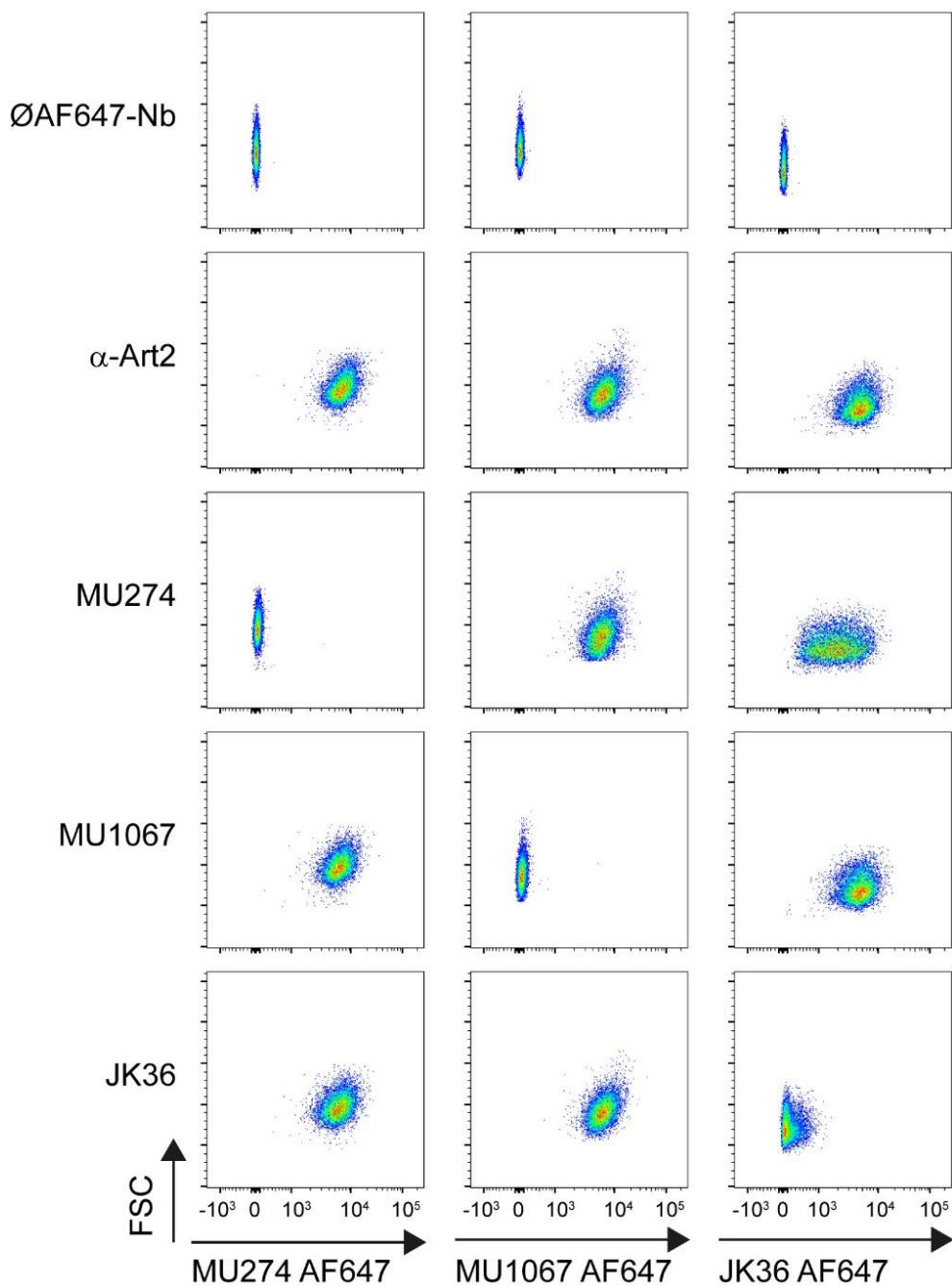


Abbildung 16: Kreuzblockadeversuche ermöglichen die Feststellung nicht-überlappender Epitope. CA46-Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C mit einem nicht konjugierten Nb vor-inkubiert. (links). Anschließend wurde ein AF647-konjugierter Nb hinzugegeben. Nach weiterer 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Anwesenheit des respektiven Nbs kann nur das AF647 Signal desselben Nbs unterdrückt werden, nicht aber die Bindungen eines anderen Nbs. Als Kontrollen wurden die Zellen mit einem irrelevanten Art2-spezifischen Nb vor-inkubiert, bzw. ohne Zugabe eines AF647-konjugierten Nbs analysiert.

Entsprechende Versuche wurden auch nach Vorinkubation mit allen neu isolierten Nbs als Blockade und mit zwei weiteren AF647-konjugierten Nbs zur Detektion wiederholt (**Tabelle 7**). Die Ergebnisse zeigen, dass der neuselektionierte Nb WF211 an Epitop 1 bindet. WF14, WF32 und WF42 binden an Epitop 3. WF121 und WF124 binden ebenfalls an Epitop 3, blockieren aber zusätzlich auch den Nb WF211 (Epitop 1) (**Tabelle 7**).

Name	Klon	MU274	WF211	JK2	MU523	JK36
	∅AF647-Nb	100	100	100	99	100
	α-Art2	0	--	0	0	0
I-15.2a	MU274	99	98	-31	2	36
I-19.2a	MU1067	8	31	99	99	26
I-9.1c	JK2	3	-2	56	16	11
I-19.1a	MU523	20	30	99	98	44
I-8.2a	JK36	16	-13	19	-13	97
<i>Lama 538</i>						
I-12b	WF14	6	16	27	-12	62
s-16a	WF211	96	97	12	-9	19
<i>Lama 539</i>						
I-8.2f	WF32	1	-21	21	-11	99
I-8.3a	WF42	7	3	14	-2	99
<i>Lama 25</i>						
I-17a	WF121	10	71	16	-13	99
s-19a	WF124	15	88	22	-9	100

Tabelle 7: Epitopkartierung der selektierten Nbs. CA46-Zellen wurden wie in Abb. 16 für 30 Minuten bei 4°C mit nicht konjugierten Nbs inkubiert (linke Spalte). Anschließend wurden AF647-konjugierte Antikörper mit bekannten Bindungsepitopen hinzugefügt (obere Zeile). Nach erneuter 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und mittels FACS analysiert. Die Zahlen geben die prozentuale Blockade der mittleren Fluoreszenzintensität von Zellen an, die in Abwesenheit konkurrierender Nbs markiert wurden. Negative Zahlen geben eine verstärkte Bindung des AF647-konjugierten Nbs nach Bindung des unkonjugierten Nbs an. Die maximale Hemmung der Bindung der jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Nbs ist farblich hervorgehoben (E1: rot, E2: grün, E3: blau).

Auf der Grundlage weiterer Kreuzblockadeanalysen lassen sich die 22 Nb-Familien drei nicht überlappenden Bindungsepitopen zuordnen (**Tabelle 8**).

Ep	Familie	Name	Klon	Jko19	JKo36	MU274	WF211	Jko2	MU523
3	18	l-17a	WF121	99	99	10	71	16	-13
3	21	s-19b	WF139	99	100	2	94	7	-9
3	21	s-19a	WF124	97	100	15	88	22	-9
3	3	l-8.3a	WF42	99	99	7	3	14	-2
3	1	l-8.1b	WF9	65	50	5	-16	22	-12
3	2	l-8.2a	Jko36	97	97	16	-13	19	-13
3	2	l-8.2f	WF32	98	99	1	-21	21	-11
3	22	s-24a	MU1105	99	99	6	8	61	-3
3	22	s+/-24d	WF100	88	91	0	9	52	-7
3	22	s+/-24b	WF114	99	99	2	10	56	-5
3	15	l-15.4a	Jko19	97	99	8	12	-35	-17
3	7	l-12b	WF14	71	62	6	16	27	-12
1	9	s-14a	MU738	-7	40	53	64	8	-15
1	9	s-14b	WF69	11	50	63	74	25	-11
1	11	l-14.2b	Jko22	31	28	96	97	24	-8
1	8	l-13a	JKo28	96	74	94	94	-10	-9
1	17	s-16a	WF211	53	19	96	97	12	-9
1	14	l-15.3a	MU1053	39	11	93	94	-12	-9
1	5	l-9.2a	MU370	33	24	80	89	-8	-5
1	13	l-15.2a	MU274	18	36	99	98	-31	2
1	12	l-15.1b	MU1068	37	47	81	86	0	-7
1	12	s-15.1c	WF140	15	52	77	86	-44	-9
1	6	l-9.3b	Jko29	5	33	98	97	9	-4
1	16	l+/-15b	MU415	19	37	98	98	36	-11
1	10	l-14.1a	Jko44	-3	45	83	87	11	-13
2	19	l-19.1a	MU523	9	44	20	30	99	98
2	20	l-19.2a	MU1067	36	26	8	31	99	99
2	4	l-9.1c	Jko2	10	11	3	-2	56	16

Tabelle 8: Kreuzblockadeversuche erlauben die Zuordnung der Nanobodies aus allen 22 Familien zu drei Hauptepitopen. CA46-Zellen wurden wie in Abb. 16 und Tabelle 7 mit unterschiedlichen Nbs vorbehandelt (Spalten 1-3) und dann mit AF647-konjugierten Nbs (erste Zeile, Spalten 5-9) markiert. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Die Zahlen geben die prozentuale Blockade der mittleren Fluoreszenzintensität von Zellen an, die in Abwesenheit konkurrierender Nbs markiert wurden.

Um die Bindungsepitope der Nbs mit dem von Daratumumab zu vergleichen, wurden entsprechende Kreuzblockadeversuche auch mit AF647-konjugiertem Daratumumab-scFv bzw. Daratumumab-hcAb durchgeführt (**Tabelle 9**).

Ep	Familie	Name	Klon	Dara ScFv	Dara hcAb
3	18	l-17a	WF121	99	95
3	21	s-19b	WF139	99	99
3	21	s-19a	WF124	99	99
3	3	l-8.3a	WF42	97	83
3	1	l-8.1b	WF9	-23	-63
3	2	l-8.2a	JK36	-9	-48
3	22	s+/-24d	WF100	46	-27
3	15	l-15.4a	JK19	86	31
3	7	l-12b	WF14	32	-36
1	9	s-14a	MU738	87	43
1	9	s-14b	WF69	93	60
1	11	l-14.2b	JK22	99	96
1	8	l-13a	JK28	98	92
1	17	s-16a	WF211	99	97
1	14	l-15.3a	MU1053	98	92
1	5	l-9.2a	MU370	97	73
1	13	l-15.2a	MU274	99	98
1	12	l-15.1b	MU1068	97	84
1	12	s-15.1c	WF140	96	72
1	6	l-9.3b	JK29	99	97
1	16	l+/-15b	MU415	98	98
1	10	l-14.1a	JK44	95	76
2	19	l-19.1a	MU523	99	94
2	20	l-19.2a	MU1067	99	96
2	4	l-9.1c	JK2	-1	-46

Tabelle 9 Kreuzblockade mit Dara-ScFv und Dara-hFc. CA46-Zellen wurden wie in Abb. 16 und Tabelle 7 mit unterschiedlichen Nbs vorbehandelt (Spalten 2-4) und dann mit AF647-konjugiertem Daratumumab scFv bzw. Daratumumab hcAb markiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindung des Daratumumab von allen Nbs der Familie 1 gehemmt wird. Ferner blockieren auch die meisten Epitop 2 und einige Epitop 3 Nbs die Bindung von Daratumumab. Lediglich Nbs JK2 (Epitop 2, Familie 4) sowie WF9, JK36 (Epitop 3, Familien 1 und 2) zeigen keine Bindungshemmung von Dara-scFv und Dara-hcAb.

4.2. Fc-Engineering von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern

4.2.1. Einführung von Mutationen durch Punktmutation oder Klonierung

In dem folgenden Abschnitt wird die Herstellung, Produktion und Reinigung von Schwereketten-Antikörpern beschrieben, die durch Fc-Engineering modifiziert wurden. Mittels PCR Mutagenese wurden gezielt sogenannte Knob-in-Hole Punktmutationen eingefügt, die laut Publikationen anderer Arbeitsgruppen die Heterodimerisierung fördern. Des Weiteren wurden Mutationen eingefügt, die die Bindung an den C1q Komplementfaktor bzw. den CD16 Fc γ -Rezeptor verstärken oder vermindern.

4.2.2. Heterodimerisierung der Nanobody-Schwereketten-Antikörper durch Knob-in-Hole Mutation

Ein etabliertes Modell für die Herstellung von bispezifischen heterodimeren Antikörper ist die gezielte Anlagerung von zwei Schwereketten, die unterschiedliche Bindungsdomänen vorweisen. Um die Ausprägung von Heterodimeren gegenüber Homodimeren zu fördern, wurden sogenannte Knob-in-Hole Mutationen für die Fc Domänen von humanem IgG1 entwickelt (Ridgway, Presta, & Carter, 1996). Die Knob Mutation T366W wurde durch PCR Mutagenese eingefügt. Die drei Hole Mutationen wurden durch Ersatz der Wildtyp IgG1 Fc kodierenden Region durch ein synthetisch hergestelltes DNA-Fragment mit bereits enthaltenen Mutationen mittels Restriktionsverdau und Religation hergestellt. Plasmid DNAs wurden extrahiert und sequenziert. Die Sequenzen wurden dann mit Hilfe der 4Peaks Software analysiert und mit dem Wildtyp hFc IgG1 verglichen (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**). Die Ergebnisse bestätigen den erfolgreichen Austausch der Aminosäuren an Position 366, 368 und 407 der CH3-Domäne.

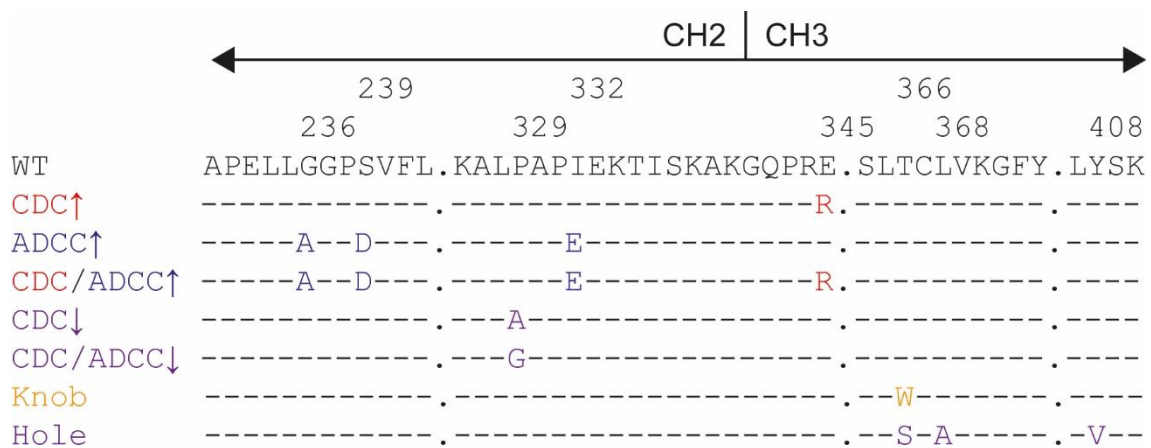


Abbildung 17: Teilaminosäuresequenzen der mutierten Fc-Fragmente im Vergleich zum Wildtyp. Punktmutationen wurden mittels zielgerichteter PCR-Mutagenese eingeführt. Die Abbildung zeigt ein Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Bereich der eingeführten Mutationen. WT: Wildtyp; CDC↑: E345R (rot) zur verstärkten Bindung an den Komplementfaktor C1q; ADCC↑: S239D I332G G236A (blau) zur verstärkten Bindung an den Fcγ-Rezeptor CD16; CDC↓: P329A (lila) zur verminderten Bindung an C1q, CDC/ADCC↓: P329G (lila) zur verminderten Bindung an C1q und CD16. Knob: T366W (gelb) und Hole: T366S L368A Y407V (lila) zur verstärkten Bildung eines Heterodimers.

4.2.3. Modulation der Bindung von Schwereketten-Antikörpern an den C1q Komplementfaktor und an Fcγ-Rezeptoren.

Die Punktmutationen E345R, P329A und P329G wurden durch zielgerichtete PCR Mutagenese in CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper eingefügt, die Triplemutation S239D/I332G/G236A zur ADCC Optimierung wurde analog zur Hole Mutation (Siehe **Abschnitt 3.7.2**) durch Subklonierung erzeugt. Alle eingefügten Mutationen wurden mittels DNA Sequenzierung verifiziert (**Abbildung 17** und

Abbildung 18). **Tabelle 10** gibt einen Überblick über die erfolgreich hergestellten Schwereketten-Antikörper Mutanten.

Nb	Epitope	CDC↑	ADCC↑	CDC↑ ADCC↑	CDC↓	CDC↓ ADCC↓
WF211	1	+	+	+	+	+
WF121	3	+	+	+	+	+
211-10GS- 121 dim	1-3	+	+	+	+	+
MU1067	2	+	+	+	+	+
JK36	3	+	+	+	+	+
36-10GS- 1067 dim	2-3	+	+	+	+	+
WF14	3	+	+	+	+	+
WF100	3	+	+	+	+	+

Tabelle 10: Übersicht der erfolgreich produzierten CDC und ADCC modulierenden Schwereketten-Antikörper. Die Mutanten sind wie in Abb. 17 bezeichnet.

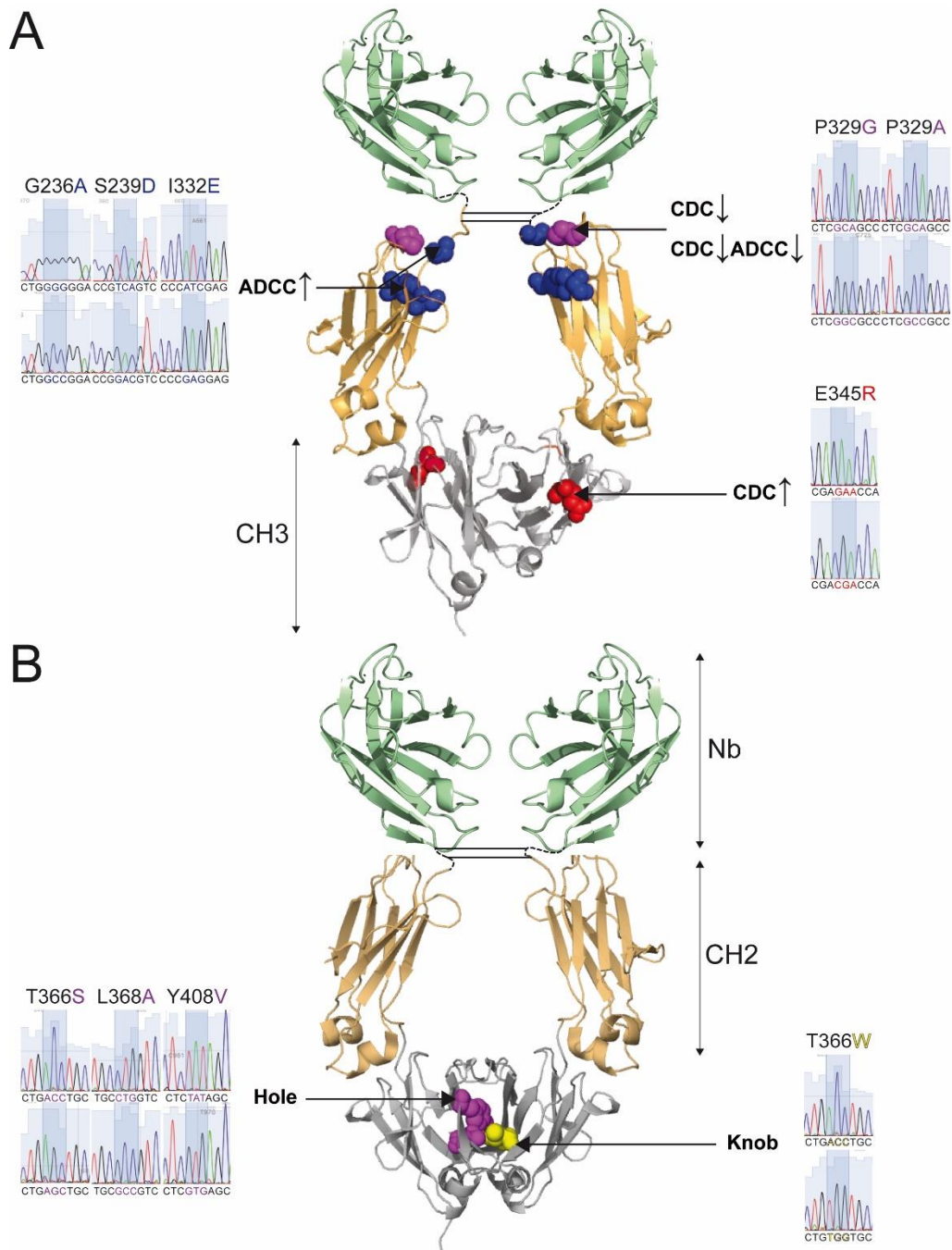


Abbildung 18: Molekülmodell eines Nanobody-basierten Schwereketten-Antikörpers mit den eingefügten Mutationen und entsprechender DNA-Sequenz. Ein *ribbon*-Modell der 3D-Struktur des Nb MU375 (pdb code 5f21, Grün) wurde mithilfe der Pymol Software an ein Modell der CH2 (Gold) und CH3 (Grau) Domänen von humanem IgG1 (pdb code 1igt) angelagert. Die eingefügten Mutationen sind als *space-fill* Modelle dargestellt (Beschriftung und farbliche Hervorhebung wie in Abb. 17). Die DNA Sequenz Piktogramme zeigen jeweils den Wildtyp (oben) im Vergleich zur Mutante (unten). **A:** Modell der CDC und ADCC verstärkenden bzw. abladierenden Mutationen: CDC↑: E345R (rot) zur verstärkten Bindung an den Komplementfaktor C1q; ADCC↑: S239D I332G G236A (blau) zur verstärkten Bindung an den Fcγ-Rezeptor CD16; CDC↓: P329A (lila) zur

verminderten Bindung an C1q, CDC/ADCC↓: P329G (lila) zur verminderten Bindung an C1q und CD16. **B**: Modell der Knob-in-Hole Mutation zur verstärkten Bildung eines Heterodimers: Knob: T366W (gelb) und Hole: T366S L368A Y407V (lila).

4.2.4. Produktion der modifizierten Schwereketten-Antikörper.

Die Produktion der sequenzverifizierten Schwereketten-Antikörper erfolgte in transient transfizierten HEK 293-6E Zellen. Nach 2 und 4 Tagen wurden Aliquots der Zellkulturüberstände entnommen und nach 6 Tagen die Kulturüberstände geerntet und die Schwereketten-Antikörper aufgereinigt. Die Ergebnisse der anschließenden SDS-PAGE Analysen zeigen, dass die Mutanten E345R, P329A, P329G, S239D/I332E/G236A und S239D/I332EG/236AE/345R in hoher Ausbeute produziert wurden. (**Abbildung 19**). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich wie erwartet keine wesentliche Änderung in der scheinbaren Größe der Proteinbanden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten alle Schwerekettenantikörper eine homogene Bande bei ~80 kDa, unter reduzierenden Bedingungen eine homogene Bande bei ~40 kDa. Dies deutet an, dass die Dimerisierung der Schwereketten durch die eingefügten Mutationen nicht beeinträchtigt wurde (**Abbildung 19 A**).

Im Falle der Knob-in-Hole Mutanten wurden (Ko)-Transfektionen mit Expressionsvektoren für eine oder zwei verschiedene Schwereketten durchgeführt. Das Ausmaß der Heterodimerisierung wurde durch vergleichende SDS-PAGE Analysen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht (**Abbildung 19B**). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Homodimere Knob-Knob, Hole-Hole als auch Heterodimere Knob-Hole Schwereketten-Antikörper produziert wurden. Letztere enthalten unter nicht reduzierenden Bedingungen allerdings wesentlich weniger Monomere als Knob-Knob oder Hole-Hole Varianten (**Abbildung 19B**).

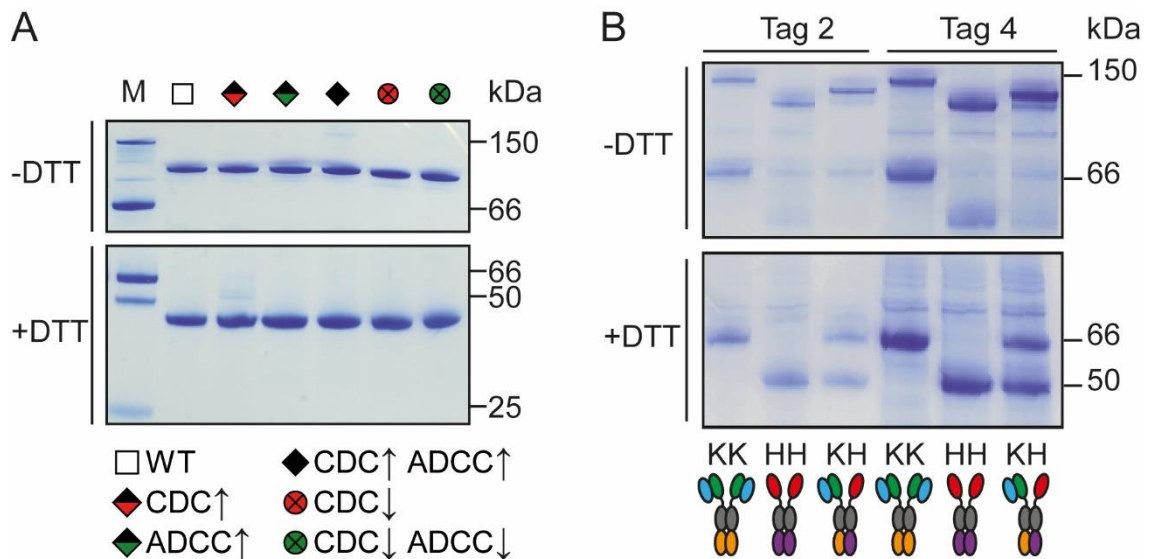


Abbildung 19: SDS-PAGE Analyse der Nb-Schwereketten-Antikörper nach Einführung der Mutationen. (A) Rekombinante Nb WF211-hIgG1 Schwereketten-Antikörper wurden in HEK-6E Zellen produziert, über Protein A-Sepharose Säulen gereinigt und mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung unter nichtreduzierenden (-DTT) oder reduzierenden (+DTT) Bedingungen analysiert. Marker (M) mit bekannter Molekularmasse (kDa) wurde zum Vergleich ebenfalls analysiert. IgG (150 kDa) zerfällt unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) in schwere und leichte Ketten (50 kDa, 25 kDa). Die Mutanten sind wie in Abb. 17 bezeichnet. **(B)** HEK 6E-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für ein oder zwei Nb-Schwereketten mit einer Knob (K, orange) oder Hole (H, lila) Mutation transfiziert. Die eingesetzten Nbs sind wie folgt farblich hervorgehoben: JK36 (Blau)-10GS-MU1067(Grün), WF211 (Rot). Am 2. bzw. 4. Tag nach Transfektion wurde jeweils ein Aliquot des Zellkulturüberstandes in Anwesenheit und Abwesenheit von DTT mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert.

4.3. Zytotoxische Effektorfunktionen von CD38-spezifischen Schwerekettenantikörpern

Die Bindung von Antikörpern an die Zelloberfläche kann über zwei verschiedene Effektormechanismen zur Lyse der Zelle führen: die Aktivierung von NK-Zellen zur ADCC und die Aktivierung der Komplementkaskade zur CDC. Im Folgenden werden die Ergebnisse von vergleichenden Zytotoxizitäts-Assays mit Daratumumab und dem WF211 Nb-Schwereketten-Antikörper vorgestellt.

4.3.1. Titrationsanalysen zeigen eine weiterhin hohe Bindung der mutierten Nb-Schwereketten-Antikörper an CD38 exprimierende Zellen

Um zu untersuchen, ob die in die Fc Domäne von WF211 eingefügten Mutationen die Bindung an CD38 beeinflussen, wurden Titrationsanalysen durchgeführt. Die Antikörper wurden dafür titriert, mit CD38-transfizierten YAC-1-Zellen inkubiert und gebundene Antikörper mit einem Fluorochrom-konjugierten IgG1-spezifischen Antikörper durchflusszytometrisch detektiert (**Abbildung 20**). Ein irrelevanter Nb-Schwereketten-Antikörper wurde als Negativkontrolle benutzt.

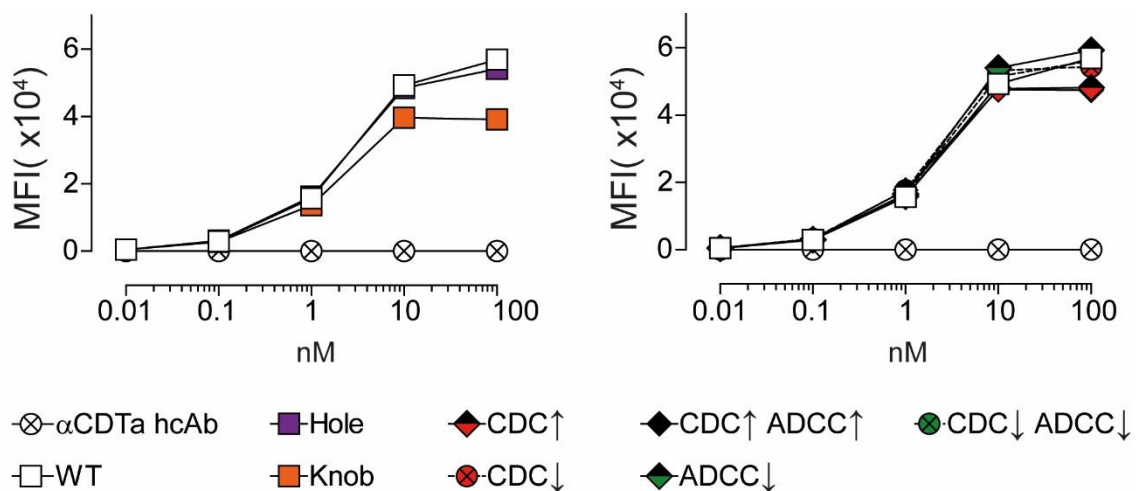


Abbildung 20: Alle klonierten Varianten des WF211-hcAb Schwereketten-Antikörpers binden mit hoher Affinität an CD38-transfizierte YAC-1-Zellen. Humanes CD38 exprimierende YAC-1-Zellen wurden für 20 min bei 4°C mit den angegebenen titrierten WF211-hcAb Schwereketten-Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und gebundene hcAb mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle mutierten WF211-hcAb Konstrukte weiterhin mit hoher Affinität an CD38 exprimierende Zielzellen binden. Lediglich die Knob-Mutationen führen zu einer leicht verminderten maximalen Bindung. Tabelle 11 zeigt die aus den Kurven errechneten Dissoziationskonstanten.

Konstrukte	Kd(nM)
WT	2,5
CDC↑	1,9
ADCC↑	2,3
CDC↑ ADCC↑	1,6
CDC↓	1,9
CDC↓ ADCC↓	2,2
Knob	1,7
Hole	2,2

Tabelle 11: Dissoziationskonstanten (Kd) der mutierten WF211-hcAb Konstrukte. Aus den in Abb. 20 gezeigten Nonlinearregressionskurven wurden Kd-Werte mithilfe der GraphPad Prism-Software ermittelt.

4.3.2. Die Einführung der E345R Mutation führt zu einer verbesserten Bindung von C1q an antikörperbeladene LP-1 Myelomzellen.

Um die Bindung des ersten Komplementfaktors C1q an membranständig gebundene Antikörper zu analysieren, wurden humane LP-1 Myelom-Zellen für 20 min mit zwei Varianten des WF100-Nb-Schwereketten-Antikörpers oder mit einem biparatopischen Nb-Schwereketten-Antikörper (Schütze, 2018) inkubiert. Dann wurde humanes Serum hinzugefügt und für weitere 20 min inkubiert. Nach Waschung der Zellen wurde gebundenes C1q mit einem Fluorochrom-konjugierten C1q-spezifischen Antikörper durchflusszytometrisch detektiert (**Abbildung 21**).

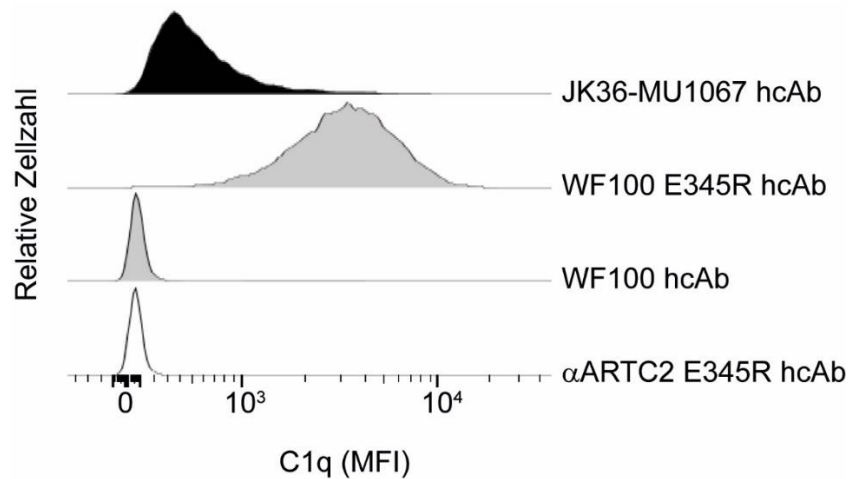


Abbildung 21: Die Opsonierung von CD38 exprimierenden Zellen mit E345R Schwereketten-Antikörpern führt zu einer verstärkten Bindung von C1q. CD38 exprimierende NK-92 Zellen wurden für 20 min bei 4°C mit Schwereketten-Antikörpern (Biparatopischer Heterodimer JK36-MU1067-hcAb, WF100 hcAb WT, WF100 hcAb E345R oder αARTC2 hcAb E345R als Negativkontrolle) inkubiert. Dann wurde 1/7 Volumen humanes Serum hinzugefügt und für weitere 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und gebundenes C1q mit einem Fluorochrom-konjugierten C1q-spezifischen Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Schwereketten-Antikörper (αARTC2) eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder der unmodifizierte WF100 Nb-Schwereketten-Antikörper noch der Kontroll-Antikörper eine detektierbare Bindung von C1q vermittelt. Hingegen lässt sich C1q auf Zellen, die mit dem biparatopischen Schwereketten-Antikörper JK36-MU1067-hcAb inkubiert wurden, detektieren. Die Inkubation der Zellen mit der E345R Variante des WF100-Schwerekettenantikörpers induziert eine deutliche höhere Bindung von C1q.

4.3.3. Die Einführung der E345R Mutation führt zu einem starken CDC

Membranständig gebundenes C1q kann die enzymatische Spaltung der Komplementfaktoren C3, C4 und C5 und schließlich die Lyse der Zelle durch die rettungsringförmige Einlagerung der Faktoren C5 bis C9 (MAC) in die Zellmembran bewirken. Humanes Serum kann als Quelle aktivierbarer Komplementfaktoren dienen. Eine halbstündige Vorinkubation des Serums bei 56°C inaktiviert die enzymatischen Komponenten des Komplementsystems und verhindert die Zellyse. Der membrane-attack-complex macht die Zellmembran permeabel für den fluoreszierenden DNA-Farbstoff Propidium Iodid (PI), die Bindung von PI an die zelluläre DNA kann durchflusszytometrisch als Indikator für die Zellyse dienen. Letztere bedingt ein Schrumpfen der Zellen, das im Durchflusszytometer an einer verminderten Vorwärtsstreuung (forward scatter FSC) sichtbar wird.

Um eine Antikörper-vermittelte Induktion des CDC zu untersuchen, wurden CD38 exprimierende LP-1-Zellen mit Daratumumab oder dem WF211-Schwereketten-Antikörper und mit nativem oder Hitze-inaktiviertem humanem Serum bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Nb-Schwereketten-Antikörper eingesetzt (**Abbildung 22**). Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von Zellen mit Daratumumab und nativem Serum bei ca. einem Drittel der Zellen eine Anfärbung mit PI sowie eine Verminderung der Zellgröße bedingt. Die Inkubation mit WF211-Schwereketten-Antikörpern hingegen führte nur zu einer minimal höheren Zellyse als die Inkubation mit dem Kontroll-Antikörper. Bei der Inkubation von Zellen mit Hitze-inaktiviertem Serum zeigte sich nur ein niedriger Anteil toter Zellen von ~5%, der dem natürlichen Hintergrund an toten Zellen in der Zellkultur entspricht.

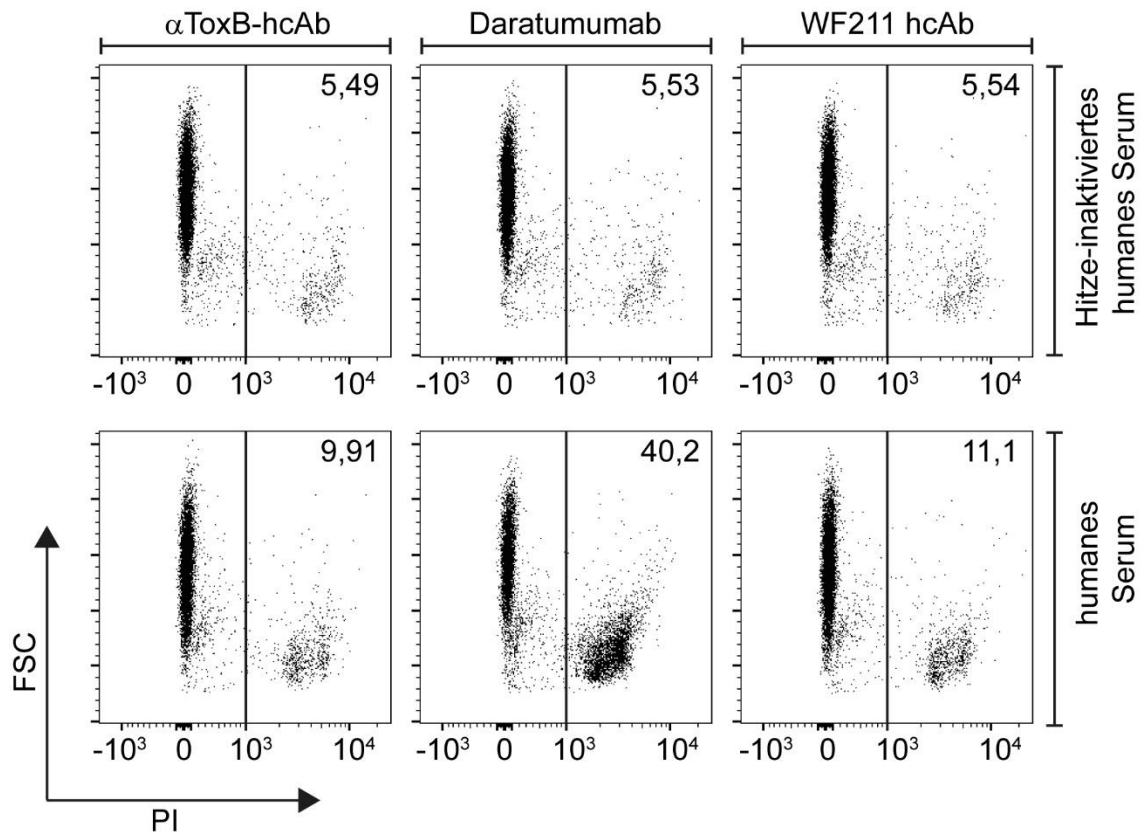


Abbildung 22: Daratumumab zeigt eine stärkere CDC-induzierende Aktivität als der WF211-Schwereketten-Antikörper. LP-1 Zellen wurden bei 4°C für 30 Minuten mit Daratumumab oder Schwereketten-Antikörpern inkubiert. Dann wurde 1/7 Volumen humanes Serum hinzugefügt und die Zellen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe des DNA Farbstoffes Propidium Iodid (PI) wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Schwereketten-Antikörper (α ToxB) eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurde humanes Serum verwendet, bei dem die enzymatischen Komplementfaktoren durch Inkubation für 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert worden waren. Tote Zellen sind durch einen verminderten forward scatter (FCS) und durch Aufnahme von PI gekennzeichnet. Zahlen in den Plots zeigen den prozentualen Anteil PI-positiver Zellen.

Titrationen zeigten eine halbmaximale Induktion des CDC durch Daratumumab bei ~ 3 nM des Antikörpers und eine maximale Tötung von ~33% der LP-1-Zellen bei 100 nM. Der WF211 Schwereketten-Antikörper hingegen erreichte selbst bei einer Konzentration von 100nM nur eine minimale Zellyse.

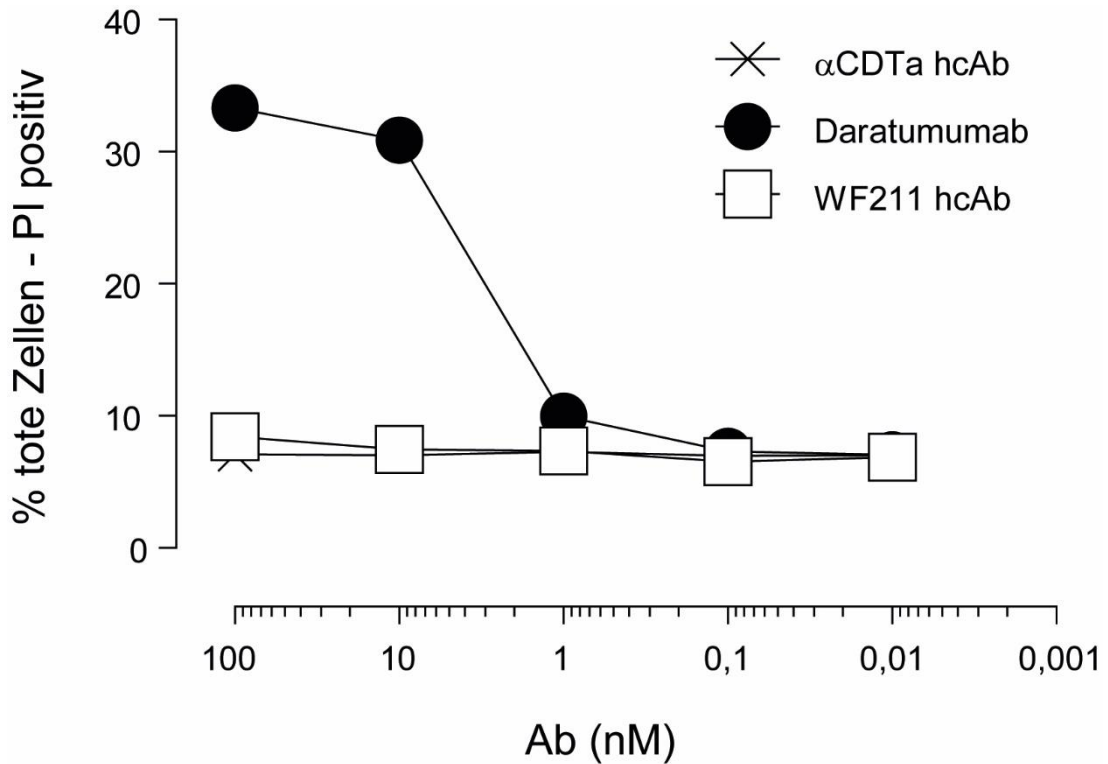


Abbildung 23: Daratumumab zeigt eine stärkere CDC-induzierende Aktivität als der WF211-Schwereketten-Antikörper. LP-1 Zellen wurden wie in Abb. 22 mit Antikörpern, humanem Serum, und Propidium Iodid inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Schwereketten-Antikörper (α CDTa) eingesetzt.

In einem weiteren Experiment wurde die Fähigkeit der durch Fc-Engineering hergestellten Varianten des WF211-Schwereketten-Antikörpers untersucht den CDC von LP-1 Myelomzellen zu induzieren (**Abbildung 24**). Die Ergebnisse zeigen, dass die E345R Mutante des WF211-Schwerekettenantikörpers (CDC↑) eine deutlich stärkere Zellyse vermittelt als Daratumumab.

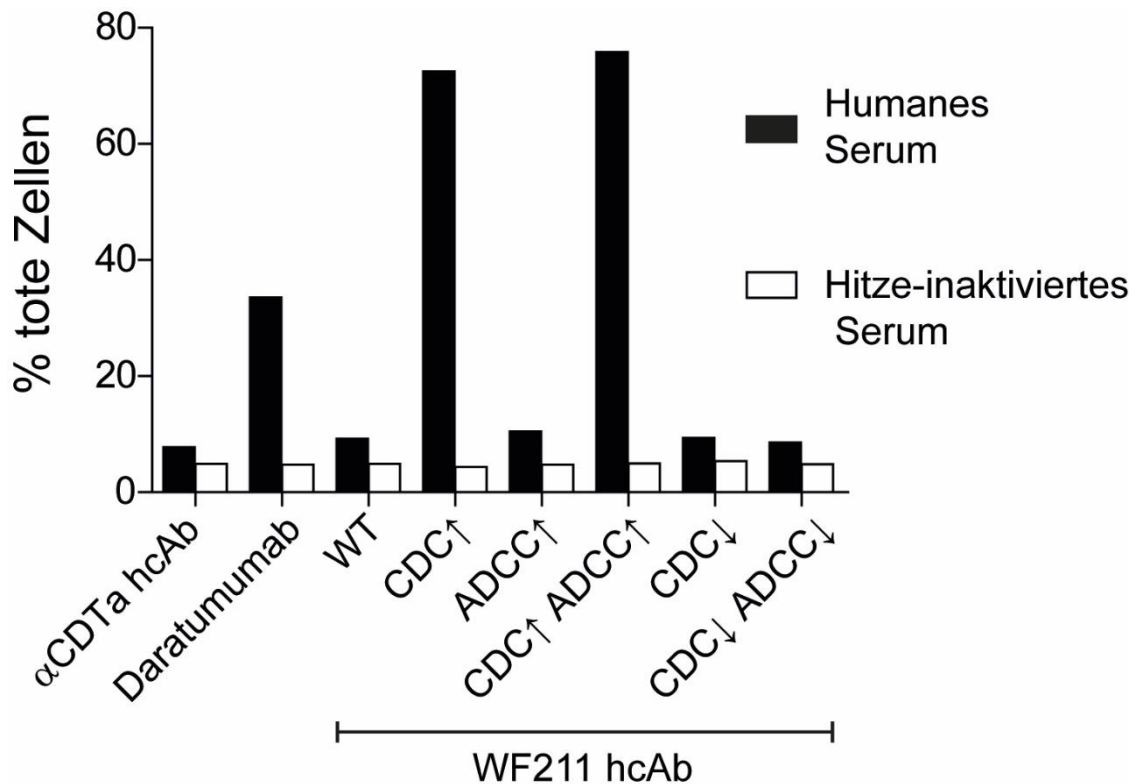


Abbildung 24: Die E345R Variante des WF211 Schwereketten-Antikörpers zeigt eine stärkere CDC-induzierende Aktivität auf LP-1 Zellen als Daratumumab. LP-1 Zellen wurden wie in Abb. 22 mit Antikörpern, humanem Serum, und Propidium Iodid inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Schwereketten-Antikörper (αCDTa) eingesetzt.

Um den zytotoxischen Effekt der E345R Variante näher zu analysieren, wurden CDC-Assays mit titrierten Antikörpern durchgeführt. Hierfür wurden neben der LP-1 Zelllinie auch die Burkitt-Lymphom Zelllinien CA46 und DAUDI untersucht (Abbildung 25).

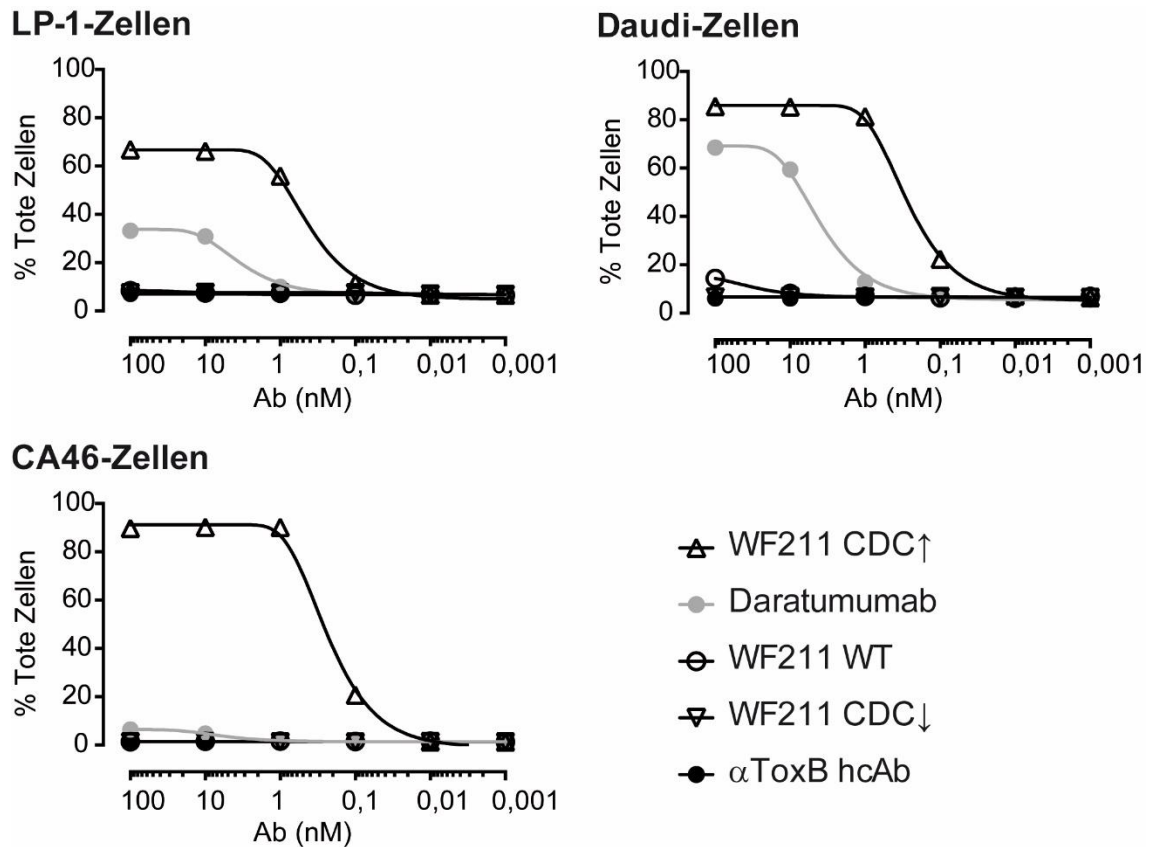


Abbildung 25: Die E345R Variante des WF211 Schwereketten-Antikörpers zeigt eine stärkere CDC-induzierende Aktivität auf LP-1, Daudi und CA46 Zellen als Daratumumab. LP-1, Daudi und CA46 Zellen wurden wie in Abb. 22 mit Antikörpern, humanem Serum, und Propidium Iodid inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde ein irrelevanter Schwereketten-Antikörper (α ToxB) eingesetzt.

Die Ergebnisse bestätigen die deutlich stärkere CDC Induktion durch die E345R Variante des WF211-Schwereketten-Antikörpers als Daratumumab. Während Daratumumab bei einer Konzentration von 100 nM bei LP-1 Zellen ca. 35% Zelltod induziert, erreicht die Variante E345R des WF211-hcAb eine Lyse von ca. 65% der Zellen. Bei CA46 Zellen erreicht Daratumumab bei 100 nM maximal eine Lyse von 8% der Zellen im Vergleich zu 89% Zelltod durch die E345R Mutante schon bei 100-

fach niedrigerer Konzentration. Bei Daudi Zellen erzielt Daratumumab eine Zelllyse von 38 % bzw. 68% bei 1 nM und 100 nM, die E345R Variante hingegen 78% bzw. 82% bei 1 nM und 100 nM. Der unmodifizierte WF211-Schwereketten-Antikörper hingegen zeigt keine oder nur eine minimale CDC-Induktion. Auch die CDC \downarrow Variante (P329A) sowie der irrelevante Nb-Schwereketten-Antikörper (α ToxB) zeigen keine CDC Induktion.

4.3.4. Heterodimere Nb-Schwereketten-Antikörper zeigen eine effektive Induktion der komplementabhängigen Zelllyse.

Im **Abschnitt 4.2** wurde gezeigt, dass eine Heterodimerisierung der Nb-Schwereketten-Antikörper durch die Knob-in-Hole Technik möglich ist. Um zu untersuchen, ob Heterodimere den CDC von LP-1 Zellen induzieren könnten, wurden drei biparatopische heterodimere Schwereketten-Antikörper produziert und aufgereinigt: MU1067 - WF211 an Epitop 1 und 2 bindend, MU1067 - JK36 Hole an Epitop 2 und 3 bindend und JK36 - WF211 an Epitop 1 und 3 bindend. Für den Vergleich wurden äquimolare Kombinationen dieser Schwereketten-Antikörper eingesetzt (**Abbildung 26**).

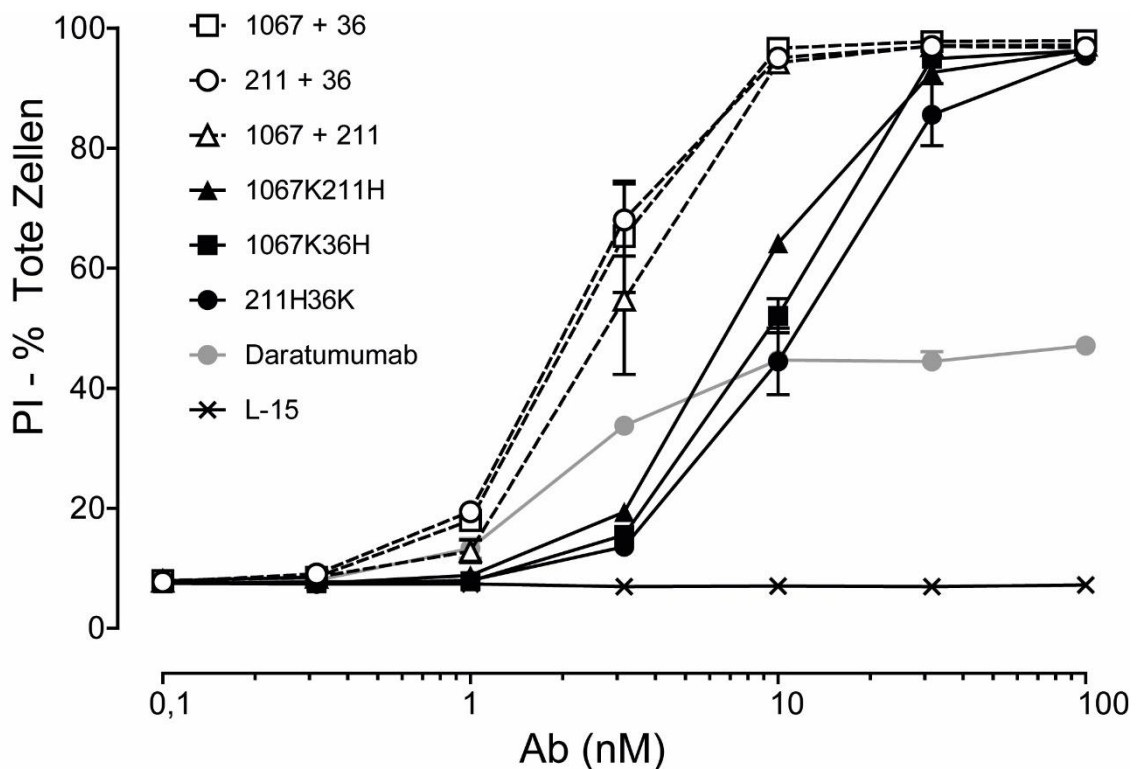


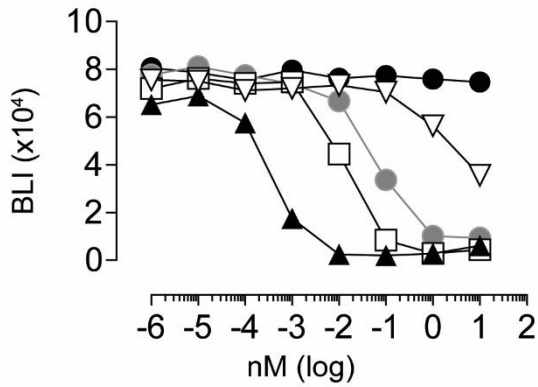
Abbildung 26: Heterodimere Schwereketten-Antikörper induzieren eine CDC von LP-1 Myelomzellen. LP-1 Zellen wurden für 30 min bei 4°C titrierten Antikörpern inkubiert und nach Zugabe von humanem Serum bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Der prozentuale Anteil lysierter Zellen wurde wie in Abb. 22 über die Färbung mit PI ermittelt. Offene Symbole = äquimolare Mischung der angegebenen Schwereketten-Antikörper, geschlossene Symbole = mittels Knob (K) und Hole (H)-Technologie hergestellte heterodimere Schwereketten-Antikörper (s. Abb. 19).

Die Ergebnisse zeigen, dass mittels Knob(K)-in-Hole(H)-Technologie hergestellte heterodimere Schwerekettenantikörper den CDC auslösen. Dabei zeigt sich eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wie bei Daratumumab (halbmaximale Lyse bei ~10 nM). Die Heterodimere erreichen jedoch eine deutlich höhere maximale Lyse als Daratumumab. Die Kombination zweier unterschiedlicher an verschiedene Epitope bindender Schwereketten-Antikörper erreicht eine vergleichbare Lyse bei deutlich niedrigeren Konzentrationen.

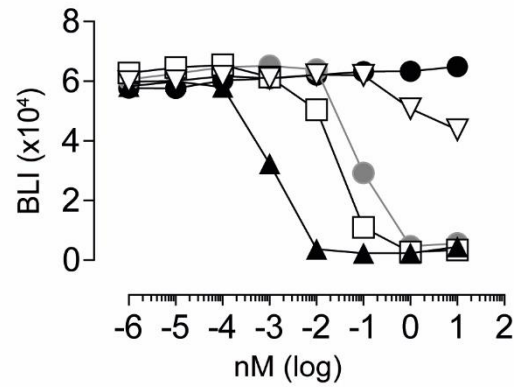
4.3.5. CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper induzieren ADCC

Um zu untersuchen, ob die Schwereketten-Antikörper eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität induzieren können, wurde ein in der Arbeitsgruppe etablierter Biolumineszenz-Assay mit Luciferase-transfizierten Zielzellen und CD16-transfizierten NK-92 Effektorzellen durchgeführt. Nach Zugabe von Luciferin geben vitale Zellen durch die ATP-abhängige Aktivität der Luciferase Lichtsignale ab. Die NK-Zell-vermittelte Perforation der Zellmembran führt zu einem Verlust des zytosolischen ATPs und somit zu einer verminderten Biolumineszenz. Das Biolumineszenzsignal ist also proportional zu der Anzahl vitaler Zellen. Für den ADCC-Assay wurden die Zielzellen mit den titrierten Antikörpern für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von NK92-Zellen in einem Verhältnis von 3:1 (Effektorzelle : Zielzelle). Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde eine Luciferin-Arbeitslösung hinzugegeben und die Biolumineszenz mit einem Platten-Reader gemessen (**Abbildung 27**).

LP-1-Zellen



Daudi-Zellen



CA46-Zellen

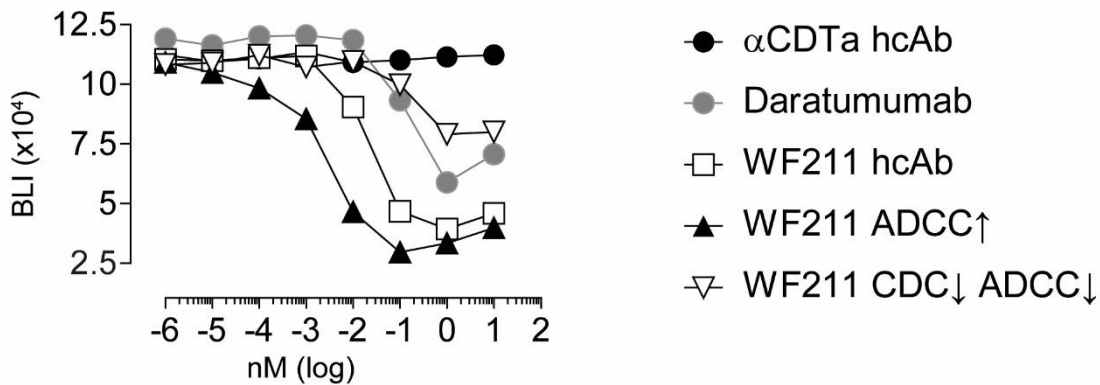


Abbildung 27: Die Einführung der ADCC \uparrow Tripple Mutante in den WF211 Schwereketten-Antikörper verstärkt die Induktion der NK-Zell-vermittelten Lyse von LP-1-, Daudi- und CA46-Zellen. Mit Luciferase transfizierte Targetzellen wurden für 10 Minuten bei 4°C mit titrierten Antikörpern inkubiert. Nach Zugabe von CD16 transfizierten NK-92 Zellen in einem Effektor : Target Verhältnis von 3:1 erfolgte eine weitere Inkubation für 4 Stunden bei 37°C. Nach Zugabe von Luciferin wurde die Biolumineszenz mit einem Victor Platten-Reader ermittelt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Toxin-spezifischer Schwereketten-Antikörper (α CDTa) verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass der WF211 Schwereketten-Antikörper bei allen drei Zelllinien zu einem Verlust des Lumineszenz-Signals führt. Der Schwerekettenantikörper zeigt dabei eine etwas stärkere Effektivität als Daratumumab (halb-maximaler Effekt bei ca. 0.1 nM vs. 1 nM). Eine vollständige Extinktion des BLI-Signals wurde bei LP1- und Daudi-Zellen erreicht, aber nicht bei CA46-Zellen. Die mittels Fc-Engineering hergestellte ADCC \uparrow Variante des WF211 Schwereketten-Antikörpers (Triple Mutation G236A S239D I332E) zeigt bei allen Zelllinien eine effektive

Induktion der NK-Zell-vermittelten Lyse bereits bei 10-100x niedrigeren Konzentrationen (im picomolaren Bereich). Im Gegensatz dazu führte die Mutation von P329G zu einer fast vollständigen Aufhebung der ADCC Induktion.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, CD38-spezifische Nbs und aus diesen konstruierte Schwerekettenantikörper als neue diagnostische und therapeutische Werkzeuge für hämatologische Malignome zu evaluieren. In vorherigen Arbeiten waren schon verschiedene CD38-spezifische Nbs aus Phagenbibliotheken immunisierter Lamas identifiziert worden (Unger, 2012) (Koenigsdorf, 2016). In dieser Arbeit wurden weitere Nbs aus diesen Bibliotheken selektioniert. Insgesamt konnten 22 unterschiedliche Familien CD38-spezifischer Nbs definiert werden (Fumey, et al., 2017). Zuvor waren bereits die Epitope von drei CD38-Nbs durch Co-Kristallisation mit der CD38-Ektodomäne bestimmt worden (PDB-ID: 5F1K, 5F21, 5F1O) (Li, Qi, Unger, & Nan Hou, 2016). Durch Kreuzblockade-Analysen konnte ermittelt werden, dass die 22 Nb-Familien an drei unabhängige, nicht überlappende Epitope binden. Alle Nbs, die an Epitop 1 binden, blockieren die Bindung von Daratumumab, ebenso wie einige Nbs, die an Epitope 2 und 3 binden. Andere Nbs aus diesen Epitopgruppen - Jk2 (Familie 4, Epitop 2), WF9 (Familie 1, Epitop 3), Jk36 (Familie 2, Epitop3) und MU1105 (Familie 22, Epitop 3) - binden unabhängig von Daratumumab. Es wurde berichtet, dass unter der Behandlung mit Daratumumab die Expression von CD38 durch Myelomzellen auf ein niedriges Niveau abfällt. (Nijhof, et al., 2016). Allerdings war nicht auszuschließen, dass an CD38 gebundener Daratumumab die Detektion von CD38 mit anderen verfügbaren Antikörpern blockiert oder behindert. In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass Fluorochrom-konjugierte Nbs, die unabhängig von Daratumumab binden, ideale Werkzeuge sind, die Expression von CD38 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten und Tumorzellen nach Daratumumab Behandlung zu überwachen (Oberle, et al., 2017). Mit dem fluoreszenzmarkierten Rb-JK36-Konstrukt bietet Beckman Coulter einen Vorteil für die zelluläre Analyse an, um die Grenzen der Epitop-Maskierung bei zielgerichteten Biologika wie Daratumumab zu überwinden. Dieser Nanokörper bietet Laboren die Möglichkeit, das Ansprechen auf Anti-CD38-Therapien genauer zu überwachen und damit die Patientenversorgung zu verbessern (Ezzouaouy, Monsonis, & Kapinsky, 2020).

Mit der hohen Spezifität und Affinität zu CD38 könnte die geringe Größe des Nanokörpers eine bessere Gewebe- und Tumorpenetration ermöglichen und somit

für eine effizientere Bildgebung von CD38-positiven Tumoren eingesetzt werden (Bannas P, 2015). Zudem würde eine schnelle Beseitigung überschüssiger ungebundener Nbs aus dem Kreislauf durch renale Ausscheidung unerwünschte Hintergrundsignale durch zirkulierende nichtgebundenen Antikörper minimieren (Menzel, Rissiek, Haag, Goldbaum, & Koch-Nolte, 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Herrn Levin Schriewer in einem subkutanen Xenotransplantat-Tumormodell in Nacktmäusen untersucht, ob mit einem nah-infra-rot-fluorophor (NIRF)-konjugierten CD38-spezifischen Nb CD38 exprimierende Tumorzellen spezifisch detektiert werden können. Die Ergebnisse bestätigen dies klar. Allerdings ist der Einsatz NIRF-konjugierter Proteine aufgrund der geringen Lichtpenetranz des Gewebes nur begrenzt im lebenden Organismus einsetzbar, z.B. wie in dieser Arbeit für subkutane Tumoren in Nacktmäusen, oder möglicherweise auch intraoperativ, mithilfe einer entsprechenden Kamera oder Brille (Bannas P., 2015). Für den Nachweis kleiner Lymphome sind ggf. Radionuklid-markierte Nbs und röntgenologische Untersuchungen besser geeignet (Caserta, et al., 2018). Eine weitere Einschränkung liegt in der Spezifität der Nbs für humanes CD38, und nicht für Maus-CD38, sodass mögliche störende Signale durch Bindung an CD38 auf gesundem Gewebe nicht evaluiert werden können.

Um Fc-vermittelte Immun-Effektorfunktionen zu ermöglichen, wurden Nbs genetisch an die hinge-, CH2-, und CH3-Domänen von humanem IgG1 fusioniert und chimäre Nb-basierte IgG1 Schwerekettenantikörper hergestellt. Die Fähigkeit dieser Schwerekettenantikörper CDC und ADCC zu induzieren wurde analysiert und mit Daratumumab verglichen. Dabei zeigten die Nb-Schwereketten-Antikörper kein oder nur ein sehr schwaches Potenzial eine komplementabhängige Lyse zu induzieren. Tumorzellen exprimieren in unterschiedlichem Maße membranständige Komplementregulatoren, wie CD55 und CD59, die die Komplementkaskade und MAC-Bildung behindern (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambiri, 2010). Die Beobachtung, dass die Kombination zweier Nb-Schwereketten-Antikörper, die an verschiedene Epitope des CD38 binden, in der Regel effektiv komplementabhängige Zellyse aktivieren, lässt vermuten, dass eine solche Kombination aus Antikörpern CD38 an der Zelloberfläche oligomerisiert und damit die Bindung an das Hexamer C1q begünstigt (Schütze, 2018). Die Hypothese, dass eine Oligomerisierung von Antikörpern zu Hexameren an der Zelloberfläche die

Bindung und Aktivierung von C1q begünstigt, wird durch publizierte Fc-Engineering Strategien unterstützt (Diebolder C. , et al., 2014) (de Jong , et al., 2016). Der Austausch einer einzigen Aminosäure in der CH2 Domäne kann die Komplexbildung von IgG Monomeren zu IgM-artigen Hexameren begünstigen. Antikörper mit einer solchen sogenannten Hexabody Mutation können i.d.R auch deutlich effektiver als parentale IgGs einen CDC auslösen (Natsume, et al., 2008) (Idusogie, et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese E345R Mutation auch bei Schwerekettenantikörpern zu einer deutlichen Steigerung der CDC-Induktion führen. Eine CDC-steigernde Wirkung konnte zudem auch erreicht werden durch die genetische Verknüpfung von zwei Nbs, die verschiedene Epitope in CD38 erkennen, mit den hinge und Fc-Domänen von IgG1 zu tetravalenten biparatopischen Schwereketten-Antikörpern. Anders als monospezifische Antikörper, die jeweils nur zwei CD38 Moleküle miteinander verbinden können, könnten auch biparatopische Antikörper eine Oligomerisierung von CD38 auf der Zelloberfläche begünstigen (Schütze, 2018).

Anders als beim CDC, waren alle untersuchten Schwerekettenantikörper in der Lage, NK-Zellen zur ADCC zu aktivieren. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Mutationen untersucht, welche die Bindung der Fc-Domänen an Fc γ Rezeptoren von NK-Zellen, die die ADCC auslöst, verstärken (G236A / S239D / I332E) (Ahmed, Keremane, Vielmetter, & Bjorkman, 2016) bzw. abschwächen (P329G) (Schlothauer, et al., 2016). Die Ergebnisse mit drei verschiedenen CD38 exprimierenden Tumorzelllinien bestätigten die vorhergesagte Steigerung bzw. Schwächung des ADCC. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die mutierten Nb-Schwereketten-Antikörper einen stärkeren Effekt auf die untersuchten Zelllinien als Daratumumab aufweisen.

Eine mögliche Einschränkung für die therapeutische Anwendung von Lyse verstärkenden Antikörper-Varianten ist das erhöhte Risiko, eine Zytotoxizität auch gegenüber CD38 exprimierenden normalen Zellen zu erzeugen. Eine weitere mögliche Einschränkung besteht in dem Risiko, eine Antikörperantwort gegen das mutierte Fc-Fragment zu induzieren. Zudem wurde für die E345R Mutation eine Neigung zur spontanen Hexamerformation beschrieben. Eine solche spontane

Aggregation könnte einerseits zu einer Aktivierung des Komplementsystems, andererseits zu einer verstärkten Aufnahme dieser Komplexe durch das retikuloendotheliale System führen, wodurch ihre in vivo-Halbwertszeit verringert wird. Die Mutationen E345K oder E430G im IgG1 bieten im Vergleich zur E345R Mutation eine ähnlich verbesserte Effektorfunktion, die jedoch erst bei Bindung an das von der Zielzelle exprimierte Antigen aktiviert wird. (de Jong , et al., 2016).

Bei den Experimenten zur Herstellung biparatopischer Antikörper durch Dimerisierung zweier unterschiedlicher Schwereketten nach Einfügen von Knob-in-Hole Mutationen wurden zwar überwiegend heterodimere Antikörper, aber auch monomere Antikörper beobachtet. Dies ist zwar im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen zu konventionellen bispezifischen Antikörpern (Gliese, Williams, Rodriguez, & Persson, 2018). Das Vorhandensein einer Mischpopulation an Antikörpern erschwert aber die Interpretation der Ergebnisse. Hier wäre für künftige Untersuchungen eine bessere Trennung der Heterodimere nötig.

Nach Behandlung mit Daratumumab wurde eine geringere Dichte von CD38 auf der Tumorzelloberfläche beobachtet (Morandi, et al., 2018) (Krejčík, et al., 2017) Allerdings ist dies zumindest teilweise auf eine behinderte Bindung der diagnostischen Antikörper durch an CD38 gebundenes Daratumumab zurückzuführen (Oberle, et al., 2017) . Wenn die Behandlung mit Daratumumab abgebrochen wird, beginnen die Myelomzellen allmählich wieder höhere CD38-Spiegel zu exprimieren. Basierend auf dieser Beobachtung wird in aktuellen Studien getestet, ob eine erneute Behandlung mit Daratumumab nach einer definierten Pause eine vernünftige Strategie wäre (Plesner, van de Donk, & Richardson, 2020).

CD38 ist ein Ektoenzym, das zur Bildung von immunsuppressivem Adenosin beiträgt. Eine geringere Expression von CD38 während der Behandlung mit Daratumumab könnte zu einer verringerten Adenosinproduktion in der Knochenmarkumgebung der Myelomzellen und zu einer besseren T-Zell-vermittelten Immunkontrolle der Krankheit führen (Horenstein, Bracci, Morandi, & Malavasi, 2019), (Morandi, et al., 2018). Präklinische Studien haben gezeigt, dass eine genetische Ablation oder eine durch Antikörper vermittelte Blockade von CD38 die Antitumoraktivität von zytotoxischen T-Zellen direkt steigern kann (Chatterjee, et al., 2018). Einige der von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Nanobodies haben

einen hemmenden oder potenzierenden Effekt auf die enzymatische Aktivität von CD38 (Fumey, et al., 2017). Die Inhibition der Enzymaktivität durch einen Nb wurde bereits in anderen Arbeiten erreicht (Alzogaray, et al., 2011). Der Einsatz eines unabhängig von Daratumumab bindenden CD38 blockierenden Nanobodies (wie z.B. Nb JK2) wäre auch bei Patienten möglich, die sich bereits in einer Daratumumab-Therapie befinden. Künftige Analysen zur *in vivo* Modulation der CD38-Enzymaktivität durch CD38 spezifische Nanobodies sollten klären, ob damit eine tumorhemmende oder -fördernde Wirkung einhergeht.

In den GEN501- und Sirius- Studien wurde beobachtet, dass Patienten weiterhin auf die Behandlung mit Daratumumab ansprechen, auch wenn Myelomzellen unter der Behandlung eine (scheinbar) geringere CD38 Expression aufweisen. Als Erklärung für die anhaltende Wirkung wurden eine immunmodulatorische Wirkung von Daratumumab postuliert (Krejci, et al., 2016). Immunsuppressive regulatorische Zellen der T-, B- und myeloischen Linien könnten durch Daratumumab eliminiert werden, wodurch Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen besser klonal expandieren und aktiviert werden könnten. Auch für unsere Nb-Schwereketten-Antikörper wären ähnliche Effekte denkbar. Eine mögliche vorteilhafte zytotoxische Wirkung von Nb-Schwereketten-Antikörpern auf immunsuppressive Immunzellen sollte in künftigen Studien untersucht werden.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit untersuchten CD38-spezifischen Nanobodies und Schwereketten-Antikörper haben das Potenzial als diagnostische oder therapeutische Werkzeuge für mögliche Therapiekonzepte der CD38-tragenden malignen Lymphomzellen zu fungieren (**Abbildung 28**). Einige dieser Nanobodies binden unabhängig von Daratumumab und könnten somit gleichzeitig als Therapeutikum und/oder als diagnostisches Instrument eingesetzt werden. Auch im Falle einer Resistenz gegenüber Daratumumab, etwa durch Mutation der Bindungsstelle in CD38 oder durch anti-idiotypische Antikörper, könnten CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper als Back-up nützlich sein. Schließlich könnten immunmodulatorisch oder enzymmodulatorisch wirkende CD38-spezifische Nanobodies therapeutisch nutzbar sein.

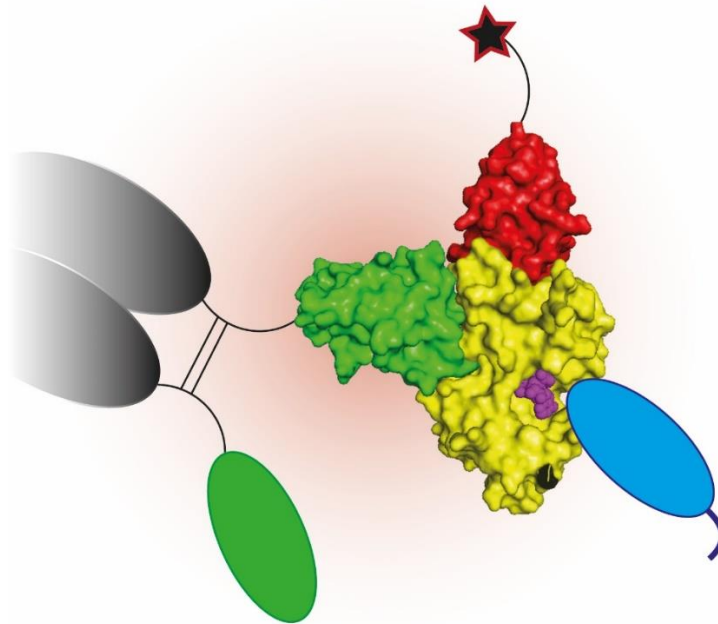


Abbildung 28: Modell von CD38 als Zielantigen für potenzielle therapeutische Nanobodies. Das Strukturmodell wurde mit dem Pymol Programm und den Koordinaten der Ko-Kristallstrukturen von CD38 (gelb) mit NAD⁺ (Magenta) (pdb 2i65) und den Nanobodies MU375 (rot, an Epitop 1 bindend, pdb 5f21) und MU551 (grün, an Epitop 2 bindend, pdb 5f10) erstellt. An ein Fluorochrom konjugiert (Stern) kann ein Nanobody für die *in vivo* Bildgebung benutzt werden. Fusioniert an die hinge und Fc-Domänen (CH2 in grau partiell dargestellt) können Schwereketten Antikörper Effektorfunktionen gegenüber CD38 tragenden Tumorzellen induzieren. Ein Nanobody (blau), der die Enzymaktivität von CD38 moduliert, könnte *in vivo* immunmodulierend wirken.

7. Zusammenfassung

Hintergrund: Obwohl sich die Therapie des multiplen Myeloms (MM) verbessert hat, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Erkrankung noch bei unter 50%. Zusätzlich zu der Chemotherapie und der Radiotherapie hat sich die Antikörper -basierte Therapie, die auf Zelloberflächenproteine zielt, etabliert. Für die Therapie des MM ist der konventionelle Antikörper (Ak) Daratumumab, der das auf der Zellmembran hoch exprimierte Ekto-enzym CD38 erkennt, zugelassen. Neben konventionellen Ak gewinnen Einzeldomänen-Antikörper, sog. Nanobodies (Nb), und Nb-basierte Schwereketten-Antikörper an Bedeutung. Ihre strukturellen Eigenschaften (Größe und Stabilität) bieten einige Vorteile gegenüber konventionellen Ak. Aus vorherigen Arbeiten stehen in der AG-Nolte bereits CD38-spezifische Nbs zur Verfügung.

Fragestellung: Ziele dieser Arbeit waren die Selektionierung weiterer CD38-spezifischer Nbs, die Herstellung CD38 spezifischer Schwereketten-Antikörper durch Fusion der Nbs an die Hinge- und Fc-Domänen des humanen IgG1 (hcAb), und die Analyse ihrer Fähigkeit, zytotoxische Effektorfunktionen gegenüber CD38-exprimierenden Tumorzellen zu induzieren. Zudem sollten mittels Mutagenese in der Literatur beschriebene Mutationen zur Modulation der Effektorfunktionen in die Fc-Domänen eingeführt und vergleichend untersucht werden.

Ergebnisse: Es wurden 22 Nb-Familien charakterisiert, die an drei verschiedene Epitope des CD38 binden. Einige blockieren die Bindung von Daratumumab an CD38 exprimierende Zellen, einige binden unabhängig von Daratumumab. Die meisten Nb-hcAb Schwereketten-Antikörper konnten eine NK-Zell-vermittelte Zellyse (ADCC) induzieren, aber nicht eine komplementvermittelte Zellyse (CDC). Über eingeführte Fc-Mutationen konnten CDC und ADCC verstärkt werden.

Ausblick: Die in dieser Arbeit klonierten Nbs und Schwereketten Antikörper könnten die Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms ergänzen.

8. Summary

Background: Although the therapy of multiple myeloma (MM) has improved, the 5-year survival rate of this disease remains below 50%. In addition to chemotherapy and radiotherapy, antibody-based therapy, which specifically targets surface proteins of the cancer cells has been established. The ecto-enzyme CD38 is often highly expressed on the surface of MM cells and the conventional CD38-specific antibody (Ab) Daratumumab has been licensed for use in the clinic. Next to conventional Ab, single domain antibodies, nanobodies (Nb) and nanobody-based heavy chain antibodies are gaining interest. The structural properties of Nb (size, stability) offer some advantages over conventional Ab. CD38-specific Nbs are available from previous work in the Nolte lab.

Objectives: The objectives of this work were the selection of further CD38-specific Nbs, the generation of Nb-based heavy chain antibodies by fusion to the hinge and Fc-domains of human IgG1 (hcAb), and the analysis of their capacity to induce cytotoxicity to CD38-expressing tumor cells. In addition, Fc-engineering was used to introduce mutations described in the literature to modulate effector functions.

Results: 22 Nb families were characterized that bind to three different epitopes of CD38. Some Nbs block binding of Daratumumab to CD38 expressing cells and others bind independently of Daratumumab. The Nb-hcAb constructs were able to induce NK-cell mediated cell lysis (ADCC) but did not induce complement-dependent cytotoxicity (CDC). Fc-engineering potentiated both, ADCC and CDC.

Outlook: The CD38 specific Nbs and heavy chain antibodies characterized in this study could complement the diagnosis and therapy of MM.

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody , Antikörper
AEBSF	Aminoethylbenzensulfonylfluorid / Pefabloc SC® = wasserlöslicher Serinproteinase-Inhibitor
AF	AlexaFluor
ATP	Adenosintriphosphat
BLI	Bioluminescence
BSA	Bovine Serum Albumin
CDC	Komplement vermittelte Zelltötung
CDR	contemplementeraty-determing regions
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Z:E Verhältnis	Ziel zu Effektor Verhältnis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
H₂O	Wasser
hcAb	heavy chain Antibody
HEK	Human Embryonal Kidney
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
luc	Luciferase
MM	Multiple Myelom
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nb	Nanobody
Nb-hcAb	Nanobody human Fc fusionierter Antikörper
NK	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PPL	Periplasmalysat
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	single chain variable fragment
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette

10. Literaturverzeichnis

- Ahmed, A., Keremane, S., Vielmetter, J., & Bjorkman, P. (April 2016). Structural Characterization of GASDALIE Fc Bound to the Activating Fc Receptor FcγRIIIa. *S. 194 (1)*, 78-89.
- Alzogaray, V., Danquah, W., Aguirre, A., Urrutia, M., Berguer, P., Vécovi, G. E., . . . Goldbaum, F. (2011). Single-domain llama antibodies as specific intracellular inhibitors of SpvB, the actin ADP-ribosylating toxin of *Salmonella typhimurium*. *The FASEB Journal*, vol. 25 no.2 256 - 534.
- Atwell, S., Ridgway, J., Welss, J., & Carter, P. (4. July 1997). Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *Journal of Molecular Biology*, S. 270, 26-35.
- Bach, M., Witzel, S., Arnold, U., Mailahn, M., Vettin, J., Wilck, A., & Paul, T. (2010). *Pschyrembel*, 262. Auflage. Berlin: De Gruyter.
- Bannas P, L. A.-N. (September 2015). Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. *Contrast media and molecular imaging*, S. 10(5):367-78.
- Bannas P., A. L.-N. (16. April 2015). Validation of Nanobody and Antibody Based In Vivo Tumor Xenograft NIRF-imaging Experiments in Mice Using Ex Vivo Flow Cytometry and Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, S. 98.
- Bannas, P., Lenz, A., Haag, F., Schmid, J., Koch-Nolte, F., Adam, G., & Riessik, B. (2014). In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 9(2):135-42.
- Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., . . . Zocchi, E. (2008). Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *The Journal of Biological Chemistry*, 32188-32197.
- Caserta, E., Chea, J., Minnix, M., Poku, E., Viola, D., Vonderfecht, S., . . . Pichiorri, F. (2018). Copper 64-labeled daratumumab as a PET/CT imaging tracer for multiple myeloma. *Blood*, S. 131(7), 741–745.
- Chakravarty, R., Goel, S., & Cai, W. (2014). Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging? *Theranostics*, 4(4):386-398.
- Chanier, T., & Chames, P. (21. Januar 2019). Nanobody Engineering: Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cance. *Antibodies*, S. 8(1):13. doi:10.3390/antib8010013
- Chatterjee, S., Daenthanasanmak, A., Chakraborty, P., Wyatt, M., Dhar, P., Selvam, S., . . . Mehrotra, S. (9. Januar 2018). CD38-NAD+Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell metabolism*, S. 27(1), 85–100.

- Chim, C., Kumar, S., Orlowski, R., Cook, G., Richardson, P., Gertz, M., . . . Anderson, K. (April 2019). Correction: Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*, S. 33(4):1058-1059. doi:10.1038/s41375-019-0410-3
- Chini, E., Chini, C., Espindola Netto, J., de Oliveira, G., & van Schooten, W. (April 2018). The Pharmacology of CD38/NADase: An Emerging Target in Cancer and Diseases of Aging. *Trends in pharmaceutical sciences*, S. 39(4):424-436. doi:10.1016/j.tips.2018.02.001
- Chiu, G. (2016). Engineering antibody therapeutics. *Current Opinion in Structural Biology*, S. 38:163–173.
- Choe, C.-u., Lardong, K., Gelderblom, M., Ludewig, P., Leypoldt, F., Koch-Nolte, F., . . . Magnus, T. (2011). CD38 Exacerbates Focal Cytokine Production, Postischemic Inflammation and Brain Injury after Focal Cerebral Ischemia. *Plos One*, 6(5) :e19046.
- De Genst, E., & Silence, K. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition. *PNAS*, 103(12):4586-4591.
- de Jong, R., Beurskens, F., Verploegen, S., Strumane, K., van Kampen, M., Voorhorst, M., . . . Parren, P. (January 2016). A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biology*, S. 14(1): e1002344.
- Diebold, C., Beurskens, F., de Jong, R., Koning, R., Strumane, K., Lindorger, M., . . . Parren, P. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science (New York, N.Y.)*, S. 343(6176), 1260–1263.
- Ezzouaouy, B., Monsonis, F., & Kapinsky, M. (2020). *The Camelid-Derived VHH-Antibody (Nanobody) JK36 Circumvents the Epitope Overlapping with ADCC-Inducing CD38 Antibodies that is Common To Commercially Available Analytical Mouse Antibodies*. Beckman Coulter Life Sciences.
- Fumey, W., Koenigsdorf, J., Kunick, V., Menzel, S., Schütze, K., Unger, M., . . . Koch-Nolte, F. (30. October 2017). Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. *Scientific reports*, S. 7(1):14289.
- Gainkam, & al., H. e. (2008). Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two ^{99m}Tc-Labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT. *The Journal of Nuclear Medicine*, 49:788-795.
- Galione, A., Cui, Y., Empson, R., Iino, S., Wilson, H., & Terrar, D. (1998). Cyclic ADP-ribose and the regulation of calcium-induced calcium release in eggs and cardiac myocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, Vol.28 19-30.

- Gliese, G., Williams, A., Rodriguez, M., & Persson, J. (März 2018). Bispecific antibody process development: Assembly and purification of knob and hole bispecific antibodies. *Biotechnology progress*, S. 34(2):397-404. doi:10.1002/btpr.2590
- Gonzalez-Rodriguez, A., Villa-Álvarez, M., Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., & Gonzalez, S. (27. September 2019). NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *Journal of clinical medicine*, S. 8(10):1557. doi:10.3390/jcm8101557
- Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, I. A., Kotaka, M., Oppenheimer, N., Hao, Q., & Lee, H. C. (2009). Mechanism of Cyclizing NAD to Cyclic ADP-ribose by ADP-ribosyl Cyclase and CD38. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(40):27629-27636.
- Graziano, R. F., & Engelhardt, J. J. (2019). Role of FcγRs in Antibody-Based Cancer Therapy. *Current topic in microbiology and immunology*, S. 423:13-34. doi:10.1007/82_2019_150
- Harmsen, & Haard, D. (2007). Properties, production, and applications of camelid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77:13–22.
- Herold, G. (2013). *Innere Medizin*. Köln.
- Hoey, R., Eom, H., & Horn, J. (Dezember 2019). Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics. *Experimental biology and medicine*, S. 244(17):1568-1576. doi:10.1177/1535370219881129
- Hogan, K. A., Chini, C., & Chini, E. (31. May 2019). The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, S. 10:1187. doi:10.3389/fimmu.2019.01187
- Horenstein, A., Bracci, C., Morandi, F., & Malavasi, F. (24. April 2019). CD38 in Adenosinergic Pathways and Metabolic Re-programming in Human Multiple Myeloma Cells: In-tandem Insights From Basic Science to Therapy. *Frontiers in immunology*, S. 10:760.
- Idusogie, E., Wong, P., Presta, L., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., & Mulkerrin, M. (15. 02 2001). Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *Journal of Immunology*, S. 166(4):2571-5.
- Jan Behrends, J. B. (2012). *Duale Reihe*. Thieme.
- Kishore, U., & Reid, K. (August 2000). C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, S. 49(1-2), 159–170.
- Koch-Nolte, F., Adriouch, S., Bannas, P., Krebs, C., Scheuplein, F., Seman, M., & Haag, F. (2006). ADP-ribosylation of membrane proteins: Unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Annals of Medicine*, Vol.38 188-199.

- Koenigsdorf, J. (2016). *Selektion, rekombinante Expression und molekulare Charakterisierung CD38-spezifischer Einzeldomänen-Antikörper*.
- Krebs, C., Koestner, W., Nissen, M., Welge, V., Parusel, I., Malavasi, F., . . . Koch-Nolte, F. (2003). Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Analytical Biochemistry*, vol.334 108-115.
- Krejčík, J., Casneuf, T., Nijhof, I., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., . . . Sasser, A. K. (21. July 2016). Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, S. 128(3):384-94.
- Krejčík, J., Frerichs, K., Nijhof, I., van Kessel, B., van Velzen, J., Bloem, A., . . . van de Donk, N. (15. Dezember 2017). Monocytes and granulocytes reduce CD38 expression levels on myeloma cells in patients treated with daratumumab. *Clinical cancer research*, S. 23(24): 7498–7511.
- Kumar, Rajkumar, Dispenzieri, LAcy, Hayman, Buadi, . . . Gertz. (1. Mars 2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, S. 111 (5): 2516–2520.
- Lee, D., & Li, K. (2011). Molecular Theranostics: A Primer for the Imaging Professional. *American Journal of Roentgenology*, 197:318-324.
- Li, Qi, Unger, & Nan Hou. (Jun 2016). Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep27055.
- Liu, O., Gao, X., Lundin, V., Shi, C., Adem, Y., Lin, K., . . . Zhang, H.-M. (Januar 2020). Probing the Impact of the Knob-into-Hole Mutations on the Structure and Function of a Therapeutic Antibody. *Analytical chemistry*, S. 92(1):1582-1588.
- Mateos, M.-V., Ludwig, H., Bazarbachi, A., Beksac, M., Bladé, J., Boccadoro, M., . . . Sonneveld, P. (02 2019). Insights on Multiple Myeloma Treatment Strategies. *Hemasphere*, S. 3(1): e163.
- Menzel, S., Rissiek, B., Haag, F., Goldbaum, F., & Koch-Nolte, F. (08 2016). The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs. *The FEBS Journal*, S. 280(15):3543-50.
- Michaelsen, T., Thommesen, J., Ihle, O., Gregers, T., Sandin, R., Brekke, O., & Sandlie, I. (Januar 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*, S. 36(1):129-38.
- Michel de Weers, Y.-T. T. (2011). Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*, S. 186:1840-1848.

- Michihiko Aoyama, M. T.-I.-W. (18. September 2018). Effects of Amino Acid Substitutions on the Biological Activity of anti-CD20 Monoclonal Antibody Produced by Transgenic Silkworms (*Bombyx Mori*). *Biochemical and biophysical research communication*, S. 503 (4), 2633-2638.
- Morandi, F., Marimpietri, D., Horenstein, A. L., Bolzoni, M., Toscani, D., Costa, F., . . . Malavasi, F. (7. Mai 2018). Microvesicles released from multiple myeloma cells are equipped with ectoenzymes belonging to canonical and non-canonical adenosinergic pathways and produce adenosine from ATP and NAD. *Oncoimmunology*, S. 7(8): e1458809.
- Muntasell, Ochoa, Cordeiro, Berraondo, Cerio, L.-D. d., Cabo, . . . Melero. (April 2017). Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Current opinion in Immunology*, S. 45:73-81. doi:10.1016/j.coi.2017.01.003
- Nakayama, S., Yokote, T., Hirata, Y., Iwaki, K., Akioka, T., Miyoshi, T., . . . Hanafusa, T. (2012). An approach for diagnosing plasma cell myeloma by three-color flow cytometry based on kappa/lambda ratios of CD38-gated CD138+ cells. *Diagnostic Pathology*, 7:131.
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., . . . Niwa, R. (15. 05 2008). Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Research*, S. 68(10):3863-72.
- Nijhof, I., Casneuf, T., van Velzen, J., van Kessel, B., Axel, A., Syed, K., . . . van de Donk, N. (18. Aug 2016). CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*, S. 128(7):959-70.
- Nolte, B. S. (2016,). *Patentnr. WO2017081211A2*.
- Oberle, A., Brandt, A., Alawi, M., Langebrake, C., Janjetovic, S., Wolschke, C., . . . Binder, M. (09 2017). Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection. *Haematologica*, S. 102(9): e368–e370.
- Petrucci, M., & Vozella, F. (12. December 2019). The Anti-CD38 Antibody Therapy in Multiple Myeloma. *Cells*, S. 8(12):1629. doi:10.3390/cells8121629
- Plesner, T., van de Donk, N., & Richardson, P. (6. Februar 2020). Controversy in the Use of CD38 Antibody for Treatment of Myeloma: Is High CD38 Expression Good or Bad? *Cells*, S. 9(2),378.
- Richards, J., Karki, S., Lazar, G., Chen, H., Dang, W., & Desjarlais, J. (August 2008). Optimization of Antibody Binding to FcγRIIIa Enhances Macrophage Phagocytosis of Tumor Cells. *Molecular cancer therapeutics*, S. 7 (8), 2517-27.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambiri, J. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, S. 11(9), 785–797.

- Ridgway, J., Presta, L., & Carter, P. (July 1996). Knobs-into-holes' Engineering of Antibody CH3 Domains for Heavy Chain Heterodimerization. *Protein engineering*, S. 9 (7), 617-21.
- Saini, N., & Mahindra, A. (2013). Therapeutic Strategies for the Treatment of Multiple Myeloma. *Discovery Medicine*, 15(83):251-258.
- Sanchez, L., Wang, Y., Siegel, D., & Wang, M. (30. Juni 2016). Daratumumab: a first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Journal of hematology and oncology*, S. 9(1):51. doi:10.1186/s13045-016-0283-0.
- Schlothauer, T., Herter, S., Koller, C., G.-R. S., Steinhart, V., Spick, C., . . . Mössner, E. (October 2016). Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein engineering, design and selection*, S. 29(10):457-466.
- Schütze, K. P.-N. (2018). CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. *Frontiers in immunology*, S. 9, 2553.
- Terje E. Michaelsen Prof., J. T. (Januar 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*, S. Volume 36, Issue1 Pages 129-138.
- Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., & International Myeloma Society. (2020, August). Clinical Updates Regarding Multiple Myeloma From the 2019 American Society of Hematology Annual Meeting. *Clinical lymphoma, myeloma and leukemia*, pp. 20(8):499-508. doi:10.1016/j.clml.2020.03.017
- Unger, M. (2012). *Klonierung und Molekulare Charakterisierung von Einzeldomänenantikörpern gegen das membransträndige Ekto-enzym CD38 aus Homo Sapiens und gegen Toxine aus Clostridium Difficile*. Hamburg.
- van de Donk, N. (July 2018). Immunomodulatory effects of CD38-targeting antibodies. *Immunology letters*, S. 199:16-22. doi:10.1016/j.imlet.2018.04.005
- Wei, W., Graeff, R., & Yue, J. (25. 02 2014). Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca²⁺ signaling pathway. *World Journal of Biological Chemistry*, S. 5(1): 58–67.
- Wesolowski, J., & Alzogaray, V. e. (16. Juni 2009). Single domain antibodies: promising experimental. *S. Med Microbiol Immunol* (2009) 198:157–174.
- Yang, D., Elner, S. G., Chen, X., Field, M. G., Petty, H. R., & Elner, V. M. (2011). MCP-1–Activated Monocytes Induce Apoptosis in Human Retinal Pigment Epithelium. *Investigative ophthalmology and visual Science*, 52(8):6026-6034.

Zhang, D., Goldberg, M., & Chiu, M. (30. December 2016). Fc Engineering Approaches to Enhance the Agonism and Effector Functions of an Anti-OX40 Antibody. *The Journal of biological Chemistry*, S. 291(53):27134-27146.

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern PD Dr. med. Peter Bannas und Prof. Dr. med. Friedrich Nolte für die vorbildliche, freundschaftlich-kollegiale Betreuung und vor allem für die äußerst hilfreichen Ratschläge, ohne die mir die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Kollegen am Institut für Immunologie danke ich sehr für die schöne Zeit und all die Unterstützung. Besonderer Dank geht an Johanna Schmid, Marion Nissen, Fabienne Siegfried und Gudrun Dubberke, die mich stets unterstützt haben. Für die Bereitschaft gerne ihr fachliches Wissen jederzeit mit mir zu teilen, möchte ich mich bei Welbeck Danquah, Stephan Menzel, Thomas Eden, Anna Marie Eichhoff und Björn Rissiek bedanken. Ebenfalls Danke sage ich Kerstin Schuetze, Julia Hambach, Birte Albrecht und Levin Schriewer für die tolle Zusammenarbeit als Teil der AG Bannas.

Dem Graduiertenkolleg im SFB 841 und der Otto-Stiftung bin ich sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung sowie die Möglichkeiten der Weiterbildung und Präsentation meiner Ergebnisse.

Mein privater Dank geht an meine Frau Stella Manno-Fumey und meine Kinder für die Liebe und Kraft in all dieser Zeit sowie an meine Eltern und Geschwister, die mir stets Vertrauen und Unterstützung schenkten. Vielen Dank an Frau Maria Plenio, die mir durch kleine, aber wichtige Gesten dabei geholfen hat, mein Ziel zu erreichen.

12. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13. 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.