

Abschlussbericht:

***in vitro* Ergebnisse an Hybridomzellen**

Hybridomzelllinien sind das Produkt aus der Fusion von Plasmazellen aus der Maus mit humanen Myelomzellen. Dadurch werden die Plasmazellen immortal und können in Kultur gehalten werden. Expressionsanalysen per Durchflusszytometrie an Myelom- und Hybridomzellen haben gezeigt, dass die Zellen unsere Targetproteine CD01, CD02 und CD03 auf ihrer Oberfläche tragen (**Abb. 1**).

Im nächsten Schritt führte ich einen *in vitro* ADCC-Assay durch. Hier wurden die Hybridomzellen mit unseren Schwereketten-Antikörpern gegen unsere Targets inkubiert und anschließend NK92-Zellen dazugegeben. Die natürlichen Killerzellen erkennen an Zellen gebundene Antikörper und bewirken dann durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen die Tötung dieser Zelle. In dem *in vitro* ADCC-Assay an den Hybridomzellen zeigten unsere Schwerekettenantikörper gegen CD01, CD02 und CD03 eine effiziente Lyse der Hybridomzellen.

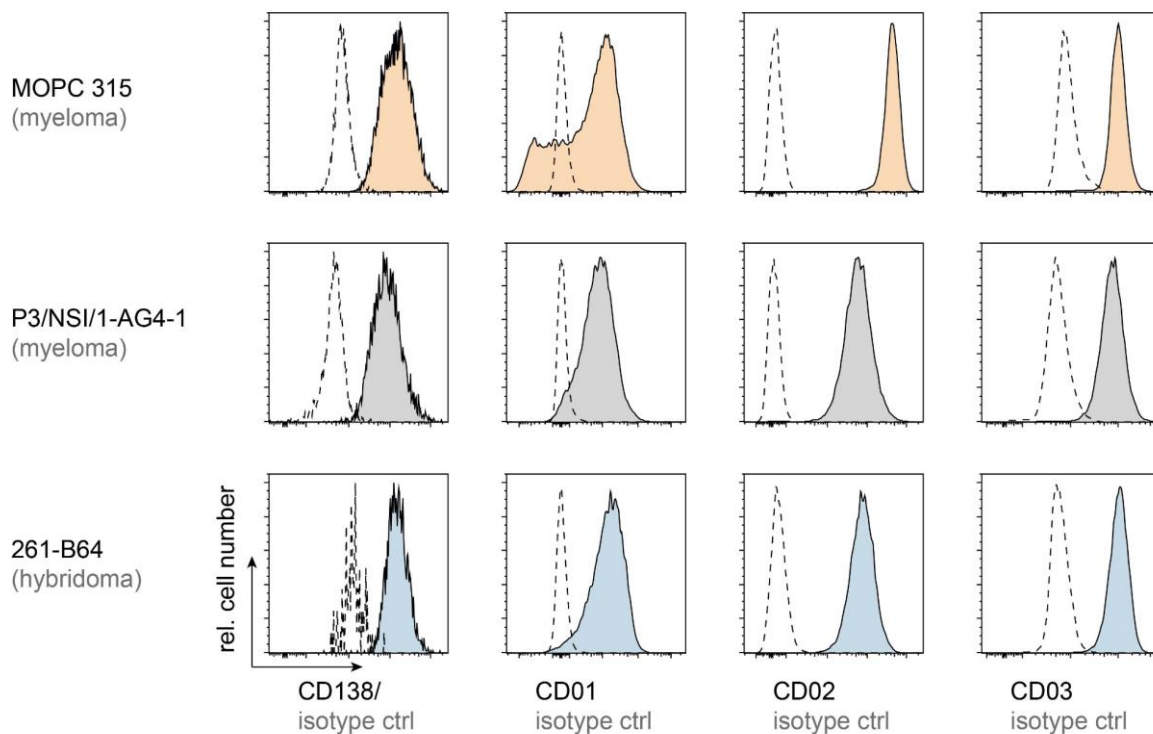


Abbildung 1: Expressionsanalyse an Hybridomzellen (261-B64) und Myelomzellen (MOPC 315 und P3/NSI/1-AG4-1) zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle (schwarz umrandete Kurve) eine deutliche Expression (farbig unterlegte Kurve) des Plasmazellmarkers CD138. Auch die von uns untersuchten Targets CD01, CD02 und CD03 werden von allen 3 Zelllinien exprimiert. Insbesondere CD01 und CD03 zeigen dabei eine besonders starke Anfärbung, während CD01 eher moderat exprimiert wird.

in vitro Ergebnisse an Myelomzellen

Um die Erkrankung des Multiplen Myeloms besser abbilden zu können, hat unser Labor Ende letzten Jahres zwei murine Myelomzelllinien (MOPC 315 und P3/NSI-1-AG4-1) aufgenommen. Diese beiden Zelllinien wurden Mäusen entnommen, die ein Multiples Myelom ausgebildet haben und sind damit weniger artifiziell, als die zuvor verwendeten Hybridomzellen. Expressionsanalysen an diesen Zellen zeigten eine mit den Hybridomzellen weitgehend deckungsgleiche Expression: auch die Myelomzellen exprimieren CD01, CD02 und CD03 (**Abb. 1**). ADCC-Assays, die zuvor an den Hybridomen durchgeführt wurden, zeigten an den Myelomzelllinien das gleiche Ergebnis: Auch an den Myelomzellen zeigten Schwereketten-Antikörper gegen CD01, CD02 und CD03 einen deutlichen ADCC (**Abb. 2**). Dies bestätigt unsere Annahme, dass diese Targets zur Therapie des multiplen Myeloms vielversprechende Ansatzpunkte sein könnten.

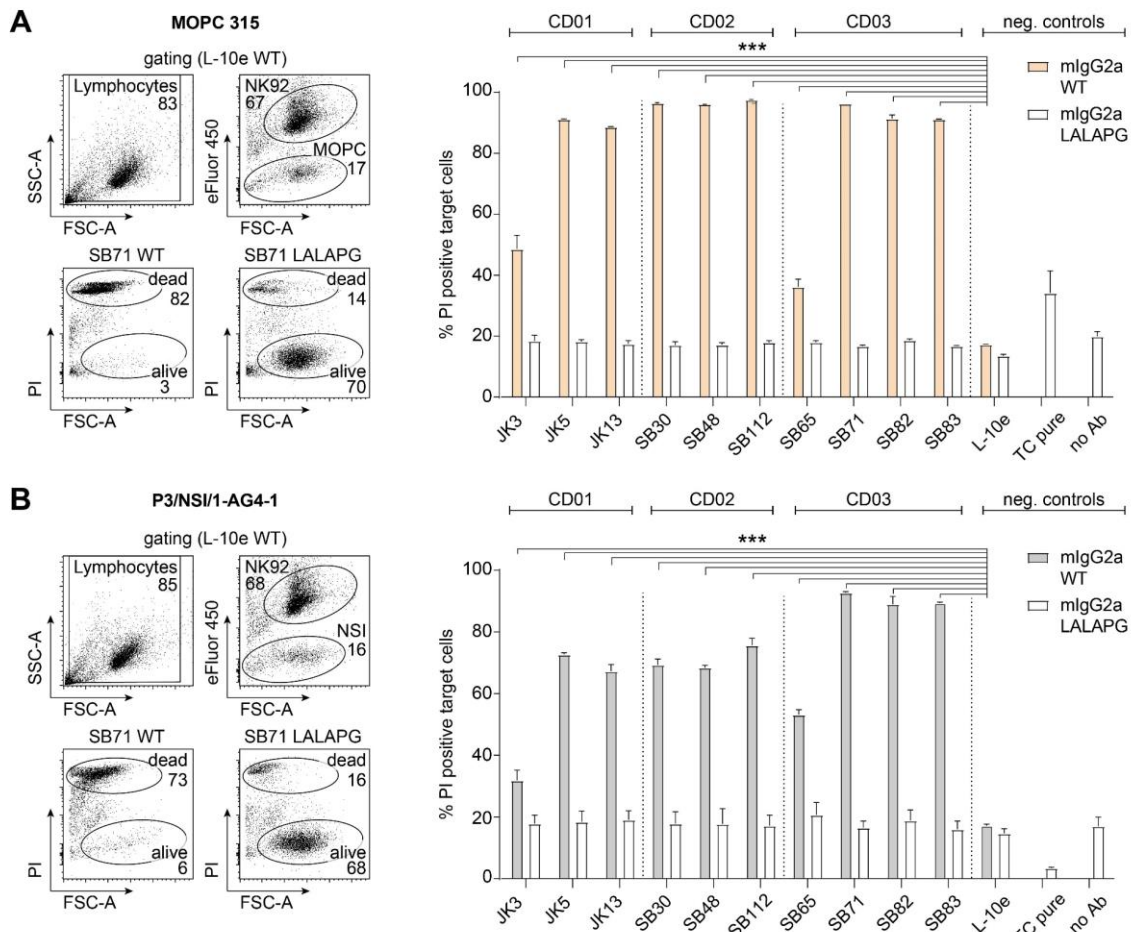
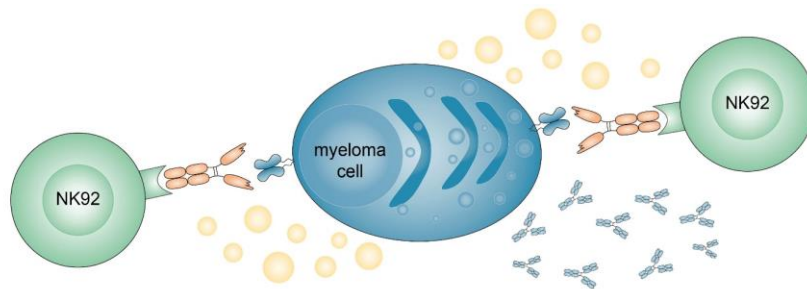


Abbildung 2: in vitro ADCC-Assay an murinen Myelomzellen mit Schwerekettenantikörpern gegen CD01, CD02 und CD03 und NK92 Zellen zeigt eine effektive Lyse der Myelomzellen (n=2). Als Negativkontrolle wurde derselbe Schwerekettenantikörper mit einem mutierten Fc Teil („LALAPG“) eingesetzt, der keine Tötung mehr vermitteln kann.

Ex vivo Expressionsanalyse an murinen Plasmazellen:

Als nächstes stellte sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse aus den Zellkultur-Experimenten auf tatsächliche Plasmazellen der Maus übertragbar waren. Wie bereits im vorangegangenen Zwischenbericht erwähnt, entwickelte ich dafür ein multiparametrisches Antikörperpanel zur Analyse muriner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. Diese Daten aus Knochenmark und Milz der Mäuse zeigen, dass unsere Targetproteine, analog zu den Hybridomzellen, auch auf den Plasmazellen der Maus exprimiert sind. Im Vergleich zu anderen Lymphozytenpopulationen zeigt sich, dass CD01 auch auf B- und T-Zellen exprimiert ist, während CD02 und CD03 überwiegend auf der Oberfläche von Plasmazellen exprimiert werden (**Abb. 3**). Dies lässt vermuten, dass bei dem Einsatz therapeutischer Schwereketten-Antikörper gegen CD02 und CD03 vor allem Plasmazellen und nur wenige andere Zellen als unerwünschter Nebeneffekt entfernt würden.

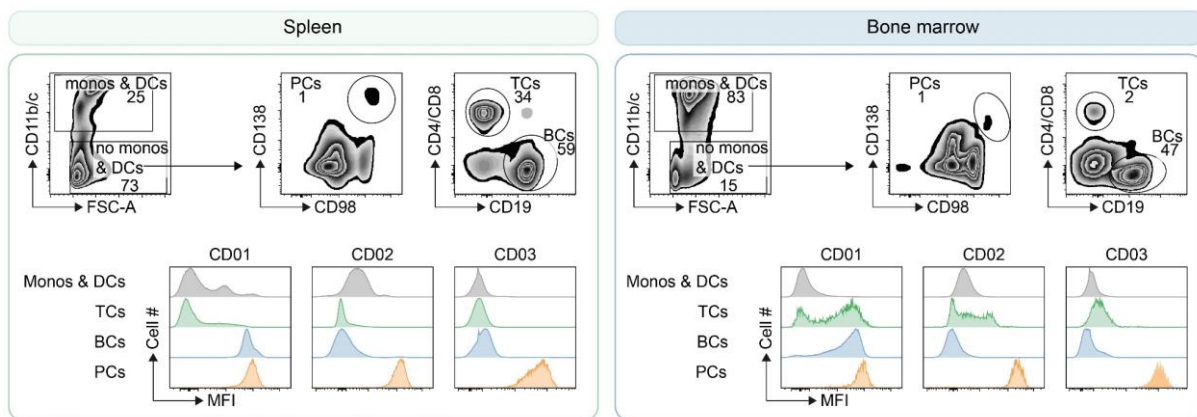


Abbildung 3: ex vivo Expressionsanalyse von murinen Plasmazellen aus Milz und Knochenmark. CD01 zeigt neben den Plasmazellen (orange) eine breitere Expression auch auf T Zellen (grün) und B-Zellen (blau). CD02 und CD03 scheinen überwiegend exklusiv auf Plasmazellen exprimiert zu sein.

Ex vivo ADCC an murinen Plasmazellen:

Im nächsten Schritt untersuchte ich in einem *ex vivo* ADCC an murinen Plasmazellen aus Knochenmark und Milz, ob unsere Schwerekettenantikörper, die eine effektive Tötung der Hybridomzellen bewirken, auch eine Lyse der murinen Plasmazellen herbeiführen. In diesem Assay werden die Mauszellen mit den Schwereketten-Antikörpern und NK92 Zellen inkubiert, nach Ablauf der Inkubationszeit angefärbt und per Durchflusszytometrie angefärbt, um die einzelnen Lymphozytenpopulationen voneinander trennen zu können.

Dieser Assay zeigte, dass unsere Schwereketten-Antikörper auch physiologische Plasmazellen lysieren (**Abb. 4**). Entsprechend des Expressionsprofils, lysieren Schwereketten-Antikörper gegen CD01 auch CD19 positive B-Zellen. CD02 und CD03 zeigen hingegen eine weitgehend spezifische Depletion der Plasmazellen. Die Ergebnisse für die Populationen der Plasmazellen aus Knochenmark und Milz sind dabei vergleichbar.

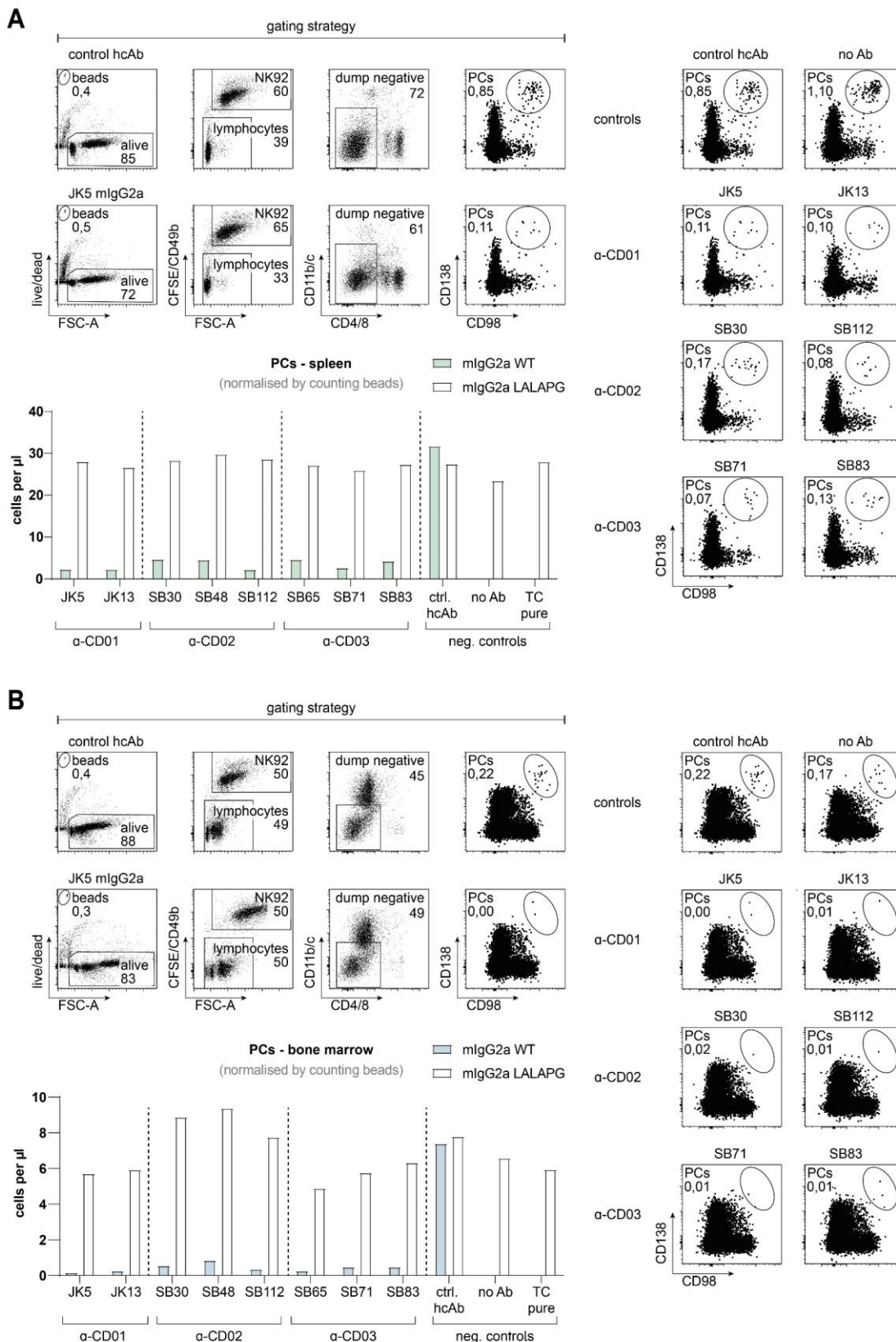


Abbildung 4: ex vivo ADCC an murinen Plasmazellen aus der Milz. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen zeigen eine signifikante Lyse der Plasmazellen durch Schwerekettenantikörper gegen CD01, CD02 und CD03. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz desselben Schwerekettenantikörpers mit mutiertem Fc Teil („LALAPG“) eingesetzt, welcher trotz Bindung keine Tötung vermitteln kann. Als Referenz diente ein Ansatz aus Milzzellen und NK92-Zellen ohne Zugabe von Antikörpern.

***in vitro* CDC-Assays:**

Über ihren Fc-Teil können Antikörper verschiedene Effektormechanismen auslösen, die zur Lyse der Zielzelle führen. Neben des bereits vorgestellten ADCC's, welcher mittels Natürlichen Killerzellen vermittelt wird, zählt auch der CDC (*Complement dependant Cytotoxicity*) dazu. Hier wird der Fc-Teil des gebundenen Antikörpers von Komplementfaktoren aus aktivem Serum erkannt, was zur Aktivierung der Kaskade an Komplementfaktoren führt. Am Ende wird der sogenannte Membran-Angriffskomplex gebildet, der eine Pore in die Membran der Zielzelle formt, welche dadurch lysiert wird.

Nachdem sich bereits gezeigt hatte, dass unsere Antikörper unsere Hybridom- und Myelomzellen via ADCC töten, stellte sich also nun die Frage, ob gleiches auch für den Mechanismus des CDC gilt. Hierfür etablierte ich ein Protokoll, in dem für den CDC-Assay aktives Serum aus dem Meerschweinchen eingesetzt wird, nachdem sich herausgestellt hatte, dass Serum aus dem Kaninchen und dem Menschen zur unspezifischen Tötung von murinen Zellen führt, während das Serum aus der Maus zu instabil ist, um einen potenten CDC *in vitro* herbei zu führen (**Abb. 5**).

Beim CDC Assay werden die Zielzellen zunächst gewaschen und anschließend mit unseren Schwereketten-Antikörpern beladen. Anschließend wird aktives Meerschweinchenserum in einer Konzentration von 1:4 dazu gegeben und die Zellen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgt wie beim ADCC-Assay eine Anfärbung mittels lebend/tot-Farbstoff und eine Messung per Durchflusszytometrie.

Die Ergebnisse zeigten, dass insbesondere die Myelomzelllinien sensitiv für den CDC Assay sind, während die Hybridomzellen weniger empfindlich waren. Entsprechend des Expressionsprofils lösen Schwereketten-Antikörper gegen CD01 einen schwachen und Antikörper gegen CD03 einen starken CDC aus. Interessanterweise lösen Antikörper gegen CD02 trotz hoher Expression auf den Zielzellen bestenfalls einen schwachen CDC aus.

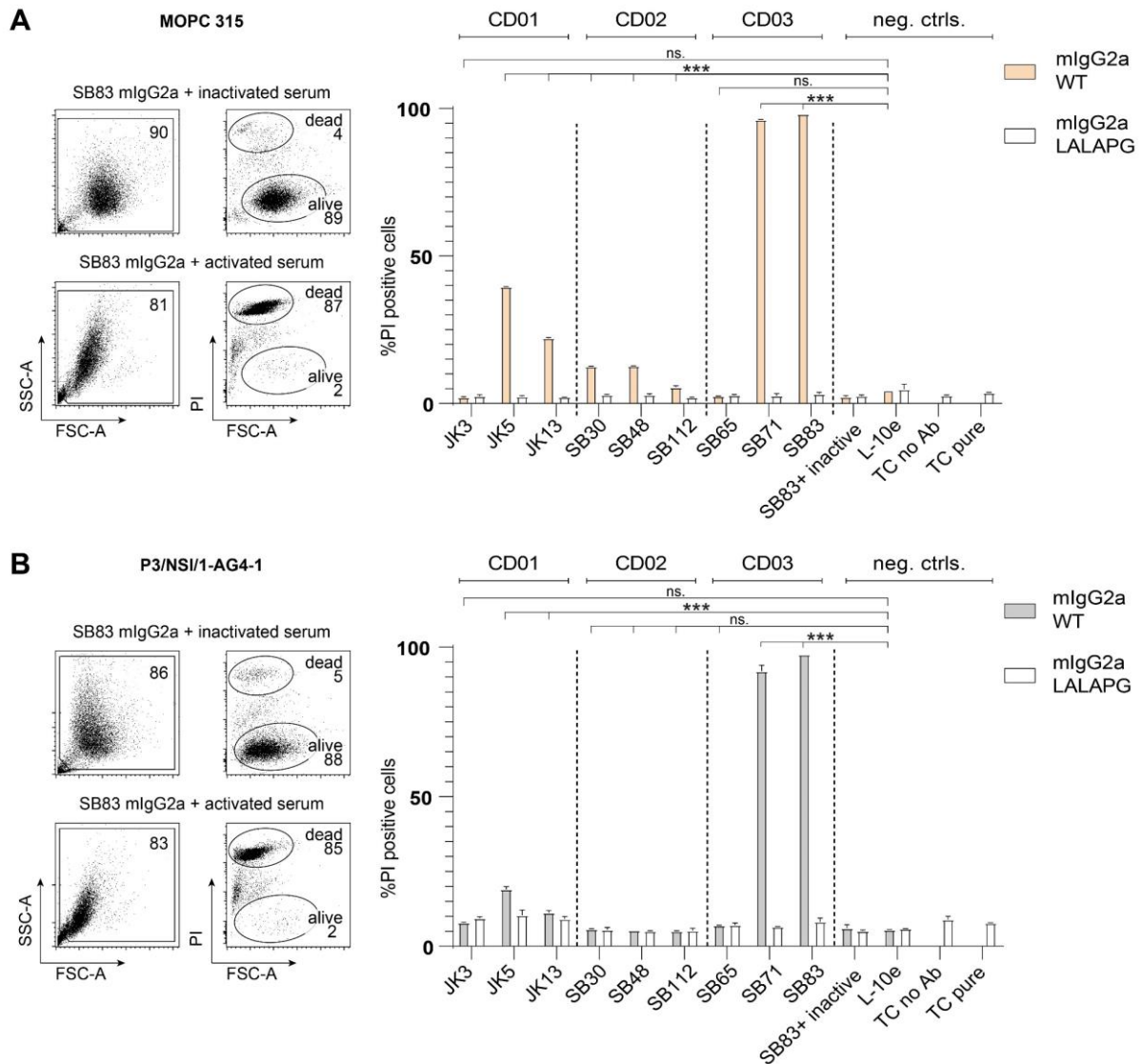
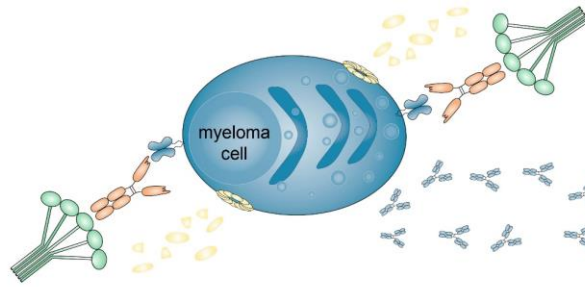


Abbildung 5: *in vitro* CDC an murinen Myelomzelllinien MOPC 315 und P3/NSI/1-AG4-1. Schwereketten-Antikörper gegen CD01 und CD03 lösen einen gemäß der Expression auf den Zielzellen (vgl. Abb. 1) zu erwartenden CDC aus: Schwereketten-Antikörper gegen CD01 zeigen einen leichten und Schwereketten-Antikörper gegen CD03 einen sehr starken CDC. Schwereketten-Antikörper gegen CD02 zeigen trotz starker Expression auf den Zielzellen einen kaum merklichen CDC.

***In vivo* Ergebnisse in Balb c WT Mäusen**

Nachdem die *in vitro* und *ex vivo* Daten vielversprechend aussahen, untersuchten wir im Mausmodell, ob unsere Schwereketten-Antikörper auch im Organismus der Maus dazu in der Lage sind physiologische Plasmazellen zu depletieren, ohne dass Effektorfunktionen wie NK-Zellen oder Komplement von außen dazu gegeben werden.

Wir verwendeten jeweils zwei Nanobody-Klone pro Target und injizierten jeweils 500 µg in BALB/c WT Mäuse. Unsere Gruppengröße betrug jeweils drei Mäuse. Die Mäuse wurden vier Wochen zuvor mit CFA-Ovalbumin immunisiert, da diese Behandlung bei dem naiven Immunsystem der Mäuse zu einer Expansion der Plasmazellen führt. 48 Stunden später analysierten wir Milz und Knochenmark der Mäuse per Durchflusszytometrie und untersuchten die Frequenz an Plasmazellen (**Abb. 7**).

Erfreulicherweise zeigte sich tatsächlich eine Depletion von Plasmazellen sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark. Klone gegen mCD01 (JK5, JK13) zeigten keine wesentliche Depletion, doch insbesondere Klone gegen mCD02 (SB30, SB112) zeigten eine Lyse der physiologischen Plasmazellen um annähernd 80%. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich insbesondere Schwereketten-Antikörper gegen mCD02 (zumindest im Mausmodell) zur Therapie des Multiplen Myeloms oder aber auch von Autoimmunerkrankung eignen können.

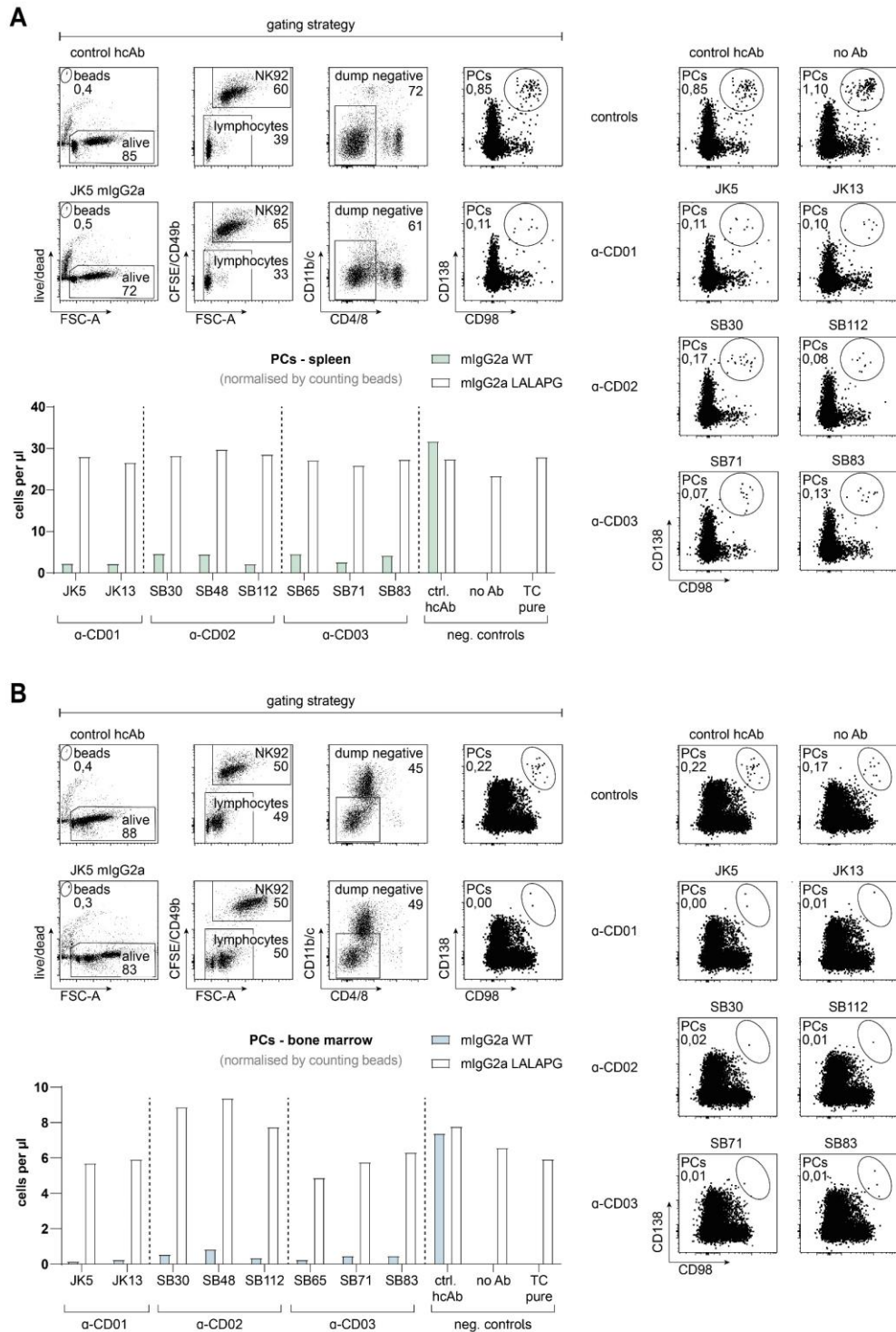


Abbildung 7: in vivo Depletion muriner Plasmazellen in immunisierten BALB/c Wildtyp Mäusen. Vier Woche nach der Grundimmunisierung erfolgte die intraperitoneale Gabe von 500 μ g Schwereketten-Antikörper. Zwei Tage später wurden Milz (Teil A) und Knochenmark (Teil B) der Mäuse präpariert und die Frequenz der Plasmazellen erfasst. Es wurden jeweils zwei Klone an Schwereketten-Antikörper gegen CD01, CD02 und CD03 eingesetzt. Die Gruppengröße betrug 3 Mäuse pro Gruppe. Die Ergebnisse zeigen keine wesentliche Lyse der Plasmazellen durch Antikörper gegen CD01 (JK5, JK13), eine leichte Lyse durch Antikörper gegen CD03 (SB71, SB83) und eine starke Lyse der Plasmazellen um etwa 80% durch Antikörper gegen CD02 (SB30, SB112). Die Ergebnisse für Knochenmark und Milz sind weitgehend deckungsgleich. SB71 scheint jedoch Plasmazellen im Knochenmark etwas stärker zu depletieren, als in der Milz.

Ex vivo Ergebnisse an humanen Myelomzellen

Nachdem sich insbesondere das Oberflächenprotein CD02 im murinen Kontext als vielversprechend herausgestellt hatte, untersuchte ich die Expression dieses Targets auf menschlichen Plasmazellen, die wir aus den Knochenmarksproben von Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen eines Multiplen Myeloms gewannen. Unser Labor hat bereits viel Erfahrung darin diese Proben in Tötungs-Assays mit eigenen Schwereketten-Antikörpern gegen CD01 einzusetzen. Ich wollte nun untersuchen, ob auch CD02 auf den Myelomzellen exprimiert ist und ob sich die Myelomzellen darüber hinaus auch durch Schwereketten-Antikörper gegen humanes CD02 töten lassen.

Tatsächlich zeigte sich auf den meisten Knochenmarksproben zumindest eine moderate Expression der Myelomzellen für CD02, auch wenn die Zellen einer Tumorentität in ihrem Expressionsprofil stark variieren können. **Abb. 8** zeigt exemplarisch einen ex vivo ADCC mit Schwereketten-Antikörpern gegen humanes CD02 und NK92^{hCD16} Zellen, in dem sich eine deutliche Lyse der Myelomzellen gezeigt hat.

Die bisherigen Daten lassen somit darauf hindeuten, dass Antikörper gegen CD02 zumindest ergänzend zur Therapie des Multiplen Myeloms mit z.B. Antikörpern gegen CD01 eingesetzt werden könnten.

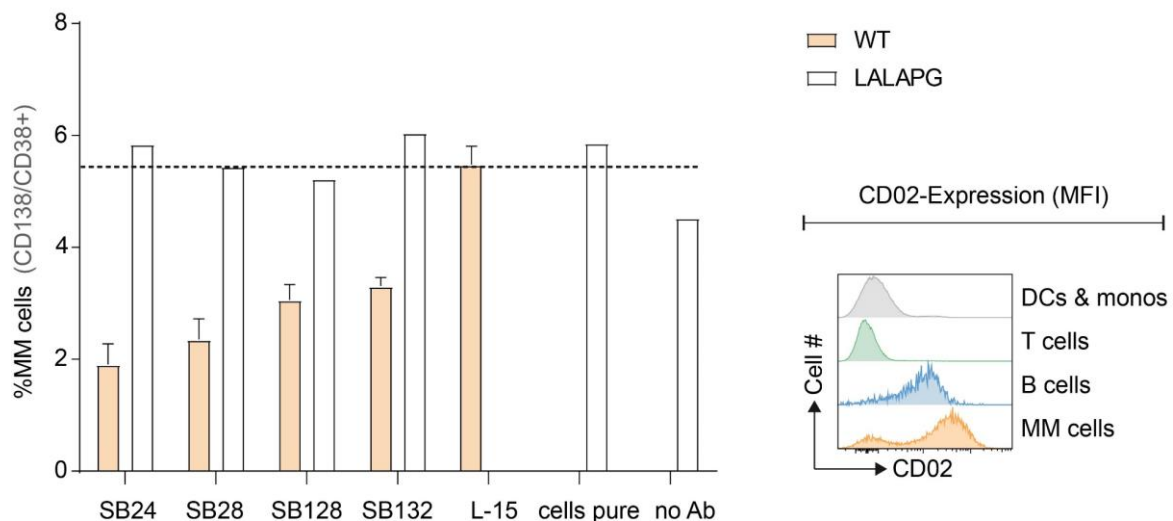


Abbildung 8: Expressionsanalyse und ex vivo ADCC an humanen Myelomzellen aus humanem Knochenmark. Der ex vivo ACC (Säulendiagramm) mit Schwereketten-Antikörpern gegen humanes CD02 zeigt je nach Klon eine Lyse der Myelomzellen um bis zu etwa 70%. Die Expressionsanalyse (Histogramme) zeigt eine deutliche Expression der Myelomzellen für CD02.

Kongresse

Vom 25. bis 30.10.2020 habe ich an der Spring School on Immunology der DGFI teilgenommen. Hier habe ich für meinen Vortrag und mein Poster einen Preis verliehen bekommen. Außerdem konnte ich mich mit Herrn Prof. Dr. Radbruch über unsere Arbeiten austauschen, der seit Jahrzehnten am DRFZ in Berlin zu Plasmazellen forscht und dessen Veröffentlichungen ich stets mit Spannung gelesen habe. Insgesamt war die Spring School eine wertvolle Zeit, in der ich anhand einer Reihe spannender Vorträge vieles gelernt habe. Ende Juni diesen Jahres werde ich darüber hinaus an der Translational Immunology School der DGFI in Potsdam teilnehmen und dort ein Poster vorstellen. Auf diesem Kongress werden zahlreiche immunologische Themen aus dem translationalen Bereich an der Schnittstelle zwischen Forschung und Klinik vorgestellt und ich blicke voller Vorfreude auf die sicherlich inspirierende und lehrreiche Zeit.

Außerdem wird unsere Arbeitsgruppe diesen September voraussichtlich auf einem Kongress in Brüssel teilnehmen. Auf diesem Nanobody Symposium wird es verstärkt um die Möglichkeiten und Perspektiven von Nanobodies und Schwereketten-Antikörpern gehen. Die klinische Relevanz dieser Antikörperklasse ist stark zunehmend.

Publikationen

1. Veröffentlicht
M. Eggers, F. Rühl, F. Haag, F. Koch-Nolte. **Nanobodies as probes to investigate purinergic signaling**, Biochemical Pharmacology, Volume 187, 2021, 114394, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114394>.
2. Eingereicht
N. Baum, M. Eggers, J. Königsdorf, S. Menzel, J. Hambach, R. Fliegert, F. Kulow, G. Adam, F. Haag, P. Bannas, F. Koch-Nolte. **Mouse CD38-specific heavy chain antibodies inhibit CD38 enzyme activity and mediate cytotoxicity against tumor cells**, Frontiers in Immunology, 2021
3. In Arbeit
Paper zu den Daten über CD02-vermittelter Depletion von Plasmazellen. Ziel ist die Einreichung noch in diesem Jahr

Ausblick:

Die bisherigen Daten zeigen, dass insbesondere Schwereketten-Antikörper gegen CD02 dazu in der Lage sind Plasmazellen im murinen System (*in vitro* und *in vivo*) als auch Myelomzellen im humanen System (*ex vivo*) zu depletieren. Diese Depletion möchten wir zunächst anhand weiterer Versuche bezüglich der Pharmakokinetik untersuchen und beispielsweise Kombinationen an Antikörpern sowie verschiedene therapeutische Dauern ausprobieren. Im weiteren Verlauf möchten wir im Mausmodell einer Glomerulonephritis überprüfen, ob die Depletion der Plasmazellen durch unsere Schwereketten-Antikörper tatsächlich einen therapeutischen Effekt auf Autoimmunerkrankungen hat und zu einem besseren Outcome führt. Diese Versuche sind bereits in konkreter Planung und werden voraussichtlich in den nächsten Monaten beginnen. Außerdem haben wir einen Tierversuchsantrag gestellt, um in einem weiteren Mausmodell mit unseren Myelomzellen zu untersuchen, ob unsere Schwereketten-Antikörper auch dazu in der Lage sind zuvor injizierte Myelomzellen *in vivo* zu töten und somit einen therapeutischen Effekt auf die Erkrankung des Multiplen Myeloms haben. Darüber hinaus möchten wir weitere *ex vivo* ADCC-Assays an humanen Myelomzellen durchführen, um die Rolle von humanem CD02 zur Therapie des Multiplen Myeloms weiter zu evaluieren.