

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 den Hybridomzellen 261-B64 haben gezeigt, dass die Zellen unsere Targetproteine CD38, CD39 und CD203 auf ihrer Oberfläche tragen (**Abb. 1**).

Im nächsten Schritt führte ich einen *in vitro* ADCC-Assay durch (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*). 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 CD38, CD39 und CD203 eine effiziente Lyse der Hybridomzellen.

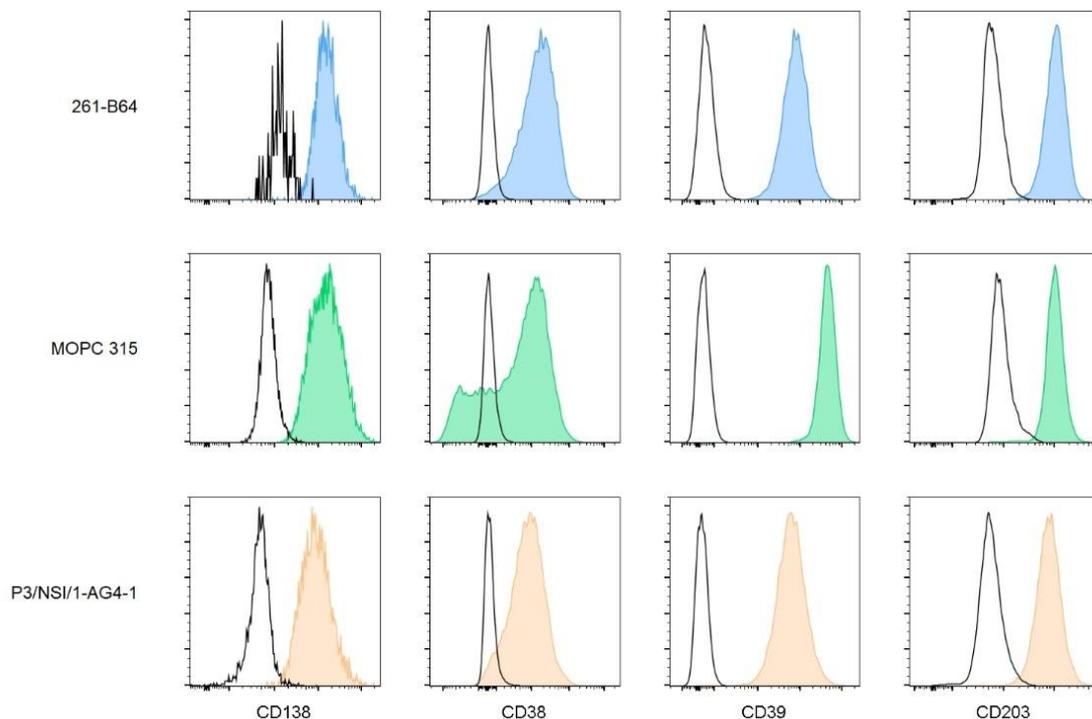


Abbildung 1: Expressionsanalyse an Hybridomzellen (261-B64) und Myelomzellen (MOPC 315 und P3/BSI/1-AG4-1) zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle (schwarz umrandete Kurve eine deutliche Expression (farbig unterlegte Kurve) des Plasmazellmarkers CD138. Auch die von uns untersuchten Targets CD38, CD39 und CD203 werden von allen 3 Zelllinien exprimiert. Insbesondere CD39 und CD203 zeigen dabei eine besonders starke Anfärbung, während CD38 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 vergleichbare Zelloberflächen-Expression von CD38, CD39 und CD203 (**Abb. 1**). ADCC-Assays, die zuvor an den Hybridomen durchgeführt wurden, zeigten an den Myelomzelllinien

das gleiche Ergebnis: Auch an den Myelomzellen vermittelten Schwereketten-Antikörper gegen CD38, CD39 und CD203 einen effektiven ADCC (**Abb. 2**). Dies bestätigt unsere Annahme, dass diese Targets zur Therapie des multiplen Myeloms vielversprechende Ansatzpunkte sein könnten.

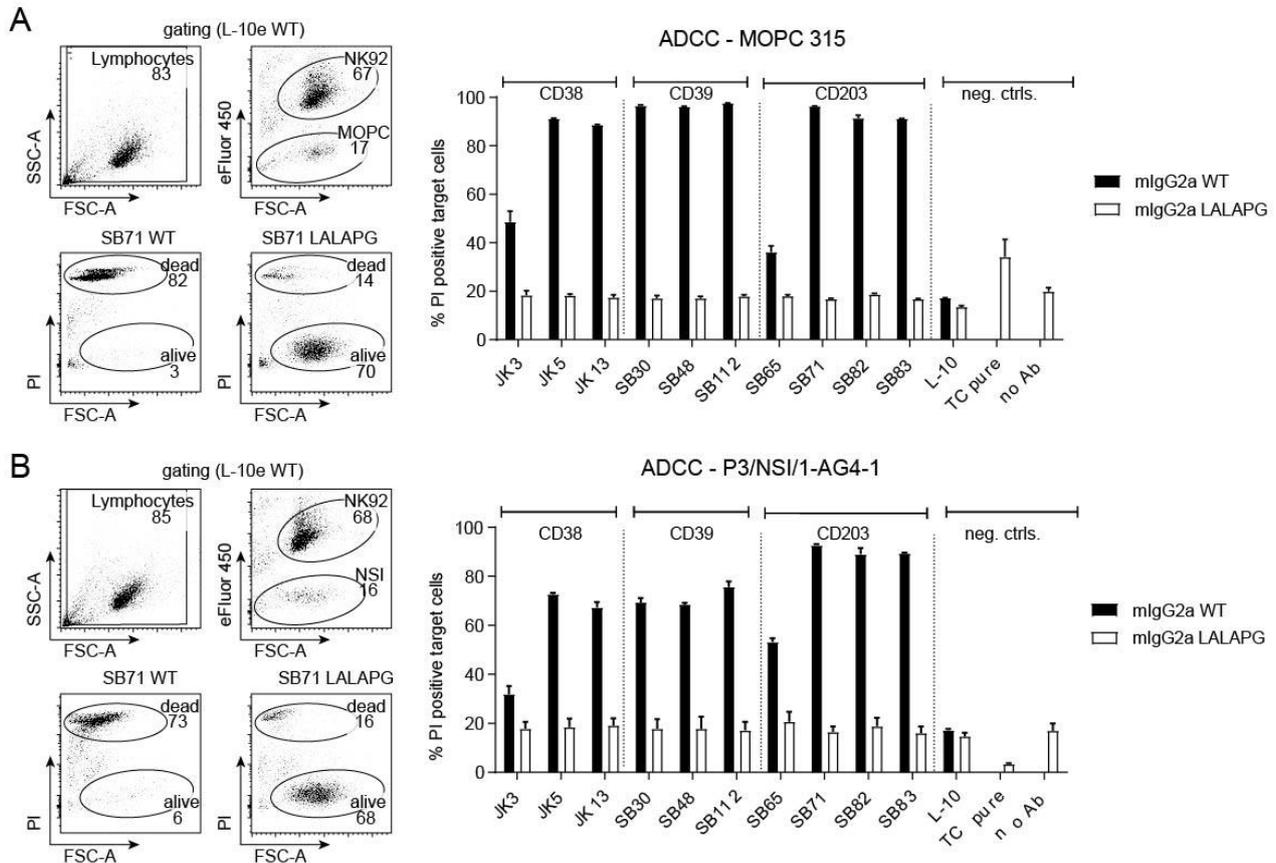


Abbildung 2: *in vitro* ADCC-Assay an murinen Myelomzellen mit Schwerekettenantikörpern gegen CD38, CD39 und CD203 und NK92 Zellen zeigt eine effektive Lyse der Hybridomzellen (n=2). Als Negativkontrolle wurde derselbe Schwerekettenantikörper mit einem mutierten Fc Teil („LALAPG“) eingesetzt, der keine Tötung mehr vermitteln kann.

Ex vivo Expressionsanalyse an murinen Plasmazellen:

Als nächstes stellte sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse aus Zellkultur-Experimenten auf primäre Plasmazellen der Maus übertragbar sind. Wie bereits im 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 CD38 auch auf B- und T-Zellen exprimiert ist, während CD39 und CD203 überwiegend auf der Oberfläche von Plasmazellen exprimiert werden (**Abb. 3**). Dies lässt vermuten, dass bei dem Einsatz therapeutischer Schwereketten-Antikörper gegen CD39 und CD203 vor allem Plasmazellen und nur wenige andere Zellen als unerwünschter Nebeneffekt entfernt würden.

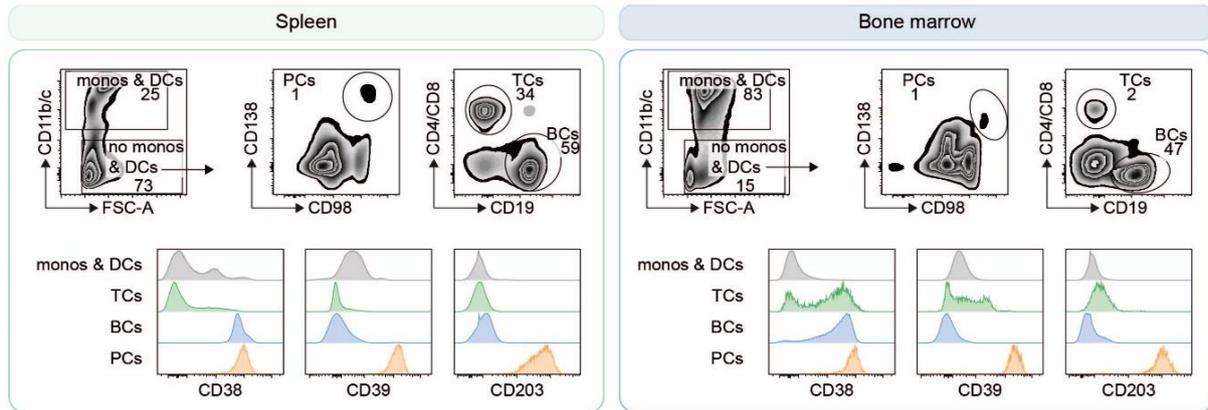
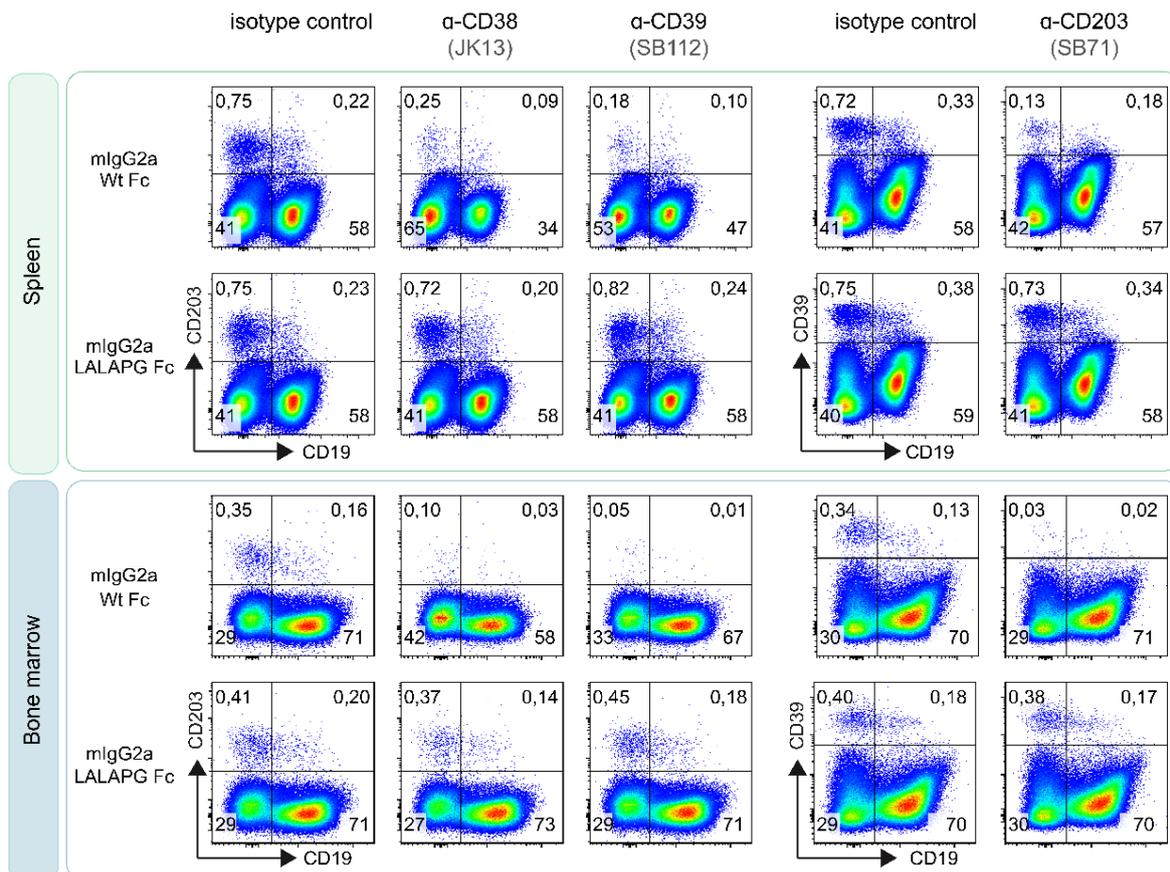


Abbildung 3: ex vivo Expressionsanalyse von murinen Plasmazellen aus Milz und Knochenmark. CD38 zeigt neben den Plasmazellen (orange) eine breitere Expression auch auf T Zellen (grün) und B-Zellen (blau). CD39 und CD203 scheinen überwiegend exklusiv auf Plasmazellen exprimiert zu sein.

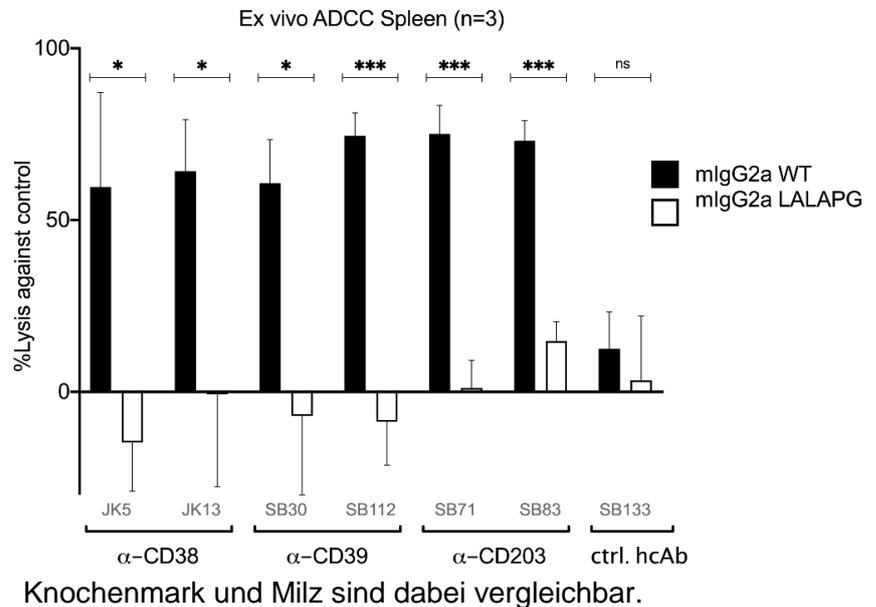
Ex vivo ADCC an murinen Plasmazellen:

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 analysiert, um die einzelnen Lymphozytenpopulationen voneinander trennen zu können. Dieser Assay zeigte, dass unsere Schwereketten-Antikörper auch physiologische Plasmazellen lysieren (**Abb. 4**). Entsprechend dem Expressionsprofil, lysieren Schwereketten-Antikörper gegen CD38 auch



CD19 positive B-Zellen. CD39 und CD203 zeigen hingegen eine weitgehend spezifische Depletion der Plasmazellen. Die Ergebnisse für die Populationen der Plasmazellen aus

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 CD38, CD39 und CD203. 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, wie den bereits vorgestellten ADCC's und den CDC (*complement dependant cytotoxicity*) dazu. Hier bindet der Fc-Teil der an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper an den ersten Faktor des Komplementsystems (C1q). Dies führt zur Aktivierung der Komplementkaskade und schließlich zur Bildung des sogenannten Membran-Angriffskomplexes, der eine Pore in die Membran formt und die Zielzelle dadurch lysiert. Nachdem sich bereits gezeigt hatte, dass unsere Antikörper Hybridom- und Myelomzellen via ADCC töten, stellte sich nun die Frage, ob gleiches auch für den Mechanismus des CDC gilt. Hierfür etablierte ich ein Protokoll, in dem ich als Quelle für Komplementfaktoren Serum aus dem Meerschweinchen einsetzte, nachdem sich herausgestellt hatte, dass Serum aus dem Kaninchen und dem Menschen zur unspezifischen Tötung von murinen Zellen führt, während Komplementfaktoren im Serum aus der Maus zu instabil sind, um einen potenten CDC *in vitro* herbei zu führen (**Abb. 5**).

Beim CDC Assay werden die Zielzellen zunächst gewaschen und anschließend mit 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 sind, während die Hybridomzellen weniger empfindlich waren. Entsprechend des Expressionsprofils lösen Schwereketten-Antikörper gegen CD38 einen schwachen und Antikörper gegen CD203 einen starken CDC aus. Interessanterweise lösen Antikörper gegen CD39 trotz hoher Expression auf den Zielzellen bestenfalls einen schwachen CDC aus.

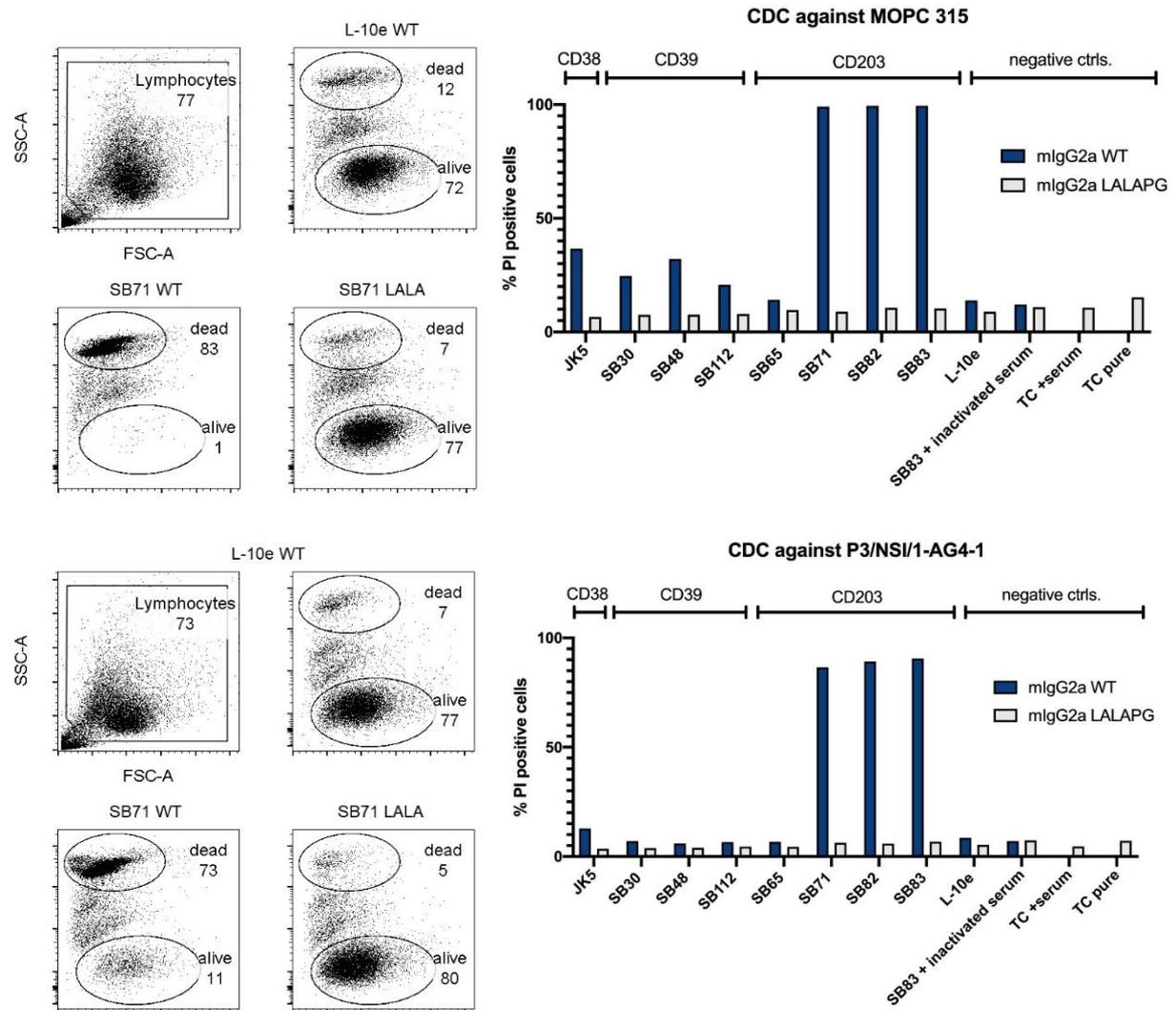


Abbildung 5: in vitro CDC an murinen Myelomzelllinien MOPC 315 und P3/NSI/1-AG4-1. Schwereketten-Antikörper gegen CD38 und CD203 lösen einen gemäß der Expression auf den Zielzellen (vgl. Abb. 1) zu erwartenden CDC aus: Schwereketten-Antikörper gegen CD38 zeigen einen leichten und Schwereketten-Antikörper gegen CD203 einen sehr starken CDC. Schwereketten-Antikörper gegen CD39 zeigen trotz starker Expression auf den Zielzellen einen kaum merklichen CDC.

Ex vivo CDC-Assays:

Nachdem der CDC-Assay in vivo etabliert war, untersuchte ich, ob der Assay auch auf primäre Lymphozyten aus Milz und Knochenmark von Mäusen übertragbar war. Die Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Schwereketten-Antikörper in der Lage sind, auch primäre Plasmazellen der Maus via CDC zu lysieren. Tatsächlich zeigte sich ein weitgehend ähnliches Ergebnis, wie zuvor beim in vitro CDC; Antikörper gegen CD38 und CD203 zeigten einen dem Expressionsprofil entsprechend starken CDC, während der durch Antikörper gegen CD39 vermittelte CDC vergleichsweise schwach ausfiel. Bei Antikörpern gegen CD38 zeigte sich eine starke Depletion der CD19⁺ B-Zellen, die tendenziell etwas mehr CD38

exprimieren, als Plasmazellen. Die stärkere B-Zelldepletion bewirkte dabei eine anteilige Zunahme der Plasmazellen (**Abb. 6**).

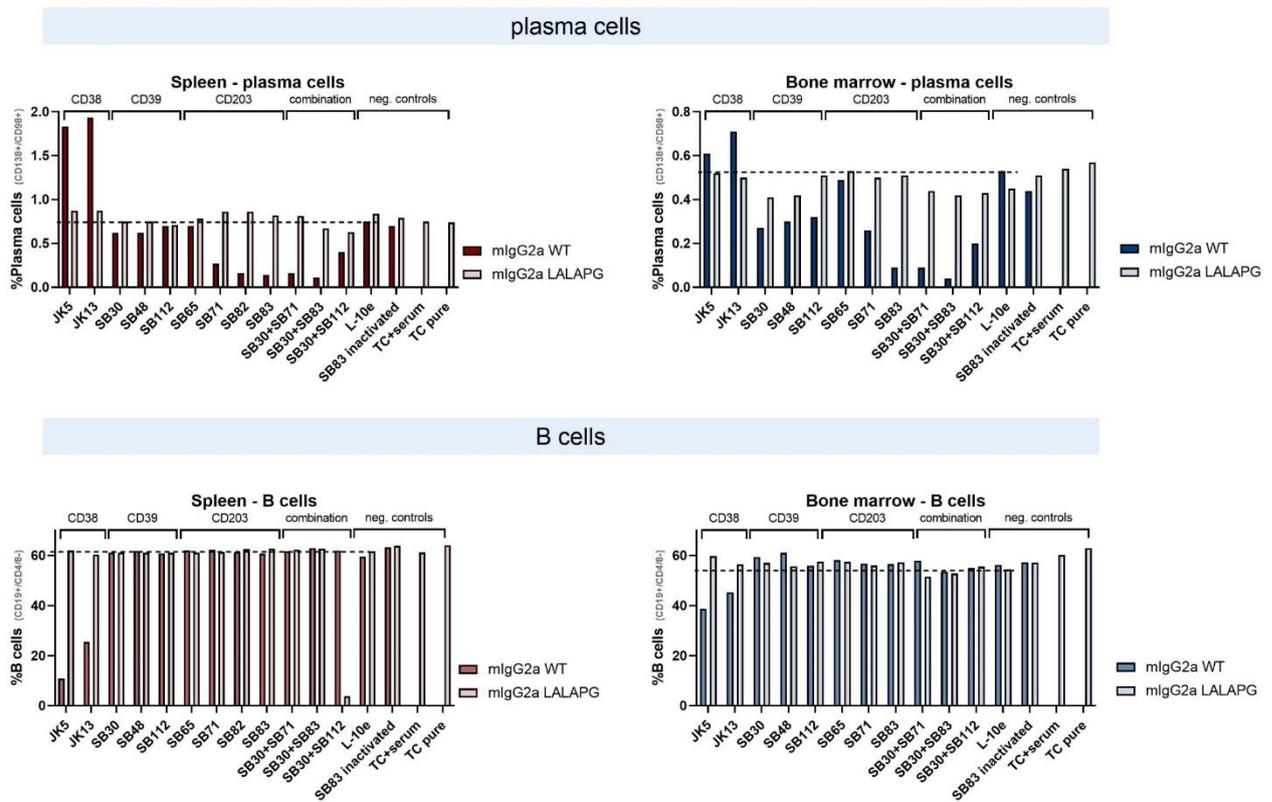


Abbildung 6: *ex vivo* CDC an primären Lymphozyten aus Milz und Knochenmark der Maus. Antikörper gegen CD38 vermitteln eine starke B-Zelldepletion, wodurch es zur anteiligen Zunahme der Plasmazellen kommt. Antikörper gegen CD39 vermitteln einen trotz hoher Expression auf den Plasmazellen vergleichsweise schwachen CDC. Antikörper gegen CD203 zeigen den stärksten CDC gegen murine Plasmazellen. Diese Ergebnisse sind weitgehend analog zu den Daten aus vorherigen *in vitro* CDC-Assays (vgl. Abb. 5)

In vivo Ergebnisse in Balb c WT Mäusen

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

Wir injizierten hierfür je zwei aufgereinigte Nanobody-Klone je Target in Balb c WT Mäuse. Die Gruppengröße betrug jeweils drei Mäuse. Die Mäuse wurden vier Wochen zuvor mit CFA-Ovalbumin immunisiert, da diese Behandlung zu einer Expansion der Plasmazellen führt. 48 Stunden nach der Nanobody Injektion analysierten wir Milz und Knochenmark der Mäuse per Durchflusszytometrie und ermittelten die Frequenz an Plasmazellen (**Abb. 7**). Dabei zeigte sich tatsächlich eine Depletion von Plasmazellen sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark. Die Injektion von Nanobodies gegen mCD39 (SB30, SB112) führten zu einem Verlust von Plasmazellen um annähernd 80%, während Nanobodies gegen mCD38 (JK5, JK13) keine wesentliche Depletion zeigten. Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass Schwereketten-Antikörper gegen mCD39 (zumindest im Mausmodell) zur Therapie des Multiplen Myeloms oder auch von Autoimmunerkrankung eignen können.

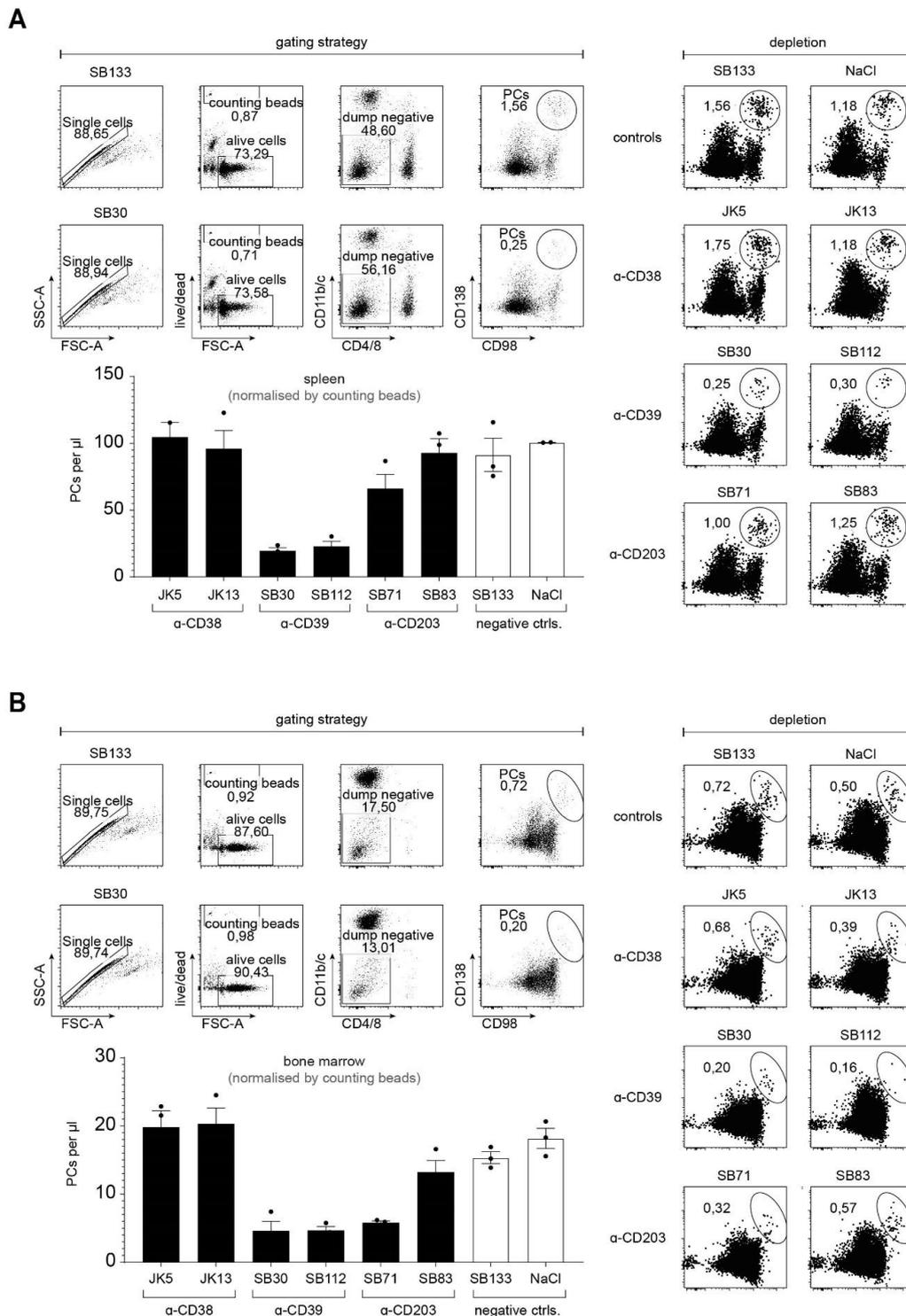


Abbildung 7: in vivo Depletion muriner Plasmazellen in immunisierten Balb c Wildtyp Mäusen. Vier Woche nach der Grundimmunisierung erfolgte die intraperitoneale Gabe von 500 µg Schwereketten-Antikörper. Zwei Tage später wurden Milz (Teil A) und Knochenmark (Teil B) der Mäuse präpariert und die Frequenz der Plasmazellen erfasst. Es wurden jeweils zwei Klone an Schwereketten-Antikörper gegen CD38, CD39 und CD203 eingesetzt. Die Gruppengröße betrug 3 Mäuse pro Gruppe. Die Ergebnisse zeigen keine wesentliche Lyse der Plasmazellen durch Antikörper gegen CD38 (JK5, JK13), eine leichte Lyse durch Antikörper gegen CD203 (SB71, SB83) und eine starke Lyse der Plasmazellen um etwa 80% durch Antikörper gegen CD39 (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 CD39 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. Dabei wollte ich nun untersuchen, ob CD39 auf den Myelomzellen exprimiert ist und ob Schwereketten-Antikörper gegen humanes CD39 einen zytotoxischen Effekt auf diese Zellen vermitteln kann. Tatsächlich zeigte sich auf den meisten Myelomzellen aus den Knochenmarksproben zumindest eine moderate Expression für CD39, 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 CD39 und NK92^{hCD16} Zellen, in dem sich eine deutliche Lyse der Myelomzellen gezeigt hat.

Diese Ergebnisse deuten an, dass Antikörper gegen CD39 alleine oder ergänzend zur Therapie des Multiplen Myeloms mit Antikörpern gegen CD38 eingesetzt werden könnten.

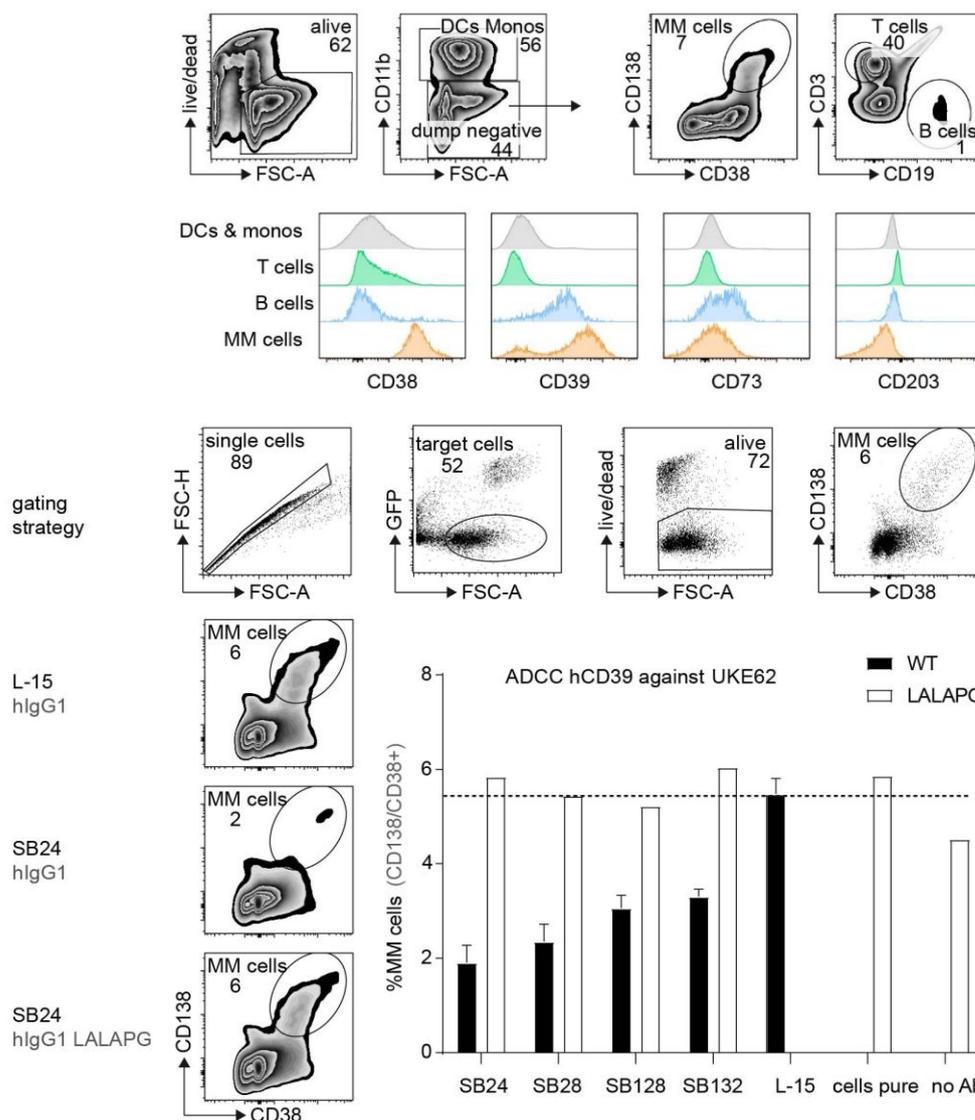


Abbildung 8: Expressionsanalyse und ex vivo ADCC an humanen Myelomzellen aus humanem Knochenmark. Die Expressionsanalyse (oberer Abschnitt) zeigt eine deutliche Expression der Myelomzellen für CD38 sowie eine moderate Expression für CD39, während CD73 und CD203 weniger stark exprimiert werden. Der ex vivo ACC (unterer Abschnitt) mit Schwereketten-Antikörpern gegen humanes CD39 zeigt je nach Klon eine Lyse der Myelomzellen um bis zu etwa 70%.

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 dieses 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 werde ich im September voraussichtlich an einem internationalen Nanobody Kongress in Brüssel teilnehmen, auf dem die Möglichkeiten und Perspektiven von Nanobodies und Schwereketten-Antikörpern für klinische Anwendungen im Fokus stehen.

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 CD39 vermittelter Depletion von Plasmazellen. Ziel ist die Einreichung noch in diesem Jahr

Ausblick:

Die bisherigen Daten zeigen, dass insbesondere Schwereketten-Antikörper gegen CD39 dazu in der Lage sind, eine Depletion von Plasmazellen im murinen System (*in vitro* und *in vivo*) wie auch Myelomzellen im humanen System (*ex vivo*) zu vermitteln.

Künftige Untersuchungen könnten die Pharmakokinetik und Dosiswirkung dieser neuen Wirkstoffe, sowie eine mögliche kombinatorische Wirkung mit anderen Antikörpern und Therapeutika weiter beleuchten.

Zudem könnte in einem am UKE etablierten Mausmodell der Glomerulonephritis überprüft werden, ob die Depletion von Plasmazellen durch unsere Schwereketten-Antikörper 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.

In einem weiteren Mausmodell mit den hier untersuchten Myelomzelllinien könnte untersucht werden, 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.

In weiteren *ex vivo* ADCC-Assays an humanen Myelomzellen könnte auch die Bedeutung von CD39 als Target für Antikörper-Therapien des Multiplen Myeloms weiter evaluiert werden.