

Aus der Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und  
Onkologie  
(Direktorin: Prof. Dr. Claudia Baldus)  
Sektion für Antikörperbasierte Immuntherapie  
(Leitung: Prof. Dr. Matthias Peipp)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# **Entwicklung NKG2D-gerichteter bispezifischer Antikörper zur Therapie des Multiplen Myeloms**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Lea Luisa Dorothea Ebinger**  
aus Stuttgart

Kiel 2024

---

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Daniela Wesch, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.04.2025

gez.: PD Dr. Renate Burger, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie (Vorsitzende der Prüfungskommission)

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Therapeutische Antikörper in der Onkologie.....	1
1.1.1 Wirkmechanismen von Antikörpern .....	4
1.1.2 Bispezifische Antikörper.....	6
1.2 NKG2D als zytotoxisches Triggermolekül.....	7
1.2.1 Immuntherapeutische Nutzung von NKG2D .....	9
1.3 Lymphome der B-Zellreihe.....	9
1.3.1 Multiples Myelom .....	10
1.3.2 Zielstrukturen auf Myelomzellen .....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien .....	17
2.1.1 Antikörper.....	20
2.1.2 Zellkultur .....	21
2.2 Klonierung der Antikörperderivate .....	22
2.2.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen .....	22
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	23
2.2.3 DNA-Extrahierung und -Quantifizierung .....	23
2.2.4 Ligation .....	23
2.2.5 Chemische Transformation .....	23
2.2.6 Elektrische Transformation / Elektroporation .....	24
2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA .....	24
2.2.8 Sequenzierung .....	25
2.3 Zellbiologische Methoden .....	25
2.3.1 Allgemeines Vorgehen für die Kultivierung der Zelllinien.....	25
2.3.2 Proteinexpression durch Calciumphosphat-Transfektion in Lenti-X 293-T Zellen .....	25
2.3.3 Proteinexpression durch <i>large scale</i> Elektroporation in CHO-S Zellen ..	26
2.3.4 Proteinreinigung .....	27
2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	28
2.3.6 Immunoblotting .....	28

2.3.7 Durchflusszytometrie .....	29
2.3.8 Isolation humaner Effektorzellen aus Vollblut .....	30
2.3.9 Antikörper-abhängige zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) mit <sup>51</sup> Chrom-Freisetzungversuch.....	30
2.4 Statistische Analysen.....	31
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1 Aufbau der Antikörper .....	32
3.2 Klonierung der Expressionsvektoren .....	34
3.3 Herstellung und Reinigung der Fusionsproteine .....	35
3.4 Untersuchung des Bindungsverhaltens .....	39
3.4.1 Untersuchung der spezifischen Bindung .....	39
3.4.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens an Plasmazellleukämie-Zellen ..	41
3.4.3 Untersuchung der bispezifischen Bindung.....	44
3.5 Untersuchung der Zytotoxizität .....	46
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1 Das bispezifische Antikörperformat .....	51
4.2 Bispezifische Antikörper im Vergleich mit natürlichen Liganden.....	53
4.3 Aktivierung von Effektorzellen und Kreuzvernetzungen .....	53
4.4 CD138xNKG2D und CS1xNKG2D zeigen allein keine zytotoxische Aktivität .....	54
4.5 Zusätzliche Effekte durch die bispezifischen Antikörper und mögliche Kombinationstherapien .....	55
4.6 Optimierung durch IL-2 und IL-15 .....	57
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>
<b>Affidavit.....</b>	<b>79</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>80</b>

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1</b> Struktur eines IgG-Antikörpers .....	2
<b>Abbildung 2</b> Humanisierung monoklonaler Antikörper .....	3
<b>Abbildung 3</b> Direkte Fab-vermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper .....	4
<b>Abbildung 4</b> Fc-vermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.....	5
<b>Abbildung 5</b> Schematische Darstellung von NKG2D und DAP10 .....	8
<b>Abbildung 6</b> Pathogenetisches Modell der Entwicklung des Multiplen Myeloms .....	11
<b>Abbildung 7</b> Therapeutische Zielstrukturen der Myelomzelle.....	13
<b>Abbildung 8</b> Funktionen des bispezifischen Antikörperkonstrukts .....	16
<b>Abbildung 9</b> Schematische Darstellung der Antikörperkonstrukte .....	33
<b>Abbildung 10</b> Expressionsplasmide enthalten das NKG2D scFv-Insert.....	35
<b>Abbildung 11</b> Analyse der Reinheit, Molekulargewicht und Konzentration der Antikörperkonstrukte .....	37
<b>Abbildung 12</b> Die Identität der Derivate der schweren und leichten Kette können im Western Blot bestätigt werden .....	38
<b>Abbildung 13</b> CD138xNKG2D und CS1xNKG2D binden spezifisch an ihre Zielantigene..	40
<b>Abbildung 14</b> Antikörperkonstrukte binden spezifisch auf Tumorzelllinien mit Zielantigen- Expression .....	42
<b>Abbildung 15</b> CD138xNKG2D und CS1xNKG2D zeigen an L363-Zellen konzentrationsabhängige Bindung.....	43
<b>Abbildung 16</b> Dosisabhängige Sättigungskurven.....	44
<b>Abbildung 17</b> Schema für den Nachweis der bispezifischen Bindung .....	45
<b>Abbildung 18</b> CD138xNKG2D und CS1xNKG2D binden simultan und bispezifisch. ....	46
<b>Abbildung 19</b> Die Antikörperkonstrukte zeigen zusammen mit Effektorzellen keine erhöhte Lyse .....	47
<b>Abbildung 20</b> Dosisabhängige ADCC-Induktion in <sup>51</sup> Chrom-Freisetzungversuchen.....	49

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b> Diagnosekriterien Multiples Myelom nach der <i>International Myeloma Working Group</i> (60).....	10
<b>Tabelle 2</b> Puffer und Lösungen .....	17
<b>Tabelle 3</b> Expressionsvektoren .....	18
<b>Tabelle 4</b> Organismen .....	19
<b>Tabelle 5</b> Enzyme.....	19
<b>Tabelle 6</b> Oligonukleotide ( <i>Primer</i> ) .....	19
<b>Tabelle 7</b> DNA- und Proteingrößenstandard .....	19
<b>Tabelle 8</b> Antikörper für Immunoblots.....	20
<b>Tabelle 9</b> Antikörper für Durchflusszytometrie.....	20
<b>Tabelle 10</b> Antikörper für ADCC .....	21
<b>Tabelle 11</b> Zellkulturmedien .....	21
<b>Tabelle 12</b> Zelllinien.....	22
<b>Tabelle 13</b> Laborgeräte .....	72
<b>Tabelle 14</b> Labormaterialien .....	73
<b>Tabelle 15</b> Zellkulturmaterialien.....	74
<b>Tabelle 16</b> Chemikalien .....	75
<b>Tabelle 17</b> Verwendete Kits.....	77

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADC	antibody drug conjugate
ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
BiTE	<i>bispecific T-cell engager</i>
Bp	Basenpaar
BR	<i>basal release</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAR	<i>chimeric-antigen-receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent-cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementary determining regions</i>
C <sub>H</sub>	<i>constant heavy chain</i>
C <sub>L</sub>	<i>constant light chain</i>
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>Counts per minute</i>
CS1	CD1 subset 2
DAP10	<i>DNAX activation proteins of 10 kDa</i>
DMEME	<i>Dulbecco´s Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EAT2	<i>EWS-Fli1-activated transcript-2</i>
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMD	<i>extramedullary disease</i>
EGFR	<i>epidermal-growth-factor-receptor</i>
E:T	<i>effector-to-target</i>
Fab	<i>fragment antigen-binding-</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>

FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g/mg/µg/ng	Gramm/Milligramm/Mikrogramm/Nanogramm
GC	<i>germinal center</i>
GFP	<i>green Fluorescence Protein</i>
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GPRC5D	<i>G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member D</i>
HC	<i>Heavy chain</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ICE	<i>innate cell engager</i>
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IgH	<i>immunoglobuline heavy chain locus</i>
IL-2	Interleukin-2
IL-15	Interleukin-15
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activating motifs</i>
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton
l/ml/µl	Liter/Milliliter/Mikroliter
LC	<i>light chain</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I chain-related protein A</i>
MICB	<i>MHC class I chain-related protein B</i>
MF	Makrophage
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
mM/µM/nM	Millimolar/Mikromolar/Nanomolar
MNC	<i>Mononuclear cell</i>
MR	<i>Maximal-Release</i>

---

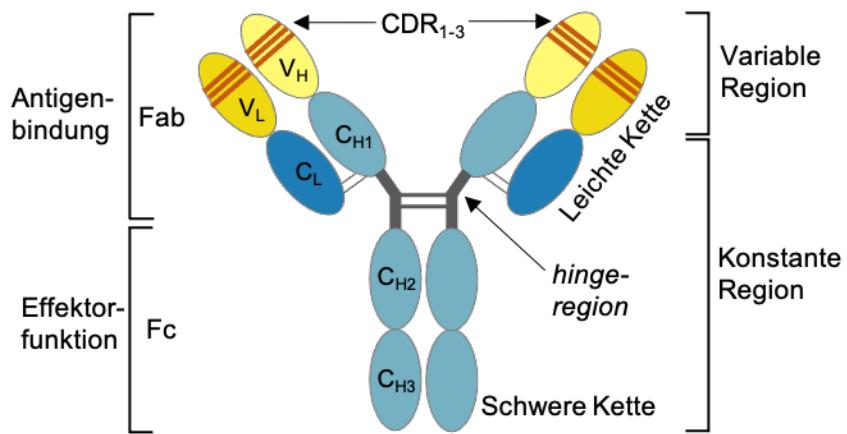
MRT	Magnetresonanztomographie
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
NKG2D-L	NKG2D-Ligand
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PAGE	<i>polyacrylamide gel elektrophoresis</i>
PBA	<i>phosphate buffered saline with albumine</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation</i>
SMM	schwelende Myelom
St	Größenstandard
TACI	<i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related-apoptosis-inducing ligand</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXXM	Tyr-X-X-Met
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
V <sub>H</sub>	<i>variable heavy chain</i>
V <sub>L</sub>	<i>variable light chain</i>
WB	Westernblot
w/v	<i>weight per volume</i>
95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Therapeutische Antikörper in der Onkologie

Die Säulen der onkologischen Therapie werden von operativen Behandlungen, konservativen Verfahren wie der Einsatz von klassischen Chemotherapeutika und der Radiotherapie gebildet. Heute werden diese therapeutischen Herangehensweisen immer präziser. Dieses Ziel hat auch die Immuntherapie, die immer besser an Tumorzellen, das Tumor-Milieu und die genetischen Veränderungen eines Patienten angepasst werden können und so zu einem festen Bestandteil vieler Therapieregime geworden ist. Paul Ehrlich hatte schon Ende des 19. Jahrhunderts die Vision, dass „Zauberkugeln“ – Moleküle, welche zelluläre Zielstrukturen direkt binden – Krankheiten heilen könnten (1). Außerdem entwickelte er, mit der sogenannten Seitenkettentheorie, eine erste Theorie über die Entstehung von Antikörpern (2). Mit diesen Ideen schuf Ehrlich die Grundlagen für die Entwicklung therapeutischer Antikörper. Die Antikörperstruktur wurde 1969 mit der ersten vollständigen Sequenzierung von Immunglobulin (Ig) G (3) und der Entdeckung der IgG-Peptidstruktur komplettiert (4). Heute unterteilt man Antikörper in 5 Isotypen: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Strukturen und Funktionen. Die Immunglobuline der Klasse G stellen den zahlenmäßig größten Anteil (5). Bei der Entwicklung therapeutischer Antikörper wird meist die Struktur des IgG-Isotyps verwendet (vgl. Abbildung 1).

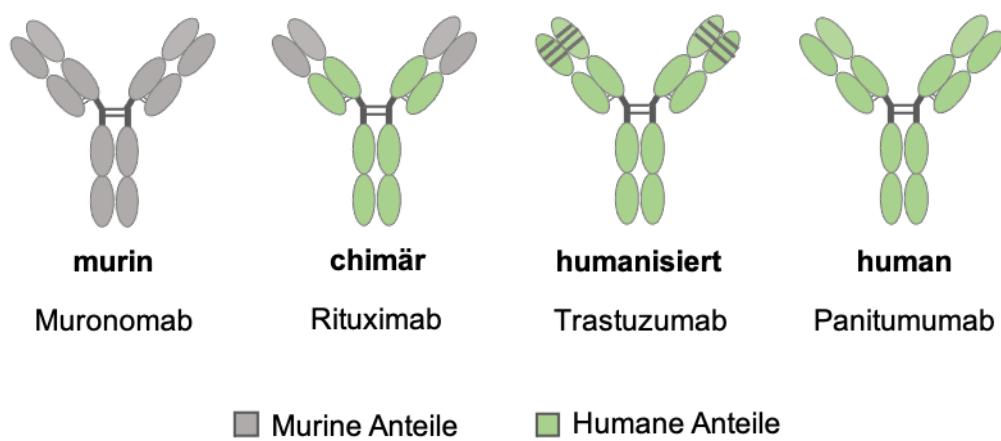


**Abbildung 1** Struktur eines IgG-Antikörpers

Die Ypsilon-Form des Antikörpers setzt sich aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten zusammen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die variablen Regionen beider Ketten, inklusive  $C_{H1}$  und  $C_L$ , bilden zusammen das Fab-Fragment. Dieses bindet spezifisch Antigene und bestimmt die Antigenspezifität. Die Bindung erfolgt nicht-kovalent an den CDR<sub>1-3</sub>.  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ , bilden den Fc-Teil, welcher Effektormechanismen aktiviert. Fab-Fragment und Fc Region sind über die hinge-region verbunden. Diese erlaubt die flexible Bindung von Antigenen unterschiedlicher Entfernung. CDR: *complementarity determining regions*;  $C_H$ : *constant heavy chain*;  $C_L$ : *constant light chain*;  $V_H$ : *variable region heavy chain*;  $V_L$ : *variable region light chain*; Fab: *fragment antigen binding*; Fc: *fragment crystallisable*. Abgewandelt nach (5).

Die von Köhler und Milstein, im Jahr 1975 entwickelte Hybridom-Technik ermöglichte erstmals die *in vitro* Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper (6). Der erste therapeutisch zugelassene, monoklonale Antikörper Muromonab wurde mit dieser Methode als komplett muriner CD3-Antikörper (CD, *cluster of differentiation*) produziert (7). Muromonab wurde in der Transplantationsmedizin zur Minimierung der Abstoßungsreaktion eingesetzt. Die Studien von Schroff und Shawler zeigten jedoch, dass diese Antikörper durch Human-Anti-Maus-Antikörper teilweise neutralisiert wurden und es bei wiederholten Gaben zum Wirkungsverlust kam (8,9). Im Laufe der Entwicklung gelang es den murinen Anteil der monoklonalen Antikörper weiter zu minimieren (vgl. Abbildung 2) und damit auch die immunogene Reaktion zu mindern. Zunächst wurden monoklonale Antikörper chimerisiert, sodass nur der variable Teil des Antikörpers murinen Ursprungs war und mit dem humanen konstanten Teil fusioniert wurde (10,11). Ein Beispiel dafür ist der chimäre CD20-Antikörper Rituximab, welcher 1998 erstmals von der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen wurde und bis heute für die Therapie von B-Zell-Neoplasien eingesetzt

wird (12,13). Zur weiteren Optimierung erfolgte die Humanisierung von Antikörpern. Dazu wurden allein die CDR aus einem spezifisch murinen Antikörper isoliert und in einen humanen Antikörper eingesetzt (14). Das seit dem Jahr 2000 zur Therapie des HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)-positiven Mammakarzinoms eingesetzte Trastuzumab zeigt mit dem verbesserten Gesamtüberleben den bis heute andauernden Erfolg des humanisierten Antikörpers (15). Im Jahr 2006 wurde von der *US Food and Drug Administration* (FDA) erstmals der komplett humane Anti-*epidermal-growth-factor-receptor* (-EGFR) Antikörper Panitumumab, zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms, zugelassen (16). Die Entwicklung dieses Antikörpers wurde durch den Einsatz von transgenen, immunisierten Mäusen möglich (17). Humane Antikörper können außerdem mittels *Phage Display* und der Verwendung von humanen Antikörperbibliotheken hergestellt werden (18,19).



**Abbildung 2** Humanisierung monoklonaler Antikörper

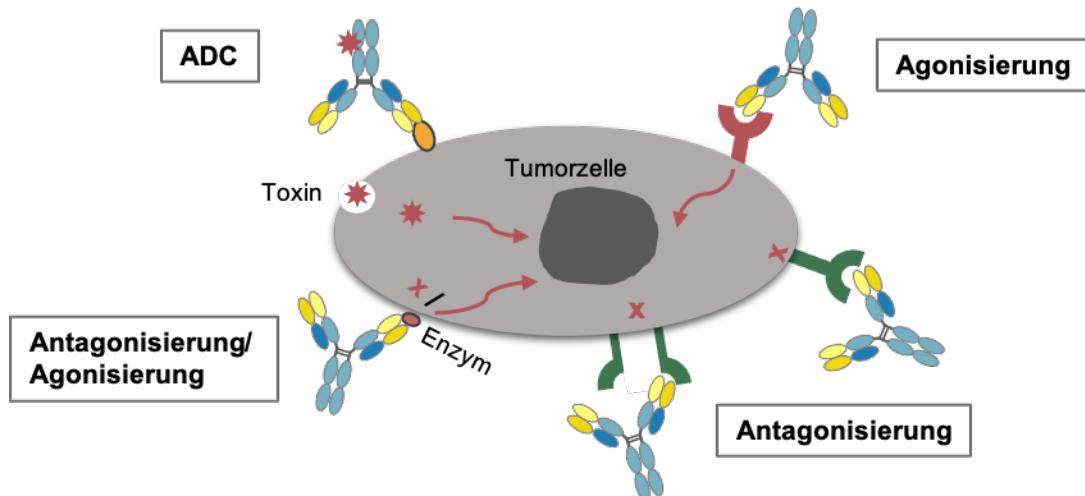
Murine Anteile sind grau, humane Anteile sind grün dargestellt. Beispielhaft sind unter jedem Format die ersten therapeutisch zugelassenen Antikörper beschriftet. Die Formate sind von links nach rechts, als zeitliche Fortschritte zu betrachten. Dabei stellt der humane Antikörper das neueste Format dar. Abgewandelt nach (107).

Ein weiterer Meilenstein der onkologischen Immuntherapie stellt die Entwicklung der *chimeric-antigen-receptor* (CAR) T-Zellen dar. Dafür werden dem Patienten in einem ersten Schritt T-Zellen entnommen. *Ex vivo* wird diesen Zellen der CAR mittels viralen Vektoren transduziert, sodass die T-Zellen den antigenbindenden Rezeptor exprimieren können. In den Patienten reimplantiert, werden CAR-T-Zellen nach Antigenbindung über die intrazelluläre Signalsequenz CD3-zeta aktiviert und können gezielt, ohne vorangegangene Rezeptoraktivierung, Zielzellen binden und lysieren.

Die erste Therapie dieser Art zielte, mit dem CAR-CD19, bestehend aus einem sogenannten *single-chain-fragment-variable-* (scFv-) Fragment eines Antikörpers, auf Neoplasien der B-Zellreihe (20). Zur Therapie des Multiplen Myeloms werden BCMA-gerichtete CAR T-Zellen (Idecabtagen Vicleucel) eingesetzt (21). Allein im Jahr 2021 wurde die Zulassung von fünf therapeutischen Antikörpern erwartet und 44 weitere befanden sich in fortgeschrittenen Studienphasen (22). Die Erfolgsgeschichte der onkologischen Immuntherapie rückt die Idee der *magic bullets* von Paul Ehrlich in den Bereich des Möglichen und spricht für das Potential und die Notwendigkeit Immuntherapien in der Onkologie weiterzuentwickeln.

### 1.1.1 Wirkmechanismen von Antikörpern

Therapeutische Antikörper können, abhängig von der Art der Bindung des Fab-Fragments, auf verschiedenen Wegen direkt oder indirekt an der Zielzelle wirken. Die direkten Wirkmechanismen sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

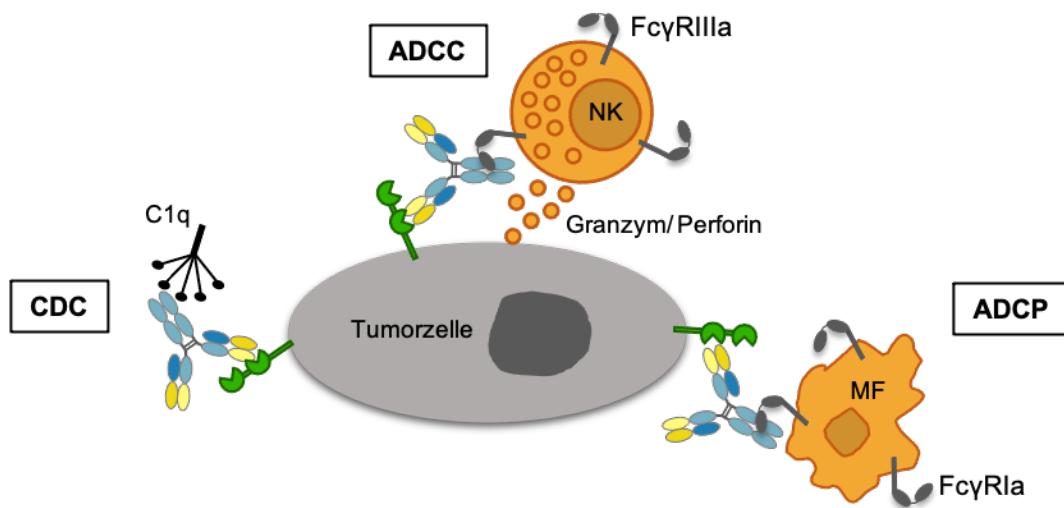


**Abbildung 3** Direkte Fab-vermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Abhängig von der Art der Zielstruktur oder des Enzyms kann die Wirkung des Antikörpers auf den nachfolgenden Signalweg agonisierend (Apoptose-Signalwege) oder antagonisierend (Hemmung von Signalwegen, welche für das Überleben oder das Wachstum der Zelle wichtig sind) sein. Durch ADC kann eine giftige Substanz über Endozytose intrazellulär toxisch wirken. ADC: *antibody drug conjugate*. Abgewandelt nach (22,23).

Die Antikörperbindung an Rezeptoren der Tumorzelle kann die Dimerisierung des Rezeptors oder die Bindung des natürlichen Liganden verhindern. So können

Aktivierungskaskaden inhibiert oder agonistisch, apoptotische Signalkaskaden ausgelöst werden (23). Andere Antikörper können direkt über die Bindung an Enzymen der Zelloberfläche wirken, um ebenfalls aktivierende Signale zu inhibieren oder Apoptose zu induzieren (24). Eine weitere Möglichkeit stellen *antibody-drug-conjugates* (ADC) dar. Dabei wird dem Antikörper ein zytotoxisches Molekül angehängt, welches durch die Antigen-Antikörper-Bindung in die räumliche Nähe der Tumorzelle gebracht wird und zum Beispiel mittels Endozytose intrazellulär toxisch wirken kann (23). Das Fc-Fragment kann dagegen an Rezeptoren auf Effektorzellen binden und so Effektorfunktionen vermitteln. Diese Fc-vermittelten Mechanismen sind in Abbildung 4 schematisch zusammengefasst. Kommt es zur Antikörperkomplexbildung durch die Bindung mehrerer Antikörper an einer Zelle, so kann zum Beispiel über die Bindung von C1q an Fc-Fragmenten die *complement-dependent-cytotoxicity* (CDC) aktiviert werden. Die Komplementkaskade wird dabei in der Regel über den klassischen Weg ausgelöst, führt zur Bildung des *membrane attack complex* (MAC) und damit zur Zelllyse (25).



**Abbildung 4** Fc-vermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Verschiedene Zellen des Immunsystems können über Fc<sub>y</sub>R den Fc-Teil eines Antikörpers binden und damit die Lyse der Tumorzelle auslösen. ADCC wird hauptsächlich durch NK-Zellen vermittelt, ADCP durch Makrophagen. Durch die Bindung von C1q wird die Komplementkaskade ausgelöst, die letztlich auch zur Zelllyse führt. ADCC: *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*; ADCP: *antibody-dependent cellular phagocytosis*; CDC: *complement-dependent-cytotoxicity*; MF: Makrophage. Abgewandelt nach (22,23).

Das Fc-Fragment kann außerdem von Fcγ-Rezeptoren (FcγR) gebunden werden. Der aktivierende FcγRIIIa wird vor allem von natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) exprimiert. Die Bindung einer NK-Zelle initiiert den Mechanismus der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC*) über die Aktivierung des *immunoreceptor tyrosine-based activating motifs* (ITAM). Freiwerdende Granzyme und Perforine können dann die Zelle lysieren (26). Die Zellfragmente der lysierten Zellen können von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting Cells, APC*) aufgenommen werden und so zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Der anti-Tumor-Effekt des Antikörpers könnte damit durch Gedächtnis-T-Zellen über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben (27). Andere aktivierende FcγR werden von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten exprimiert. Die Rekrutierung dieser Zellen kann über die Bindung des Fc-Fragments die ADCC und bzw. oder antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP*) auslösen (28). *In vivo* Studien verschiedener klinischer Antikörper, wie Rituximab oder Trastuzumab zeigen, wie wichtig die FcγR und die Rekrutierung der Effektorzellen für die klinische Wirksamkeit sind (29,30). So konnten die Fc-vermittelten Wirkmechanismen von therapeutischen Antikörpern, zum Beispiel durch Optimierungen am Fc-Fragment und den damit erzielten höheren CDC- und ADCC-Raten verbessert werden (31). Eine neue Klasse von therapeutischen Antikörpern stellen die sog. Immuncheckpoint-Inhibitoren dar. Ein Ansatz ist beispielsweise die Blockade des *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) oder des *programmed cell death protein 1* (PD-1), sodass die Immunantwort durch CTL verbessert wird. Ipilimumab war der erste zugelassene Antikörper, welcher die Hemmung von CTL aufhebt und damit in das immunologische Kontrollsyste eingreift (32,33). Der erfolgreiche klinische Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren oder die Effizienzsteigerung bekannter Wirkmechanismen zeigen, dass neue Konzepte die Verbesserung der onkologischen Therapie ermöglichen.

### 1.1.2 Bispezifische Antikörper

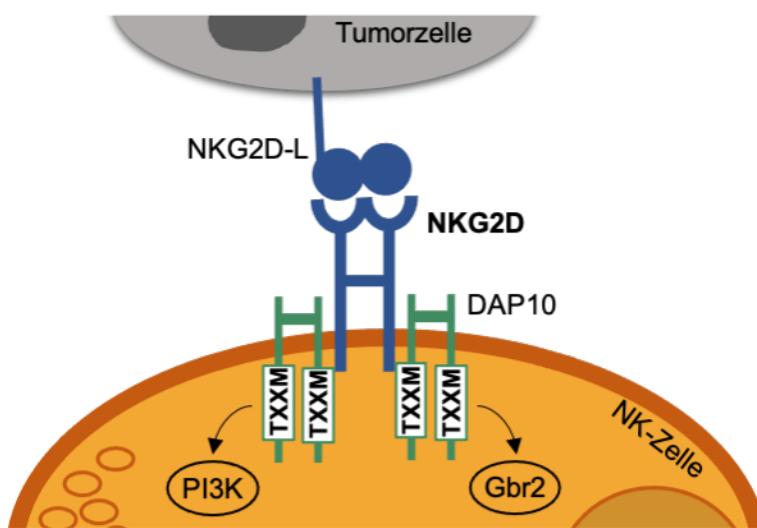
Eine weitere Option die onkologische Immuntherapie weiterzuentwickeln ist die Anpassung und Veränderung der Molekülstruktur monoklonaler Antikörper. Die Konstruktion multivalenter bzw. multispezifischer Antikörper erlaubt die simultane

Bindung mehrerer Zielstrukturen, wodurch zusätzliche Effektorzellen rekrutiert werden können. Es werden IgG-ähnliche Antikörper mit Fc-Fragment und nicht-IgG-ähnliche Antikörperkonstrukte ohne Fc-Fragment unterschieden. IgG-ähnliche Antikörper haben durch das Fc-Fragment den Vorteil je nach Design FcR-vermittelte Effektormechanismen zu aktivieren. Außerdem haben sie, bedingt durch die Größe des Moleküls und den Mechanismus des neonatalen-FcR-vermittelten Recycling-Prozesses, eine längere Halbwertszeit (34). Der nicht-IgG-ähnliche *bispecific T-cell engager* (BiTE) Blinatumomab kann über eine CD3-Bindungsstelle T-Zellen binden, unterscheidet sich jedoch wesentlich im Format (35). So sind allein zwei scFv-Fragmente über einen flexiblen Glycin-Serin-*linker* miteinander verbunden. Die Molekülgröße von nur 55 kDa erlaubt zwar wahrscheinlich eine bessere Gewebegängigkeit, ist aber mit einer stark verkürzten Halbwertszeit verbunden (34). Im klinischen Alltag muss der Antikörper deswegen über eine kontinuierliche Infusion verabreicht werden. Blinatumomab wird zur Therapie der refraktären oder rezidivierenden akuten lymphoblastischen prä-B-Zell Leukämie eingesetzt (36). Auch zur Therapie des Multiplen Myeloms wurde ein bispezifischer Antikörper, welcher T-Zellen binden kann entwickelt. Teclistamab ist ein bispezifischer IgG-ähnlicher Antikörper, welcher über die CD3-Bindungstelle zum einen T-Zellen binden und zum anderen über BCMA an Myelomzellen binden kann (37). Außer diesen klinisch bereits eingesetzten bispezifischen Antikörperformaten, sind zahlreiche andere Formate in der präklinischen oder klinischen Entwicklung. Diese bieten ein weites Feld an Möglichkeiten, wie zum Beispiel auch die Rekrutierung von NK-Zellen.

## 1.2 NKG2D als zytotoxisches Triggermolekül

Der Schutzmechanismus des Immunsystems ist die Überwachung entarteter „eigener“ Zellen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der C-Typ-lectin-ähnliche Immunrezeptor *Natural killer group 2 member D* (NKG2D), welcher von NK-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, γδ T-Zellen und einigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird (38). Die Struktur des Rezeptors wird von einem mit Disulfidbrücken verbundenen Homodimer, bestehend aus je einer extrazellulären und einer transmembranen Domäne gebildet (vgl. Abbildung 5). Die extrazelluläre Domäne dient der Ligandenbindung (39,40). Intrazellulär kann über die transmembrane bzw. intrazelluläre Domäne der Hexamer-Komplex mit insgesamt vier *DNAX activation proteins of 10 kDa* (DAP10)-Molekülen gebildet werden (41). DAP10

ist intrazellulär mit einem Tyr-X-X-Met- (TXXM-) Motif ausgestattet, welches durch Phosphorylierung die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und das Transferprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) aktiviert (42). Die Phosphorylierung wird durch Bindung eines Liganden am Rezeptor ausgelöst. Zu den natürlichen Liganden gehören die *major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related proteins A* (MICA) und B (MICB), sowie die *UL16 binding proteins* (ULBP) 1-6 (38,43).



**Abbildung 5** Schematische Darstellung von NKG2D und DAP10

Das NKG2D-Homodimer bildet mit zwei DAP10 Homodimeren den Hexamer-Komplex. Die Bindung eines Liganden kann die Signalkaskade aktivieren. DAP10: *DNAX activation protein of 10 kD*; Gbr2: *growth factor receptor-bound protein 2*; NKG2D: *Natural killer group 2 member D*; NKG2D-L: NKG2D-Ligand; PI3K: *Phosphatidylinositol 3-Kinase*; TXXM: *Tyr-X-X-Met-Motif*. Abgewandelt nach (42).

Die Liganden werden hauptsächlich stress-induziert, von infizierten oder entarteten Zellen exprimiert (44). Diese markieren diejenigen Zellen, welche mit Hilfe von NKG2D durch NK-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden können (45), sodass NKG2D sowohl eine wichtige Rolle bei viralen Infektionen als auch in der Tumorzell-Überwachung des Immunsystems spielt (46). NKG2D ist dabei auf NK-Zellen ein primärer aktivierender Rezeptor. Die Bindung entsprechender Liganden ermöglicht die Ausbildung einer sogenannten immunologischen Synapse, welche in der Endphase zur Ausschüttung von lytischen Granula, wie Perforin und Granzym, durch die NK-Zelle, führt (47). Die zytotoxische Aktivierung von NK-Zellen durch NKG2D erfolgt daher direkt und ohne vorherige Markierung durch APC. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen wirkt

NKG2D hauptsächlich als costimulatorischer Rezeptor, um die Aktivität des T-Zell-Rezeptors zu verstärken (48). Des Weiteren wird diskutiert, ob NKG2D zur Bildung von Gedächtnis-T-Zellen beiträgt (49,50). Außerdem kann NKG2D auch immunsupprimierend wirken. Ein kleiner Teil gesunder, hämatopoetischer Zellen exprimiert die natürlichen Liganden und wirkt damit je nach Zellart und Situation inhibierend, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern oder aktivierend, um die zytotoxische Immunantwort zu verstärken (51).

### **1.2.1 Immuntherapeutische Nutzung von NKG2D**

Das komplexe Zusammenspiel von NKG2D und den NKG2D-Liganden (NKG2D-L) bietet verschiedene Möglichkeiten diese für Therapien auszunutzen (52). Therapieansätze sind: Stärkung der NKG2D-Liganden-Interaktion, Erhöhung der NKG2D-L Expression oder die Aktivierung und Rekrutierung von Effektorzellen (39). Dazu wurden verschiedene Formate wie Fusionsproteine, monoklonale und bispezifische Antikörper oder auch CAR T- oder NK-Zellen entwickelt (39). Ein Beispiel für die Rekrutierung von NK-Zellen ist das bifunktionale Antikörperderivat ULBP2-BB4 welches gegen CD138 und mit dem natürlichen Liganden ULBP2 gegen NKG2D gerichtet ist (53). Auch Kellner et al. konnten mit den bispezifischen bzw. bifunktionalen Formaten, welche über die extrazelluläre Domäne von MICA bzw. ULBP2 und über einen CD20-scFv gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtet waren, NK-Zellen aktivieren und die Tumorzelllyse verbessern (54). Darauf aufbauend zeigten sich in den Experimenten von Lutz et. al mit dem Bibody [CD20xNKG2D] ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, sodass das Konzept durch Weiterentwicklung auch auf andere Tumorentitäten angewendet werden könnte (55)

## **1.3 Lymphome der B-Zellreihe**

Lymphome gehören zu den Neoplasien des blutbildenden Systems und können ihren Ursprung in den verschiedenen Zellreihen der Lymphozyten haben. B-Zell-Neoplasien entstehen aus Vorläuferzellen oder gereiften B-Zellen und werden nach den Kriterien der WHO eingeteilt. Nach der WHO Klassifikation der Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes werden diese in ihren immunphänotypischen, morphologischen und genetischen, sowie klinischen Eigenschaften unterschieden (56).

### 1.3.1 Multiples Myelom

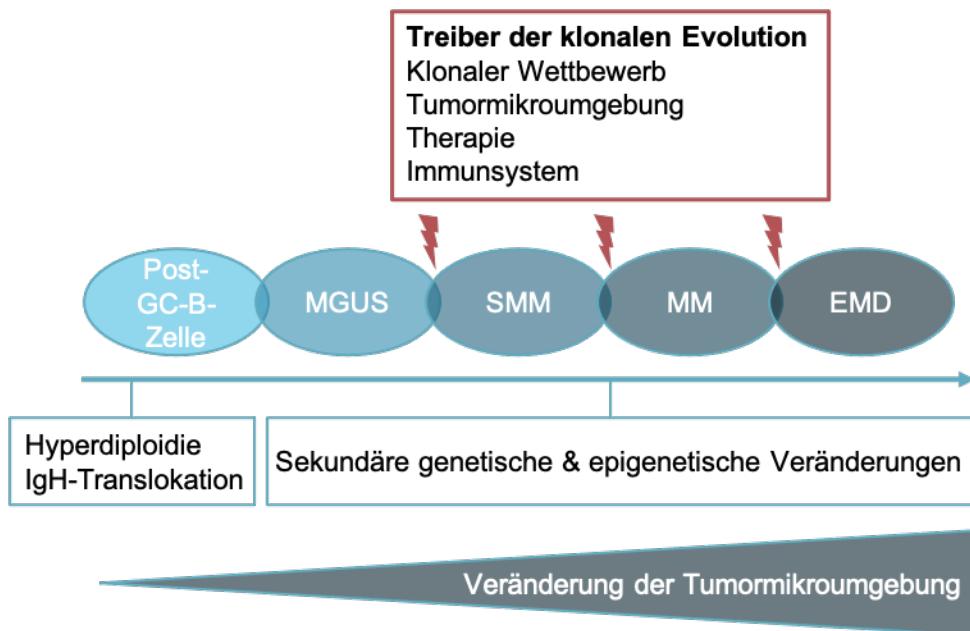
Das Multiple Myelom ist eine bisher noch unheilbare, maligne, hämatologische Erkrankung mit diffuser oder multizentrischer Vermehrung monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark. Jährlich werden in Deutschland ungefähr 3250 Neuerkrankungen diagnostiziert (57). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren bei Männern. Frauen erkranken im Durchschnitt 2 Jahre später (57). Typischerweise zeigt sich, durch eine unkontrollierte Produktion defekter bzw. unvollständiger Immunglobuline, ein deutlich erhöhter Nachweis derselben im Serum oder Urin der Patienten (58). Aufgrund dessen sowie durch die Verdrängung des gesunden Knochenmarks weist das Multiples Myelom meist einen heterogenen und unspezifischen Symptomkomplex auf. Symptome, wie Knochenschmerzen, Müdigkeit und Gewichtsverlust bestehen aus diesem Grund oft bereits über einen längeren Zeitraum, bis es zur Diagnosestellung kommt (57). Die Diagnose des Multiplen Myeloms gilt, beim Vorliegen der in Tabelle 1 dargestellten Kriterien, als gesichert (59).

**Tabelle 1** Diagnosekriterien Multiples Myelom nach der *International Myeloma Working Group* (60)

<b>Multiples Myelom</b>			
<b>Klonale Plasmazellen im Knochenmark <math>\geq 10\%</math></b>			
Mindestens eines der Myelom-definierenden Ereignisse	Endorganschaden (CRAB-Kriterien)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hyperkalzämie</li><li>• Niereninsuffizienz</li><li>• Anämie</li><li>• Knochenläsionen</li></ul>	
	Malignitätskriterien (Biomarker)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Klonale Plasmazellen im Knochenmark <math>\geq 60\%</math></li><li>• Ratio involvierte/ nicht-involvierte freie Leichtketten <math>\geq 100</math></li><li>• <math>&gt; 1</math> fokale Läsion <math>&gt; 5</math> mm im MRT</li></ul>	

Die Erkrankung wird nach WHO-Kriterien den B-Zellneoplasien zugeordnet. Zellen des Multiplen Myeloms haben ihren Ursprung in langlebigen, reifen Plasmazellen, welche im Knochenmark lokalisiert sind und dort proliferieren. In der Regel geht dem Multiplen Myelom die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) voraus. Diese kann sich im Verlauf in das schwelende Myelom (SMM) entwickeln. Beide Vorstufen haben ein jährliches Risiko von 1 % (MGUS) bzw. 10 % (SMM) in das Multiple Myelom überzugehen (61,62). Die Pathogenese des Fortschritts der MGUS über die SMM zu

MM hat ihre Ursprünge in Mutationen, welche bereits im Keimzentrum der Lymphknoten stattfinden (vgl. Abbildung 6). Während der Reifung der B-Zellen werden somatischen Hypermutationen und die Rekombination des Klassenwechsels (*class switch recombination*) über Doppelstrang-DNA-Brüche erreicht (63). Dabei kann es als sogenanntes initiiierendes Ereignis, zu (*immunoglobuline heavy chain locus* (IgH-) Translokationen oder Hyperdiploidie kommen (64,65). Pathogenetische Modelle gehen davon aus, dass es durch Überlebensvorteile desjenigen Klons mit den entsprechenden sekundären genetischen und epigenetischen Veränderungen, zur immortalisierten Plasmazelle und damit letztendlich zur Entstehung des Multiplen Myeloms kommt (64) (vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 6** Pathogenetisches Modell der Entwicklung des Multiplen Myeloms

Die klonale Evolution der entarteten Plasmazellen erlaubt die Entwicklung vom MGUS zur EMD. EMD: *extramedullary disease*; GC: *germinal center*; MM: *multiples Myelom*; MGUS: *monoclonal gammopathy of unknown significance*; SMM: *smoldering multiple myeloma*. Abgewandelt nach (126).

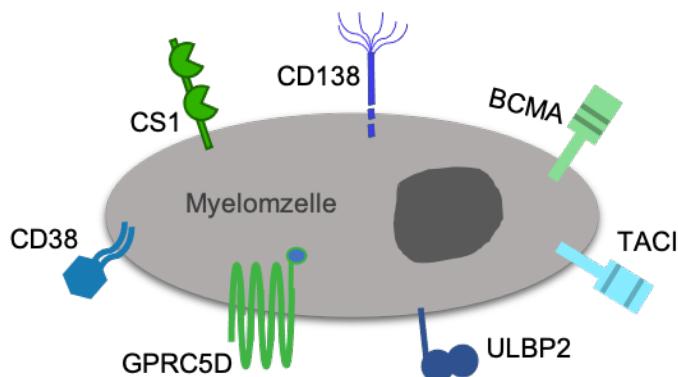
Des Weiteren ist zum Überleben der malignen Plasmazelle im Knochenmark das Zusammenspiel der tumorumgebenden Zellen wichtig. So finden auf molekularer Ebene positive Rückkopplungseffekte zwischen Stromazellen, Osteoblasten, -klasten und versorgenden Gefäßen statt (64). Diese beeinflussen die gesunde Hämatopoiese, verändern den Knochenstoffwechsel, aktivieren die Angiogenese und können Therapieresistenzmechanismen erwirken (66,67). Die weitere genetische Evolution

der malignen Zellen kann die Migration der Zellen in die Blutstrombahn und damit die Entwicklung zur Plasmazellleukämie oder der extramedullären Erkrankung (EMD) ermöglichen (64,68). Die Heterogenität der Entstehungsmechanismen zeigt die Hürden der Therapie des Multiplen Myeloms und macht die Notwendigkeit neuer Therapieansätze deutlich. Aktuell wird nur das Multiple Myelom, nicht aber die Vorstufen MGUS bzw. SMM behandelt. Die Indikation einer Therapie ist durch die CRAB-Kriterien (vgl. Tabelle 1) gegeben und richtet sich nach dem biologischen Alter sowie der Komorbiditäten (57). Demnach erfolgt zur Erstlinientherapie entweder zuerst eine intensivierte Hochdosischemotherapie und darauffolgend eine autologe Stammzelltransplantation oder verschiedene Kombinationstherapien (57). Allgemein stehen zur medikamentösen Therapie Immunmodulatoren (wie Lenalidomid), Proteasom-Inhibitoren (wie Bortezomib), sowie konventionelle Chemotherapeutika (Alkylantien wie, Melphalan) und Glucocorticoide (wie Dexamethason) zur Verfügung (57,69,70). Außerdem sind in Deutschland die monoklonalen Antikörper Daratumumab, Isatuximab und Elotuzumab zur Therapie zugelassen (57). Daratumumab ist ein humaner, monoklonaler IgG Antikörper welcher gegen CD38 (vgl. Abbildung 7), einem Oberflächenmarker auf malignen Plasmazellen, gerichtet ist. Molekularbiologisch wirkt Daratumumab über ein komplexes Set an Wirkmechanismen (71). Therapeutisch zeigt sich in der Kombinationstherapie ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben (72). Auch beim humanisierten IgG Antikörper Elotuzumab zeigen sich in klinischen Studien ähnliche Erfolge (73,74). Der CS1-Antikörper wirkt einerseits durch ADCC, anderseits über eine Aktivierung von NK-Zellen (75). Nach der aktuellen Leitlinie werden die beiden monoklonalen Antikörper bei therapierefraktärer und rezidivierender Erkrankung in Kombinationstherapien bzw. Daratumumab auch als Monotherapie eingesetzt (57).

### 1.3.2 Zielstrukturen auf Myelomzellen

Weitere interessante neuartige Immuntherapien ergeben sich durch verschiedene, für Zellen des Multiplen Myeloms typische, Oberflächenantigene (vgl. Abbildung 7). Für die Zielstrukturen ist vor allem entscheidend, dass diese möglichst spezifisch auf malignen Plasmazellen und in ausreichender Menge an der Zelloberfläche exprimiert werden. Unter Beachtung der spezifischen Eigenschaften der Myelomzellen und ihrer Mikroumgebung können so vielversprechende Immuntherapien entwickelt werden.

Das auf Myelomzellen exprimierte *B-cell maturation antigen* (BCMA) ist ein Beispiel dafür, wie eine Zielstruktur für unterschiedliche Therapieformate eingesetzt werden kann. Der BCMA/CD3 BiTE- Antikörper konnte in einer Phase I Studie erste Erfolge verzeichnen (76). Des Weiteren zeigen auch die klinischen Daten zum bispezifischen Antikörper Teclistamab (CD3xBCMA) therapeutische Erfolge (77,78). Auch ein Format der CAR-T-Zell-Therapie für das Multiple Myelom nutzt BCMA als Zielantigen und zeigte in einer klinischen Studie bei 85 % der Studienteilnehmer mindestens eine teilweise objektive Tumorreduktion (79). Die Daten, welche im Rahmen der klinischen Studie KarMMA generiert wurden, führten zur Zulassung von der BCMA-gerichteten CAR-T-Zell Therapie mit Idecabtagene Vicleucel (21,80). Ciltacabtagene autoleucel eine CAR-T-Zell Therapie mit zwei Nanobodies gegen BCMA ist ebenfalls zur Therapie zugelassen (81,82). Gegen die Zielstruktur *G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member D* (GPRC5D) ist der bispezifische Antikörper Talquetamab seit 2023 zugelassen (83,84). Abbildung 7 zeigt weitere Beispiele für Myelom- assoziierte Antigene, welche als potenzielle Zielstrukturen für Immuntherapien dienen können.



**Abbildung 7** Therapeutische Zielstrukturen der Myelomzelle

Beispielhaft sind Oberflächenmoleküle, welche als Zielstrukturen für Immuntherapien dienen bzw. dienen können, dargestellt. BCMA: *b cell maturation antigen*; CS1: CD1 subset 2; GPRC5D: *G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member D*; TACI: *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*; ULBP2: *UL16 binding protein 2*. Abgewandelt nach (127).

### 1.3.2.1 CD138 als Zielstruktur

Syndecan-1 (CD138) stellt eine mögliche Zielstruktur in der Therapie entarteter Plasmazellen dar und gehört zum Typ I der Familie der Syndecan transmembran

Proteoglycane (schematische Darstellung vgl. Abbildung 7). Die extrazelluläre Domäne bindet über Heparan-Sulfat-Ketten, Wachstumsfaktoren oder extrazelluläre Matrix und trägt so zu Zell-Zell-Kontakten bei (85). Die Bindung von Proteinen des Zytoskeletts an der intrazellulären Domäne verleiht der Zelle Stabilität (85). Physiologisch wird CD138 von Epithelzellen und mesenchymalen Zellen exprimiert. Plasmazellen und wenige, unreife B-Zellen sind die einzigen hämatopoetischen Zellen, welche CD138 exprimieren (86,87). Verschiedene Tumorentitäten wie auch das Multiple Myelom exprimieren CD138 besonders stark (88,89). CD138 kann das Wachstum von Myelomzellen als Cofaktor für bestimmte Wachstumsfaktoren positiv verändern und Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen (90,91). Daher wurden bereits verschiedene Immuntherapien, welche CD138 als Zielstruktur nutzen, entwickelt. Ein Beispiel ist der bispezifische Antikörper ULBP2-BB4 (53) (vgl. Kapitel 1.2.1). Außerdem befinden sich eine CD138 CAR-T-Zell Therapie sowie der konjugierte Antikörper Indatuximab-Ravtansine (BT062) in der Entwicklung (92–94). Zusammenfassend kann CD138 als geeignete Zielstruktur betrachtet werden- da es zwar von verschiedenen Geweben exprimiert wird, jedoch speziell auf Myelomzellen verstärkt exprimiert wird und sich außerdem in verschiedenen Modellen bereits als vielversprechende Zielstruktur bewiesen hat.

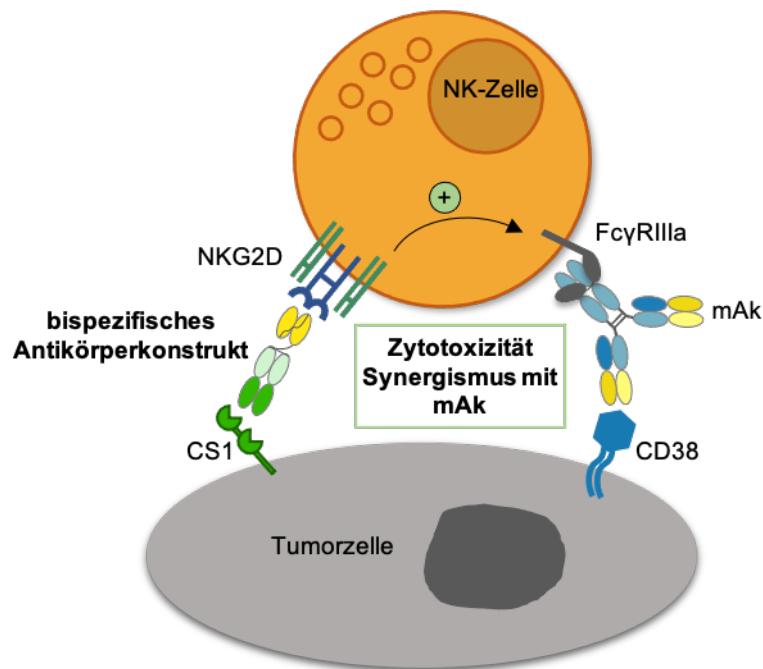
### 1.3.2.2 CS1 als Zielstruktur

CD1 subset 2 (CS1) gehört zur *signaling lymphocytic activation* (SLAM) Familie und wird auch CRACC, SLAMF7 oder CD319 genannt (schematische Darstellung vgl. Abbildung 7). Der Rezeptor kann intrazellulär über *tyrosine-based motifs* und das Adaptermolekül *EWS-Fli1-activated transcript-2* (EAT2) phosphoryliert und aktiviert werden (95). Extrazellulär hat CS1 eine Ig-ähnliche V- und C<sub>2</sub>-Bindungsregion (95). CS1 ist sein eigener Ligand und wird ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen, wie NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (96). So kann CS1 NK-Zellen regulieren und zytotoxisch aktivieren (97). Die einzigen malignen Zellen, welche CS1 überexprimieren sind Zellen des Multiplen Myeloms (98). Im Mikromillieu der Myelomzellen spielt CS1 wahrscheinlich eine Rolle bei der Interaktion mit Stromazellen und wirkt sich damit positiv auf das Zellwachstum aus (98). Als geeignete Zielstruktur hat sich CS1 bereits mit klinisch etablierten, humanisierten Antikörper Elotuzumab bewiesen (vgl. Kapitel 1.3.1,(74,99)). Die Erfolge der Therapie mit Elotuzumab führten zur Entwicklung neuer Immuntherapieformate. So wurden beispielsweise bispezifische

CS1-BCMA-CAR-T-Zellen und CS1-CAR-NK-Zellen entwickelt, welche erste präklinische und klinische Erfolge zeigen (100–102).

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die auf die maligne Entartung von Plasmazellen zurückzuführen ist. Trotz vielfältiger Therapiestrategien, wie Stammzelltransplantation, Chemotherapie und Antikörpertherapie, ist das Multiple Myelom, Stand heute, eine unheilbare Erkrankung. Aus diesem Grund stellen neue Kombinationen mit bereits etablierten Therapien und neuartigen bispezifischen Antikörperformaten vielversprechende Therapieansätze dar. Auf Grundlage von eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe soll in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, ob das NK-Zell Triggermolekül NKG2D in bispezifischen Antikörperformaten für die Therapie des Multiplen Myeloms genutzt werden könnte und ob eine Kombination mit dem bereits zugelassenen monoklonalen Antikörper Daratumumab zusätzliche Effekte erzielt. Hierzu wurden bispezifische Antikörperkonstrukte generiert, welche spezifisch über ein Fab-Fragment an die Zielantigene CS1 bzw. CD138 auf Myelomzellen bindet und gleichzeitig in räumlicher Nähe NKG2D-exprimierende Effektorzellen, wie NK-Zellen aktiviert. Die biochemische und funktionelle Charakterisierung sowie der Vergleich der bispezifischen Konstrukte sollte in der folgenden Zusammenschau die Einschätzung dieses potenziellen Therapieansatzes ermöglichen.



**Abbildung 8** Funktionen des bispezifischen Antikörperkonstrukt

Das bispezifische Antikörperkonstrukt soll spezifisch Zielantigene auf der Tumorzelle und NKG2D binden und Immunzellen aktivieren. Dadurch und gegebenenfalls durch den simultanen Einsatz eines mAk soll die Zytotoxizität gesteigert werden. Durch die Aktivierung von Immunzellen wäre außerdem eine Zytokinfreisetzung denkbar. mAK: monoklonaler Antikörper.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die Auflistungen der verwendeten Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien findet sich im Anhang (Tabelle 13, Tabelle 14 und Tabelle 16).

**Tabelle 2** Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Substanz	Konzentration
TRIS Puffer (pH 10)	TRIS	1 M
50x TAE- Puffer (pH 7,4)	TRIS-Acetat	0,2 M
	EDTA	10 nM
Agarosegel 1 %	1x TAE-Puffer	
	Agarose	1 %
Coomassie-Färbelösung	H <sub>2</sub> O	60 ml
	Methanol	20 ml
	5× Roti-Blue	20 ml
Glycin Elutionpuffer (pH 3)	Glycin	0,1 M
2x HBS-Puffer (pH 7,05)	HEPES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
5x Ladepuffer (nicht reduzierend)	TRIS	313 mM
	SDS	10 % (m/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (m/v)
5x Ladepuffer (reduzierend)	TRIS	313 mM
	SDS	10 % (m/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	DTT	0,5 M
	Bromphenolblau	0,05 % (m/v)
PBA-Puffer (FACS)	1× PBS	
	BSA	1 % (m/v)
	Natriumazid	0,01 % (m/v)
SDS-PAGE-Laufpuffer	TRIS	25 mM
	SDS	0,01 %
	Glycin	200 mM
SDS-Bis-Tris-Polyacrylamidgel	Acrylamid-Bisacrylamidgemisch	13,4 % (v/v)

Sammelgel (10 %)	Sammelgelpuffer (pH 6,8)	28 % (v/v)
	SDS (10 % (w/v))	1 % (v/v)
	APS (10 % (w/v))	1 % (v/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
SDS-Bis-Tris-Polyacrylamidgel	Acrylamid-Bisacrylamidgemisch	33,3 % (v/v)
Trenngel (10 %)	Trenngelpuffer (pH 8)	28 % (v/v)
	SDS (10 % (w/v))	1 % (v/v)
	APS (10 % (w/v))	1 % (v/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
TBS-Puffer	TRIS	50 mM
	NaCl	500 mM
TBS-T-Puffer	TBS	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
	Triton-X-100	0,2 % (v/v)
Trenngelpuffer (pH 8,0)	TRIS	1,5 M
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	TRIS	0,5 M
2x YT- Medium	2x YT	3,1 % (m/v)
2x YT- Kulturplatten	2x YT	3,1 % (m/v)
	Agar	1,8 % (m/v)
	Antibiotikum	1:1000
WB Transferpuffer	TRIS	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween	0,1 %

**Tabelle 3** Expressionsvektoren

<b>Vektor</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz</b>
pSec-Tag2-HygroC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pSec-CD138-BB4 Lc	AG Peipp (unveröffentlicht)
plres-Rituximab-bi	AG Peipp (unveröffentlicht)
plres-Rituximab-Fd-NKG2D#32	Lutz (unveröffentlicht)
plres-HC-4D5-NKG2D#3	Lutz (unveröffentlicht)
pEx-A2-Huluc66 VH	AG Peipp (unveröffentlicht)
pEx-A2-Huluc63 VL	AG Peipp (unveröffentlicht)
GFP-Plasmid	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

**Tabelle 4** Organismen

Bakterienstamm	Hersteller, Hauptsitz
<i>E. coli</i> One Shot Top10	Invitrogen, Carlsbad, USA
One Shot Mach1-T1 chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Elektrokompetente <i>E. coli</i> XL-1 Blue	laboreigene Herstellung

**Tabelle 5** Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller, Hauptsitz
Nhe I	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
Pme I	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
PpuM I	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
Sfi I	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase	T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	Roche, Basel, CH

**Tabelle 6** Oligonukleotide (*Primer*)

Bezeichnung	Sequenz	Tm °C	Orientierung
pSEC-CMV	GGTAGGCGTGTACGGTGGAGG	67,5	forward
pSEC-CH1	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56,0	forward
pSEC-REV	CCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG	71,0	reverse

**Tabelle 7** DNA- und Proteingrößenstandard

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
100 bp-DNA Ladder	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.1 Antikörper

**Tabelle 8** Antikörper für Immunoblots

Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Antikörperlösung	Hersteller, Hauptsitz
Monoclonal Anti- <i>Human-Kappa</i> <i>Light Chain</i>	Kappa-leichte- Kette	IgG	Antikörperverhältnis 1:10000 1x TBS 0,1 % Tween 5 % <i>Blotting Grade</i> <i>Blocker</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mouse- $\alpha$ -HIS (PentaHIS)	Polyhistidin-Tag	IgG1	Antikörperverhältnis 1:1000 1x TBS 3 % BSA	Qiagen, Hilden
Goat- $\alpha$ -Mouse HRP-gekoppelt	Leichte und schwere Kette Immunglobuline	IgG	Antikörperverhältnis 1:5000 1x TBS 10 % <i>Blotting Grade</i> <i>Blocker</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 9** Antikörper für Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Hersteller
Anti- <i>human</i> -kappa FITC	Kappa Leichte Kette	IgG	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Anti- <i>human</i> -Fc-gamma FITC	Fc-Teil humaner Ig	IgG	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Ely, UK
CD138 PE	CD138	IgG	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Elotuzumab mAb	CS1	IgG1	BMS, New York, USA
Isotypkontrolle FITC	--	IgG1	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Isotypkontrolle PE	--	IgG1	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Anti- <i>human</i> -NKG2D-Fc- Antikörper	CD314 (NKG2D)	IgG	S. Lutz (unveröffentlicht)
Anti- <i>human</i> -NKp30-Fc- Antikörper	CD337 (NKp30)	IgG	S. Lutz (unveröffentlicht)

**Tabelle 10** Antikörper für ADCC

Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Hersteller
Daratumumab	CD38	IgG1	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Elotuzumab	CS1	IgG1	BMS, New York, USA
Trastuzumab (Herceptin)	HER2	IgG1	Roche, Basel, CH

## 2.1.2 Zellkultur

**Tabelle 11** Zellkulturmiedien

Material	Substanz	Konzentration
CHO-Kulturmedium	CD CHO Medium (1x)	
	GlutaMax	1 % (v/v)
	HAT-Supplement	1 % (v/v)
CHO-Opti-Kulturmedium	CD OptiCHO	1 % (v/v)
	Pluronic F68	1 % (v/v)
	GlutaMax	1 % (v/v)
	HT-Supplement	1 % (v/v)
D10 <sup>+</sup> Medium	DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	
	FCS	10 % (v/v)
	PenStrep	1 % (v/v)
MaxCyte Feed-Stock	CHO CD EfficientFeed A	
	Yeaststolate Stock Solution	14 % (v/v)
	GlutaMAX	3,5 % (v/v)
	Glucose	12,4 % (v/v)
McCoys Medium	McCoy´s 5A ( <i>modified</i> ) Medium	
	FCS	10 % (v/v)
	PenStrep	1 % (v/v)
R10 <sup>+</sup> Medium	RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX	
	FCS	10 % (v/v)
	PenStrep	1 % (v/v)

**Tabelle 12** Zelllinien

Bezeichnung	Medium	Zelltyp
CHO-S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	CHO-Kulturmedium	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHO-K1 (DSMZ no.: ACC 110)	D10 <sup>+</sup> Medium	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHO-CD138 (Krohn et al. 2022)	D10 <sup>+</sup> Medium	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHO-CS1 (Krohn et al. 2022)	D10 <sup>+</sup> Medium	<i>Chinese hamster ovary</i>
Lenti-X 293-T (DSMZ no.: ACC 635)	D10 <sup>+</sup> Medium	Humane embryonale Nierenzelllinie
L-363 (DSMZ no.: ACC 49)	D10 <sup>+</sup> Medium	humane Plasmazellleukämie-Zelllinie
MM1.S (DSMZ no.: ACC 758)	R10 <sup>+</sup> Medium	humane Plasmazellleukämie-Zelllinie
SK-BR-3 (DSMZ no.: ACC 736)	McCoy's Medium	Mammakarzinom-Zelllinie
SKOV-3 (ATCC <sup>®</sup> HTB-77 <sup>™</sup> )	D10 <sup>+</sup> Medium	Ovarialkarzinom-Zelllinie

## 2.2 Klonierung der Antikörperderivate

### 2.2.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

Die enzymatische Spaltung mit Restriktionsnukleasen ermöglichte das Einsetzen von DNA-Fragmenten in einen Vektor. Dafür wurden jeweils 20 Einheiten der Restriktionsenzyme (vgl. Tabelle 5) mit dem geeigneten Puffer zur Plasmid-DNA pipettiert. Es wurden 2 µg der Vektor-DNA und 6 µg der Insert-tragenden Vektor-DNA eingesetzt. Für ein Gesamtvolumen von 30 µl wurde das entsprechende Volumen an *Aqua dest.* hinzugefügt. Die Proben wurden dann bei 37 °C für 3 Stunden bzw. bei 50 °C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden mit 10 µl Mineralöl bedeckt, um ein Verdunsten zu vermeiden, wenn die Inkubation über Nacht erfolgte.

## 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Fragmente, nach ihrer Größe aufzutrennen. Die erwartete Größe der DNA-Fragmente wurde anhand des Größenstandards geprüft. Dazu wurden dem Restriktionsansatz (vgl. Kapitel 2.2.1) 6 µl 6x DNA-Ladepuffer (Carl Roth) hinzugefügt. Die Gelelektrophorese wurde im 1 % Agarosegel (vgl. Tabelle 2) und 1x TAE-Puffer bei 120 V für 45 Minuten durchgeführt. Als Größenstandard wurde der 100 bp-DNA *Ladder* (Carl Roth) genutzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese für 30 Minuten im Ethidium-Bromid-Bad gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des UV-Transluminators visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Dokumentation der Gele erfolgte in der Gel-Dokumentationskammer E.A.S.Y 440K (HeroLab)

## 2.2.3 DNA-Extrahierung und -Quantifizierung

Die Extraktion der DNA aus den Agarose-Gelstücken erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Im letzten Schritt wurde die extrahierte DNA in 30 µl sterilem Wasser eluiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden mittels Absorptionsspektroskopie (BioPhotometer der Firma Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Reinheit wurde über den Quotient  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt. Für eine reine DNA-Probe gilt der Wert 1,8.

## 2.2.4 Ligation

Für die Ligation der enzymatisch geschnittenen DNA-Fragmenten wurden 7 µl Vektor-DNA mit der 10 µl Insert-DNA, sowie 5 Einheiten T4 DNA-Ligase (1 µl) und dem T4 DNA-Ligase Puffer (2 µl des 10x Puffers) angesetzt. Die Probe hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und inkubierte über Nacht bei 4 °C.

## 2.2.5 Chemische Transformation

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien sollte die Membran für DNA permeabel sein. Dies wurde mittels Hitzeschock von chemisch kompetenten *E. coli One Shot Top10* Bakterien erreicht. Dazu wurden 4,5 µl des

Ligationsansatzes (vgl. Kapitel 2.2.4) mit den aufgetauten Bakterien vereint. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock im 42 °C-warmen Wasserbad für genau 30 Sekunden. Danach wurde die Probe für 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 250 µl SOC-Medium vermengt. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Probe für 60 Minuten im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm. Zum Schluss wurden je 10 µl, 50 µl, 100 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmten 2YT-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.2.6 Elektrische Transformation / Elektroporation

Die elektrische Transformation diente ebenfalls der Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien. Die erhöhte Membranpermeabilisierung wurde dafür mittels eines elektrischen Feldes erreicht. Dafür wurden die aufgetauten elektrokompetenten *E. coli* XL-1 Blue mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt. Die Bakteriensuspension inkubierte 2 Minuten auf Eis und wurde dann in die vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde im MicroPulser (BioRad) mit 1,8 kV (Ec1) durchgeführt. Direkt danach wurden 950 µl SOC-Medium zur Bakteriensuspension pipettiert. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C im Schüttler. Zum Schluss wurden 10 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmte 2YT-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Von den über Nacht gewachsenen Kolonien auf den 2YT- Ampicillin-Agarplatten wurden Einzelkolonien gepickt, welche jeweils mit 3 ml 2YT Nährmedium, und im Verhältnis 1:1000 Ampicillin angesetzt wurden. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Von diesen Kulturen wurde jeweils 2 ml abgenommen und für 30 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid Kit* (Machery-Nagel) die Plasmid-DNA extrahiert und in 50 µl sterilem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bei 280 nm und 260 nm bestimmt. Bevor die neuen DNA-Fragmente amplifiziert wurden, wurde eine Kontroll-Restriktion zur Überprüfung der korrekten Ligation notwendig. Bei korrekter Ligation und Transformation entstanden DNA-Fragmente welche dieselbe Größe, wie die Vektor- bzw. Insert-DNA aufwiesen. Dies wurde mit Hilfe der Agarose-

Gelelektrophorese visualisiert. Falls die DNA-Fragmente die erwarteten Längen zeigten, konnte die entsprechende Bakterienkultur weiter mit 250 ml 2YT- Medium und Ampicillin im Verhältnis 1:1000 angesetzt werden und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm schüttelnd inkubiert werden. Aus diesen Kulturen wurden, nach der Anleitung des Herstellers, entweder mit dem *NucleoBond Xtra Maxi-Kit* (Macherey-Nagel) oder endotoxinfrei mit dem *NucleoBond PC EF Kit* (Macherey-Nagey) die Plasmide isoliert. Konzentration und Reinheit wurden mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt.

### 2.2.8 Sequenzierung

Abschließend wurden die Expressionsvektoren zur Sequenzierung in das Zentrum für Molekulare Biowissenschaften der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gegeben, um Richtigkeit und Vollständigkeit der, für die Antikörper kodierenden, DNA zu bestätigen. Hierfür wurden jeweils 3 µl der Vektor-DNA mit einer Konzentration von 100 ng/µl mit je 1 µl der *Primer* vermischt. Es wurden die *Primer* (Vgl. Tabelle 6) *pSec-CMV (forward)*, *-CH1 (forward)* und *-Reverse* genutzt.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Allgemeines Vorgehen für die Kultivierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> kultiviert und zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Materialien wurden die Zellen mit entsprechendem Medium (Vgl. Tabelle 11) passagiert. Adhären wachsende Zellen wurden dafür vor dem Ablösen mit 1x PBS gewaschen und mit Hilfe von Accutase abgelöst. In Suspension wachsende Zellen und semi-adhären wachsende Zellen wurden direkt in der empfohlenen Zellzahl in frische Zellkulturflaschen überführt.

### 2.3.2 Proteinexpression durch Calciumphosphat-Transfektion in Lenti-X 293-T Zellen

Um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen wurde die Calciumphosphat-Transfektion genutzt. Die durch diese Methode ausfallenden Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate werden mittels Endozytose von *Lenti-X 293-T* Zellen aufgenommen. Dafür

wurden am Vortag  $3 \times 10^6$  *Lenti-X 293-T* pro Kulturschale ( $45 \text{ cm}^2$ ) ausgesät. Die Kultivierung über Nacht erfolgte, bei  $37^\circ\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank. Vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit Zugabe von 8 ml neuem D10<sup>+</sup> Medium durchgeführt. Pro Platte wurde ein Transfektionsansatz mit 20 µg DNA-Gesamtmenge, 125 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,5 mM Chloroquin, ad 1 ml sterilem Wasser verwendet. Die DNA-Gesamtmenge setzte sich aus 10 µg DNA der schweren Kette und 10 µg DNA der leichten Kette des jeweiligen Antikörperkonstrukts zusammen. Das Gemisch des Transfektionsansatzes wurde im Verhältnis 1:2 in den 2x HBS-Puffer getropft, während mit einer Pipettierhilfe über die Pipettenspitze Luft in den 2x HBS-Puffer insuffliert wurde. So konnten die Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate ausfallen. Von dieser Suspension wurden dann langsam je 2 ml pro Platte auf die Zellen getropft. Die Zellen inkubierten für 8 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank. Es wurde erneut ein Medienwechsel durchgeführt mit anschließender Inkubation über 40 Stunden unter den zuvor genannten Bedingungen. Die Überstände, welche die sekretierten Antikörperkonstrukte enthielten, wurden ab dann alle 24 Stunden gesammelt und frisches D10<sup>+</sup> Medium (8-10 ml) auf die Platten gegeben. Die Überstände wurden steril filtriert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.3 Proteinexpression durch *large scale* Elektroporation in CHO-S Zellen

Für die Produktion größerer Mengen eines Proteins wurde die Plasmid-DNA mittels Elektroporation in CHO-S Zellen eingebracht. Die benötigten CHO-S Zellen wurden 2 Wochen zuvor aufgetaut und mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in Zellkultur-Kolben im Horizontalschüttler bei 125 rpm,  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Am Tag vor der Transfektion wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Für jedes Antikörperkonstrukt wurden 10 Ansätze mit je  $80 \times 10^6$  Zellen benötigt. Diese wurden auf zehn 50 ml Falcons verteilt und 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde aufgeklopft und mit 4 ml MaxCyte Elektroporationspuffer gewaschen. Derselbe Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Das Zellpellet wurde dann in 400 µl MaxCyte Elektroporationspuffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden je 60 µg Plasmid-DNA der leichten Kette und der schweren Kette des zu transfizierenden Antikörpers eingesetzt. Die insgesamt 120 µg Plasmid-DNA wurde zu den Zellen pipettiert. Die gesamte Zell-DNA-Mischung wurde dann in die

MaxCyte Elektroporationsküvette (OC-400) pipettiert und in der STX-Einheit, nach Herstellerangaben, elektroporiert. Für die anschließende 30-minütige Inkubation bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wurden die elektroporierten Zellen auf eine 6-well-Platte gegeben. Nach Zugabe von 150 ml Opti-CHO-Kulturmedium wurden die Zellen in Zellkultur-Kolben bei 37 °C, 6 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 nM Sodiumbutyrat. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen im Horizontalschüttler bei 32 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es erfolgte eine tägliche Zugabe von 5,25 ml *Feed-Stock* pro Kulturflasche, sowie die Bestimmung der Zelldichte und der Vitalität. Die Kultivierung wurde nach circa 14 Tagen und bei einer Zellvitalität von < 50 % abgebrochen. Dazu wurde die Zellsuspension zweimal bei 4 °C und 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils gesammelt, steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Des Weiteren wurde ein zusätzlicher Ansatz mit einem *green Fluorescence Protein*-(GFP)-Plasmid transfiziert und diente so als Positivkontrolle. Die GFP-Expression wurde nach 24 Stunden mittels Durchflusszytometrie (Navios, Beckman Coulter) bestätigt.

### 2.3.4 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte über die CH1-Domäne der Antikörper-Konstrukte aus den Überständen der in Kapitel 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Methoden. In die Überstände, wurden im Verhältnis 1:1000 *CH1-XL Affinity Matrix*, über Nacht, bei 4 °C eingerührt. Die Überstand-Matrix-Suspension wurde dann 10 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um so die Matrix mit den gebundenen Proteinen zu isolieren. Diese wurden in einer *Poly-Prep-Chromatographie*-Säule zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte in 6 Fraktionen mit jeweils 1 ml Glycin 1 M (pH 3). Durch die Ansäuerung mit Glycin wurde die Bindung zwischen Protein und Matrix aufgehoben. Das Eluat wurde mit 200 µl TRIS-Puffer (pH 8) neutralisiert. Jede Fraktion wurde anschließend in Dialysierschläuche gegeben und in 2 l PBS bei 4 °C dialysiert. Das PBS wurde dreimal gewechselt, bevor die Proteine steril filtriert wurden. Die Matrix wurde zweimal mit PBS gewaschen, damit sie für eine zweite Aufreinigung in den Überstand eingerührt werden konnten. Die zweite Aufreinigung erfolgte analog zum bereits beschriebenen Verfahren. Über SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel elektrophoresis*) wurden diejenigen Fraktionen, welche die

Antikörper enthielten, bestimmt. Diese wurden nach der Dialyse steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

### 2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die Bestimmung der Reinheit sowie für die optische Bestimmung der Konzentration der Antikörper genutzt. Die Proben wurden dafür im Verhältnis 1:5 mit dem Ladepuffer vermischt, im Heizblock bei 95 °C denaturiert und auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel (vgl. Tabelle 2) zusammen mit 5 µl des Größenstandards *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad Laboratories Inc.) aufgetragen. Unter reduzierenden Bedingungen wurde zu den Proben zusätzlich Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt, welches zum Zerfall der Disulfidbrücken führte. Die Gelelektrophorese wurde mit 80 V für 10 Minuten gestartet und bei 125 V für 50 Minuten weitergeführt. Für die Färbung der Proteine im Gel wurde dieses über Nacht in die Coomassie-Färbelösung (vgl. Tabelle 2) eingelegt. Das Entfärben erfolgte danach für mehrere Stunden mit Wasser. Für die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde die Bandenintensität der Antikörperkonstrukte im Vergleich zur Bandenintensität einer bekannten Standardreihe mit Rituximab optisch analysiert. Außerdem erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

### 2.3.6 Immunoblotting

Das Immunoblotting wurde zur weiteren Charakterisierung der Antikörper genutzt. Für die Detektion der Proteine der schweren bzw. leichten Kette der Antikörper wurde, wie zuvor beschrieben, ein SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proteine im SDS-Gel wurden im *Semi-Dry-Blotter* auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran bei 15 V, für 60 Minuten transferiert. Dafür wurde die PVDF-Membran für 30 Sekunden in Methanol aktiviert und dann mit deionisiertem Wasser gewaschen. Das SDS-Gel, die PVDF-Membran und das Filterpapier wurden vor dem Blot-Vorgang in Transferpuffer eingeweicht. Im *Semi-Dry-Blotter* wurden von der Anode zur Kathode 2 Schichten Filterpapier, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und zwei weitere Filterpapiere geschichtet. Um den unspezifischen Hintergrund zu

blockieren wurde die PVDF-Membran, auf welcher die schwere Kette des Antikörpers nachgewiesen wurde, mit der Antikörperlösung für den *Mouse-α-HIS*-Antikörper und die der leichten Kette des Antikörpers mit der Antikörperlösung des *Human-α-kappa*-Antikörpers geblockt. Diese Blockierlösungen inkubierte jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der primäre Antikörper (*Mouse α-HIS* bzw. *Mouse anti-human kappa*) wurde, wie in Tabelle 8 angegeben, direkt auf die Membran mit der Blockierlösung gegeben und bei 4 °C über Nacht bzw. bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran jeweils mit der entsprechenden Blockierlösung zweimal für 10 Minuten gewaschen und anschließend mit 1x TBS für 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre HRP-gekoppelte *Goat-α-Mouse* Antikörper wurde entsprechend Tabelle 8 mit der Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht bzw. bei Raumtemperatur für eine Stunde auf der Membran inkubiert. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran mit dem *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben vorbereitet. Schließlich wurde das Signal im *ChemiDoc™ XRS+* System (BioRad) und mit dem Programm *QuantityOne* detektiert und dokumentiert.

### 2.3.7 Durchflusszytometrie

Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Konstrukte an die Antigene der Zielzellen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie veranschaulicht werden. Für die Bindungsanalyse an das entsprechende Zielantigen wurden pro Ansatz  $3 \times 10^5$  Zellen verwendet. Als Primärantikörper wurden die Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von 25 µg/ml oder in einer mit 1xPBA erstellten Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 2) eingesetzt. Die Inkubation mit 50 µl Antikörpersuspension erfolgte für 60 Minuten bei 4 °C. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre *anti-human-kappa FITC* Antikörper (vgl. Tabelle 9) wurde nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBA, im Verhältnis 1:20 eingesetzt und für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Zwischen den Waschschritten wurden die Zellen bei 10000 rpm in der Tischzentrifuge für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Für die durchflusszytometrische Detektion wurden die Zellen in 500 µl PBA resuspendiert. Um die bispezifische Bindung, simultan an der Zielzelle und an den Effektorzellen zu analysieren wurde zusätzlich der Antikörper gegen den Fc-Teil des NKG2D-Fc Konstrukts (vgl. Tabelle 9) eingesetzt. Es wurde analog zum Bindungsnachweis

vorgegangen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (Antikörperkonstrukt), wurde zusätzlich das NKG2D-Fc Protein in der Konzentration 100 µg/ml eingesetzt und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Der fluoreszenzmarkierte Antikörper wurde dann, wie oben beschrieben, im letzten Schritt zu den Zellen gegeben. Die Messungen der Fluoreszenzintensität erfolgten bei 520 nm (Emissionsmaximum von FITC) bzw. bei 578 nm (Emissionsmaximum von PE) und wurden mit Hilfe der Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter) analysiert. Die Analysen der Fluoreszenzintensität wurden immer im Vergleich zu einer Probe, welche ohne Primärantikörper inkubierte, interpretiert. Für die dosisabhängigen Bindungsanalysen wurden ebenfalls Verdünnungsreihen, wie oben beschrieben, erstellt und analysiert. Um die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) sowie die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) zu errechnen und die entsprechenden Graphen zu erstellen wurde GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) genutzt.

### 2.3.8 Isolation humaner Effektorzellen aus Vollblut

Effektorzellen sind mononukleäre Zellen (MNC), welche aus peripherem Blut gesunder Spender gewonnen wurden. Dazu wurden auf 6 ml FICOLL 7 ml Blut langsam aufgeschichtet. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das aufgeschichtete Blut für 20 Minuten bei 2.500 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der MNC-Ring wurde abgenommen und dreimal mit 1x PBS gewaschen und dabei mit 1.800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Bei Vorhandensein von Erythrozyten im MNC-Pellet wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dafür wurden 45 ml 4 °C-kaltes, destilliertes Wasser zu den MNC gegeben. Nach 30 Sekunden wurde 5 ml 10x PBS hinzugefügt und die Zellen pelletiert. Je nach benötigtem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis, wurden die Zellen im für die Zielzellen entsprechenden Medium aufgenommen.

### 2.3.9 Antikörper-abhängige zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) mit $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuch

Der Chrom-Freisetzversuch soll die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität von antigen-positiven Zellen zeigen. Die Zelllinie L-363 wurde als Zielzellen verwendet und als Effektorzellen dienten MNC. Zu den Zielzellen (L-363) wurde im Verhältnis 1:12000  $^{51}\text{Chrom}$  pipettiert. Der Ansatz inkubierte zunächst für 2 Stunden bei 37 °C und wurde im Folgenden dreimal mit je 7 ml R10<sup>+</sup> Medium gewaschen. Die

chromierten Zellen wurden dann in einer 96-well-Platte mit  $6 \times 10^3$  Zielzellen pro well ausgesät und in absteigender Konzentration mit 10 µl Antikörper in PBS behandelt. Im folgenden Schritt wurden die chromierten Zielzellen zu den Effektorzellen pipettiert. Für den Maximal-Release (MR), welcher den Wert für 100 % abgestorbene Zellen anzeigt, wurde 1 % (v/v) Triton-X100 auf Zielzellen gegeben. Die basale Freisetzung (*basal release* BR) wurde durch Zielzellen ohne Effektorzellen und ohne Antikörper bestimmt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wurden die Platten bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden je 25 µl Probenüberstand pro well mit je 125 µl Szintillations-Super-Mix vermischt und in die Counter-Platte übertragen. Die Messung der freigesetzten <sup>51</sup>Chrommenge erfolgte im Szintillations- und Luminesenz Counter 1450 MicroBetaTriLux (PerkinElmer). Folgende Formel wurde für die Berechnung der Lyse verwendet:

$$\text{Lyse in \%} = \frac{\text{cpm(Probe)} - \text{cpm(BR)}}{\text{cpm(MR)} - \text{cpm(BR)}} \cdot 100 \%$$

## 2.4 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der oben genannten Methoden wurden statistisch und graphisch mit dem Programm GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad Software) oder dem Programm Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter) analysiert. Der Bonferroni PostTest und two-way-Anova wurden zur Berechnung der p-Werte angewendet. Bei p-Werten < 0,005 wurde die Nullhypothese verworfen.

### 3. Ergebnisse

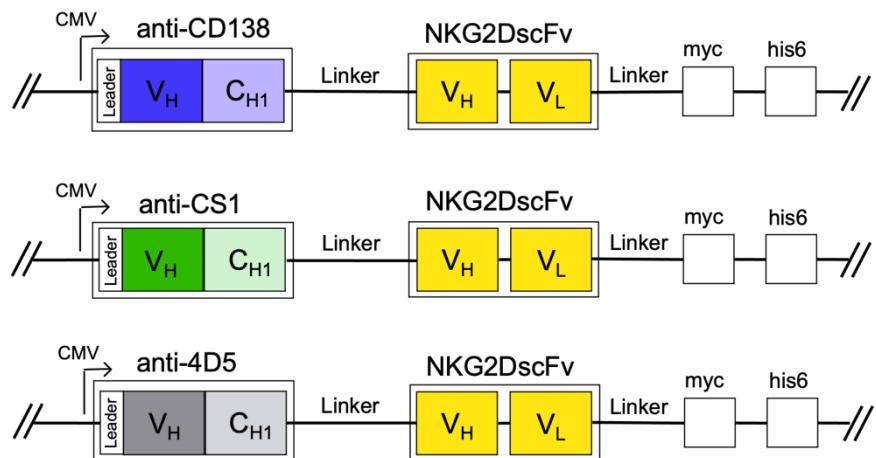
NKG2D spielt bei der Immunabwehr von kanzerösen Zellen eine wichtige Rolle. Dies bildete die Grundlage für die Generierung neuartiger NKG2D-gerichteter Antikörperperformate, welche einen neuen ergänzenden Therapieansatz für das Multiple Myelom darstellen könnte. Die Antikörper sollen über das Fab-Fragment an Myelom-assozierte Antigene binden und über die Bindung des fusionierten scFv NKG2D-exprimierende Effektorzellen rekrutieren, sodass Effektormechanismen gegen Myelomzellen aktiviert werden. In den folgenden Versuchen wurden die hergestellten Antikörperderivate biochemisch charakterisiert sowie deren Funktionalität getestet.

#### 3.1 Aufbau der Antikörper

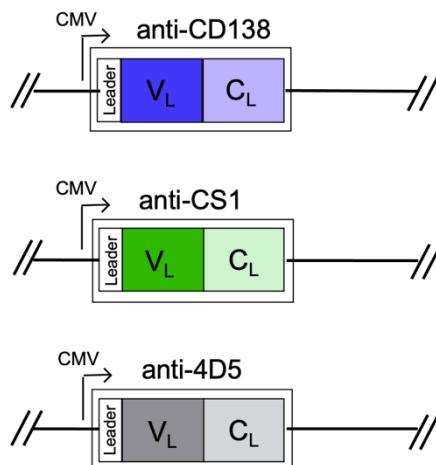
Das Antikörperkonstrukt wurde als Fab-Fragment gerichtet gegen CS1 bzw. CD138, welches über einen flexiblen Glycin-Serin-Linker mit einem scFv gegen NKG2D verbunden wurde, konstruiert. Das scFv soll NKG2D-exprimierende Effektorzellen binden und diese in der räumlichen Nähe der Zielzellen aktivieren. So sollen Immunantworten gegen Myelomzellen aktiviert werden. Mit Hilfe der Phagen-Display-Methode wurden NKG2D-bindende scFv-Klone identifiziert (Yumab, Braunschweig) und in unserem Labor charakterisiert (55). Für die Konstruktion der, im Folgenden beschriebenen Fusionsproteine, wurde mit dem scFv-Klon #32 weitergearbeitet. Dieser wurde auf Grund seiner potennten NK-Zell-Aktivierung ausgewählt (55). Die Sequenzanalyse des Klons #32 zeigte die  $V_H$  bzw.  $V_L$  Framework-Kombination aus den V-Regionen IGHV3/IGHV3. Das Fab-Fragment besteht aus einer modifizierten schweren Kette mit konstanter und variabler Domäne ( $V_H$  und  $C_{H1}$ ), ohne die  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  Domänen. Die  $C_{H1}$ -Domäne ist über einen Glycin-Serin-Linker mit der  $V_L$ -Domäne des scFv verbunden, wie in Abbildung 9 A dargestellt. Die leichte Kette entspricht im Aufbau der leichten Kette eines IgG Antikörpers (Abbildung 9 B). Schwere und leichte Kette des Fab-Fragments sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Abbildung 9 C). Es wurde zum einen das Fab-Fragment des bereits klinisch genutzten monoklonalen Antikörpers Elotuzumab (Huluc63), welcher gegen das Antigen CS1 gerichtet ist, fusioniert (Abbildung 9 grün). Für das zweite Konstrukt wurde ein Fab-Fragment verwendet, welches spezifisch gegen das klinisch validierte Antigen CD138 gerichtet ist (Abbildung 9 blau). Zusätzlich wurde ein HER2-gerichtetes Antikörperkonstrukt analog zu den anderen hergestellt. Dieses enthielt das Fab-

Fragment des klinisch eingesetzten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Klon 4D5), welches HER2 bindet (Abbildung 9 grau) und zur Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird (103). Im Folgenden werden die Antikörperkonstrukte CD138xNKG2D, CS1xNKG2D und 4D5xNKG2D genannt.

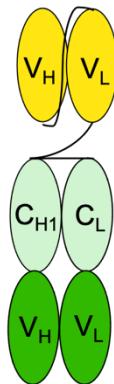
### A Derivate der schweren Ketten



### B Leichte Ketten



### C CS1xNKG2D

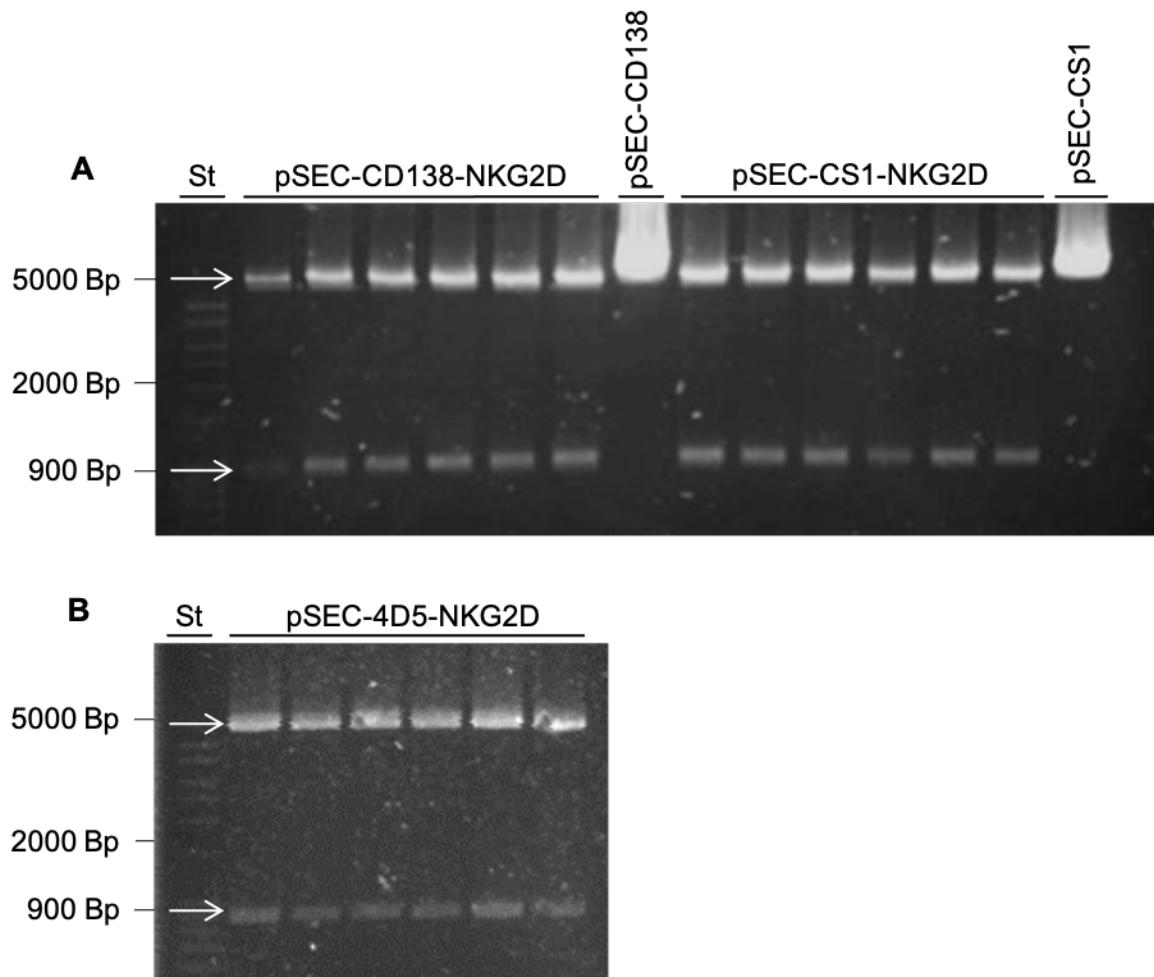


**Abbildung 9** Schematische Darstellung der Antikörperkonstrukte

**(A)** Die Derivate der schweren Ketten sind gegen CD138 (blau) oder CS1 (grün) gerichtet. Als Negativkontrolle ist 4D5 (grau) gegen HER2 gerichtet. V<sub>H</sub>: variable Domäne der schweren Kette; C<sub>H1</sub>: konstante Domäne der schweren Kette; V<sub>L</sub>: variable Domäne der leichten Kette; C<sub>L</sub>: konstante Domäne der leichten κ-Kette. **(B)** Aufbau der leichten Ketten; CMV: Cytomegalievirus-Promotor; Leader: *murine Ig-κ-chain-leader* Sequenz; myc: c-myc Epitop; his6: *Polyhistidine tag*; Linker: Linker unterschiedlicher Länge. **(C)** Schematischer Aufbau des Antikörperkonstrukt. Hier beispielhaft für CS1xNKG2D.

### 3.2 Klonierung der Expressionsvektoren

Für die Herstellung der Fusionsproteine wurde der pSEC-Expressionsvektor verwendet, welcher die Proteinproduktion in Säugerzellen erlaubte. In diesen wurde das  $F_d$ -Fragment der modifizierten schweren Kette gegen CD138 aus dem Vektor pSEC-CD138VH, über eine enzymatische Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen PpuM I und Nhe I kloniert. Analog dazu wurde das  $F_d$ -Fragment, welches gegen CS1 gerichtet war, aus dem Vektor pEX-A2-Huluc63VH und das  $F_d$ -Fragment gegen HER2 aus dem Vektor pIRES-HC-4D5-NKG2D#3 in den pSEC-Expressionsvektor kloniert. So wurden die Expressionsvektoren pSEC-CD138, pSEC-CS1 und pSEC-4D5 generiert. In einem zweiten Schritt sollten die DNA-Plasmide um die Sequenz des scFv NKG2D#32 erweitert werden. Dafür wurde aus dem Vektor pIRES-Rituximab-Fd-NKG2D#32 mit Hilfe der Restriktionsenzyme PpuM I, Nhe I und Sfi I das DNA-Fragment NKG2D#32 isoliert und in die Expressionsvektoren pSEC-CD138, pSEC-CS1 und pSEC-4D5 kloniert. Abbildung 10 zeigt das zugehörige Agarosegel nach der enzymatischen Spaltung mit PpuM I, Nhe I und Sfi I. Dabei zeigte sich auf Höhe der 900 Bp (Basenpaare) das anti-NKG2D scFv-Insert und bei 5.000 Bp der Expressionsvektor ohne Insert (vgl. Abbildung 10, weiße Pfeile). Es wurden jeweils 6 Klone evaluiert, welche alle das scFv-Insert in der erwarteten Größe zeigten. So konnte davon ausgegangen werden, dass das scFv-Insert korrekt in das Plasmid kloniert wurde. Die enzymatische Spaltung der Ursprungsvektoren pSEC-CD138 und pSEC-CS1 zeigte im Agarosegel kein zusätzliches DNA-Fragment (Abbildung 10 A). Es ist anzunehmen, dass die Ursprungsvektoren dadurch linearisiert wurden und damit für die verwendeten Enzyme keine anderen Schnittstellen im Plasmid vorliegen. Alle Klonierungsschritte wurden durch enzymatische Spaltungen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen kontrolliert und die Ergebnisse mithilfe von Agarosegelen visualisiert. Die Bandengröße wurde anhand des Größenstandards bestimmt. Klone, die nach der Kontroll-Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen die erwarteten Banden im Agarosegel zeigten, wurden zur Validierung der Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Die Expressionsvektoren mit den DNA-Sequenzen der leichten Ketten der verschiedenen Fab-Fragmente wurden durch Vorarbeiten vom Labor zur Verfügung gestellt.



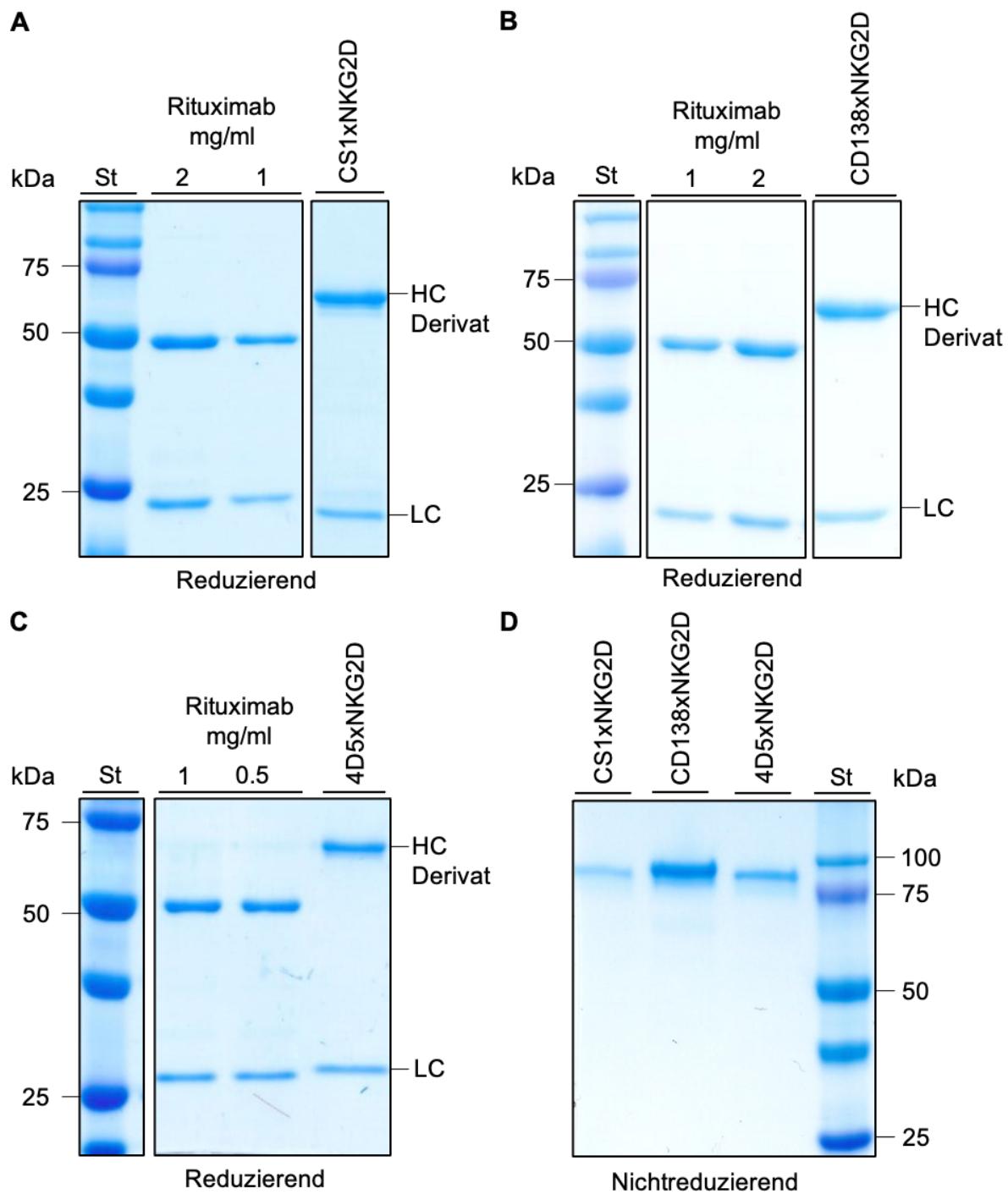
**Abbildung 10** Expressionsplasmide enthalten das NKG2D scFv-Insert

Die Expressionsplasmide **(A)** pSEC-CD138-NKG2D, pSEC-CS1-NKG2D und **(B)** pSEC-4D5-NKG2D wurden mit den Restriktionsenzymen PpuM I, Nhe I und Sfi I enzymatisch gespalten und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden jeweils 6 Klone untersucht. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte über die Inkubation mit Ethidiumbromid. Als Kontrolle dienten die Ursprungsplasmide pSEC-CD138 bzw. pSEC-CS1, bei welchen, ohne NKG2D-scFv, kein Insert vorhanden ist **(A)**. Die relevanten DNA-Fragmente sind mit weißen Pfeilen markiert. St: Größenstandard, Bp: Basenpaare.

### 3.3 Herstellung und Reinigung der Fusionsproteine

Die Herstellung der Antikörper wurde zunächst in HEK-293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Transfektion durchgeführt. Dazu wurden die Zellen transient mit den Expressionsvektoren der leichten Kette und der Derivate der schweren Kette des Antikörperkonstrukts transfiziert. Um die produzierte Proteinmenge zu erhöhen, wurde die weitere Produktion der Antikörperkonstrukte mit Hilfe der MaxCyte-Transfektion in

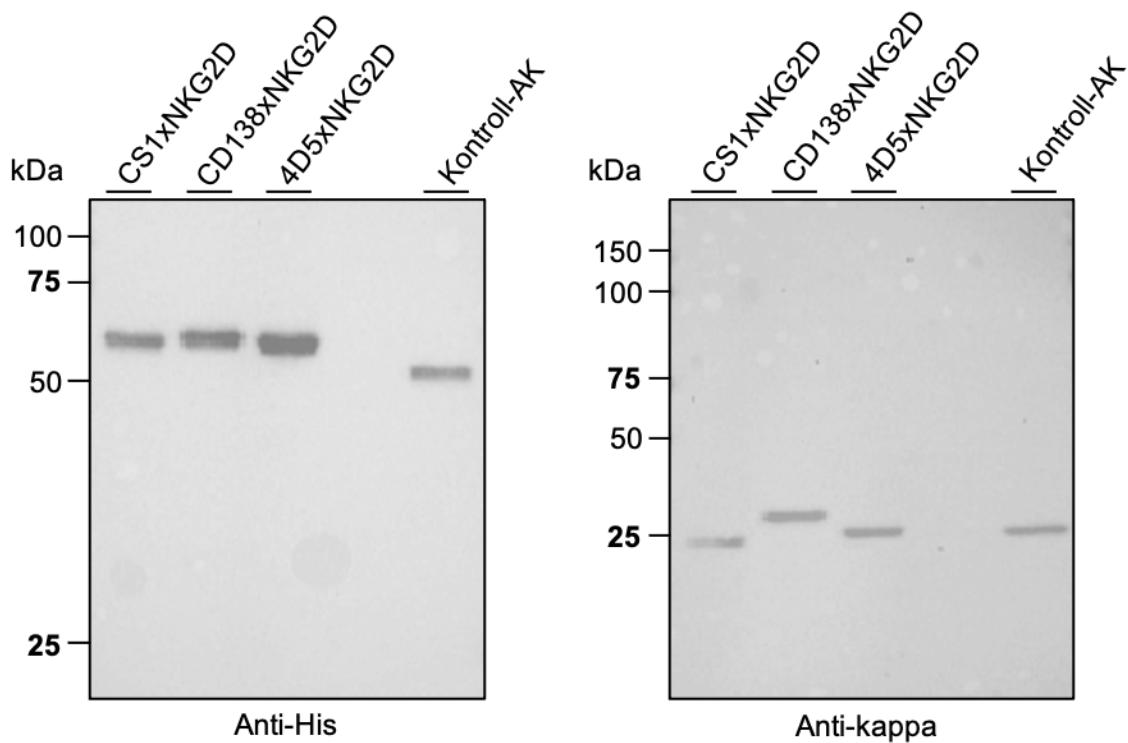
CHO-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die Expressionsvektoren beider Ketten mittels Elektroporation in die Zellen transfiziert. Der Zellüberstand, mit den sekretierten Antikörperkonstrukten wurde affinitätschromatographisch über die C<sub>H1</sub>-Domäne spezifisch aufgereinigt und das so gewonnene Protein konnte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung detektiert werden. In Abbildung 11 A-C sind auf den abgebildeten Coomassie-Gelen unter reduzierenden Bedingungen jeweils Banden auf Höhe der 55 kDa und der 25 kDa Markierung des Proteinstandards zu sehen. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken zerfallen die Antikörperkonstrukte in die leichte Kette und Derivate der schweren Kette. Die 55 – 60 kDa Bande entspricht dem Derivat der schweren Kette und die 25 kDa Bande entspricht der leichten Kette des Antikörperkonstrukts. Des Weiteren wurde auch eine Coomassie-Färbung unter nicht-reduzierender Bedingung durchgeführt, welches dementsprechend, bei intakten Disulfidbrücken, die Derivate der schweren und der leichten Ketten zusammen darstellt und die Proteinbanden oberhalb der 75 kDa Markierung zeigt (Abbildung 11 D). Dies entspricht etwa der errechneten Gesamt molekularamasse von ca. 80 kDa. Optisch sind in keiner der Spuren zusätzliche Banden zu sehen, sodass das Vorhandensein von Verunreinigungen ausgeschlossen werden konnte. Auf Grundlage der Ergebnisse des SDS-PAGE, wurde davon ausgegangen, dass sich die Derivate der schweren und der leichten Kette korrekt zusammengesetzt haben. Die Verdünnungsreihe einer bekannten Konzentration des Antikörpers Rituximab diente zur Konzentrationsabschätzung. Diese lag je nach Art der Transfektion, Aufreinigung und Fusionsprotein zwischen 250 µg/ml und 2 mg/ml. Die optische Konzentrationsbestimmung konnte durch das Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 11** Analyse der Reinheit, Molekulargewicht und Konzentration der Antikörperkonstrukte

Für das SDS-PAGE wurden 10 µl des CS1-Antikörpers (**A**), 4 µl des CD138-Antikörpers (**B**) und 2,5 µl des 4D5-Antikörpers (**C**) auf das Gel aufgetragen, sowie der Größenstandard und eine bekannten Rituximab-Verdünnungsreihe. Anschließend wurden die Proteinbanden des Gels mit der Coomassie-Färbung visualisiert. (**A-C**) Reduzierende Bedingungen wurden durch die Zugabe von DTT erreicht. (**D**) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unter nichtreduzierender Bedingung. St: Größenstandard, HC: *heavy chain*, schwere Kette, LC: *light chain*, leichte Kette. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Für die weitere Charakterisierung wurde ein Immunoblot durchgeführt. Das Derivat der schweren Kette wurde mittels des Antikörpers gegen die Polyhistidin-Region (Anti-His, vgl. Abbildung 12), die leichte Kette mittels des Antikörpers gegen die kappa-Region detektiert (Anti-kappa) (Abbildung 12). Die detektierten Banden zeigten, neben den erwarteten Bandengrößen, ebenfalls die korrekte Auftrennung der Disulfidbrücken (Abbildung 12). Die Detektion der Proteine bestätigte sich, da auch der im Blot verwendete Kontroll-Antikörper die erwarteten Banden aufwies. Außerdem sind, ebenso wie im SDS-PAGE, auch im Immunoblot keine zusätzlichen Banden zu sehen, sodass davon ausgegangen wurde, dass keine Protein-Fragmente oder Abbauprodukte vorhanden waren.



**Abbildung 12** Die Identität der Derivate der schweren und leichten Kette können im Western Blot bestätigt werden

Dargestellt sind Immunoblots, nach SDS-PAGE unter reduzierender Bedingung. Es wurden jeweils 2 µg der Antikörper und der Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Das Derivat der schweren Kette wurde mit Anti-HIS und das der leichten Kette mit Anti-kappa detektiert. Die dargestellten Banden sind kohärent mit den erwarteten Größen. Als Positivkontrolle zeigt der Kontroll-AK ebenfalls die erwarteten Banden. Kontroll-AK: Kontroll-Antikörper, kDa: Kilo-Dalton. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

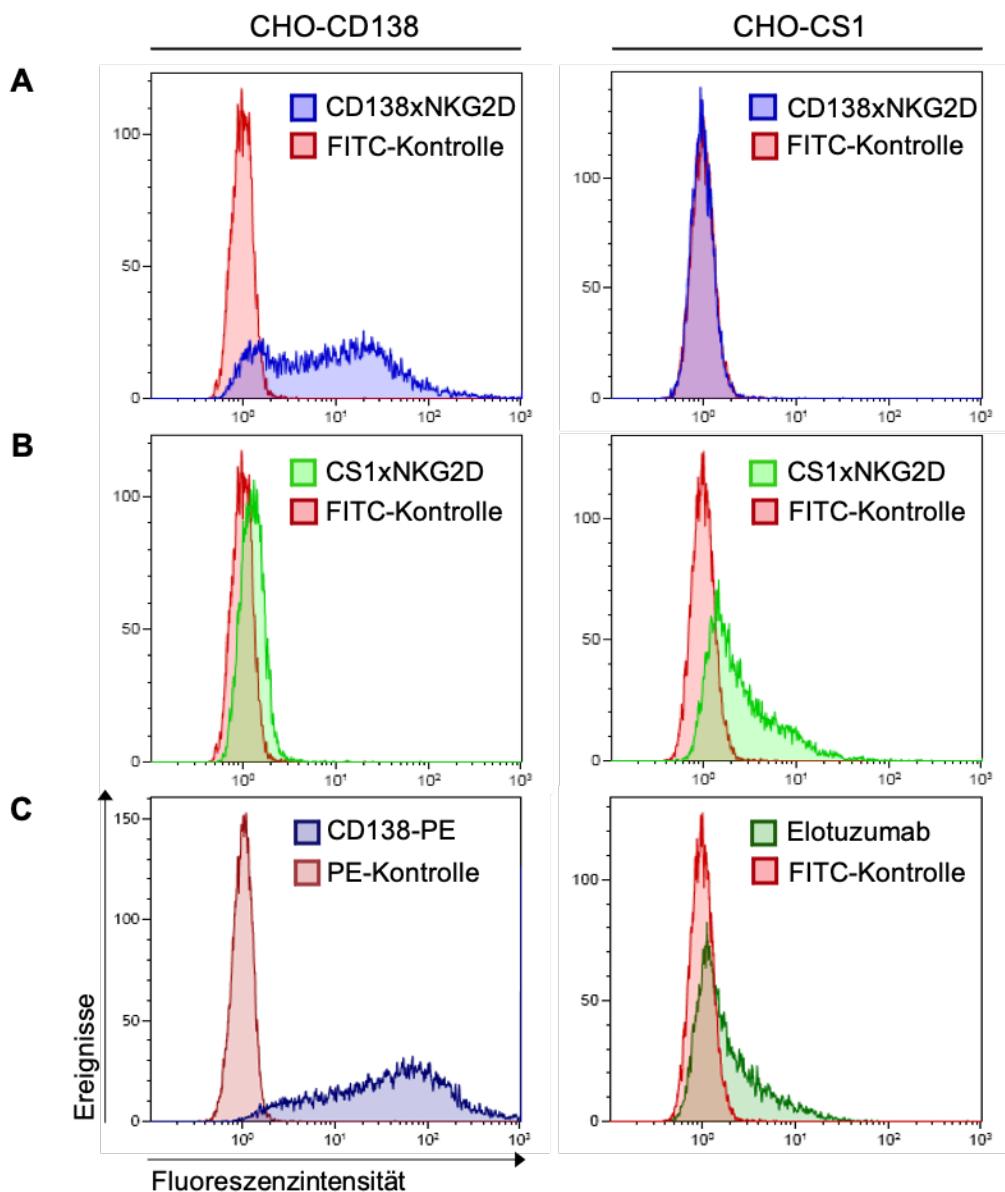
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle Antikörperkonstrukte homogen hergestellt werden konnten, sodass die weiteren biochemischen Charakterisierungen durchgeführt werden konnten.

### 3.4 Untersuchung des Bindungsverhaltens

#### 3.4.1 Untersuchung der spezifischen Bindung

Weiterhin wurde das Bindungsverhalten der Antikörper auf verschiedenen Zelllinien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für den Nachweis der Bindung an das Zielantigen wurden Ovarial-Zellen des Zwerghamsters sog. CHO-Zellen, welche zuvor mit den Antigenen CD138 bzw. CS1 stabil transfiziert wurden, eingesetzt. In diesem Versuch sollte die Bindung an das Zielantigen gezeigt werden, da es sich bei den CHO-Zellen um nicht-humane Zellen handelt und somit nur eine Bindung über das transfizierte Antigen möglich sein sollte. Zunächst wurden CHO-CD138 Zellen bzw. CHO-CS1 Zellen mit CD138xNKG2D und dem anti-*human*-kappa FITC Sekundärantikörper inkubiert und die Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abbildung 13 A). Im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde, zeigte sich auf den CD138-CHO Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität und auf den CHO-CS1 Zellen zeigte sich kein Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 13 A). Das CD138xNKG2D Konstrukt konnte nur auf CD138-exprimierenden Zellen binden und zeigte damit das erwartete Bindungsverhalten. Analog dazu erfolgten Ansätze mit dem CS1xNKG2D Antikörperkonstrukt. Hier zeigte sich ebenfalls das erwartete Bindungsverhalten, insofern, dass die Inkubation mit CS1xNKG2D nur auf den CS1-CHO Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich mit der Kontrolle ergab (Abbildung 13 B). Die Versuchsansätze, bei welchen die Inkubation mit dem direkt gekoppelten CD138-PE Antikörper erfolgte, zeigten, dass die transfizierten CHO-Zellen das Antigen CD138 nachweislich exprimieren (Abbildung 13 C). Bei den CS1-transfizierten CHO-Zellen erfolgte die Inkubation mit Elotuzumab und dem sekundären anti-*human*-kappa FITC Antikörper, sodass CS1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Die Inkubation mit den Antikörperkonstrukt CS1xNKG2D zeigte dabei ähnliche Fluoreszenzintensitätsverstärkungen, wie Elotuzumab. Somit konnte auf die Spezifität der monovalenten Bindung der Antikörperkonstrukte an ihr jeweiliges Zielantigen,

geschlossen werden. Entsprechend konnte in Versuchen mit den nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen gezeigt werden, dass es zu keiner Fluoreszenzintensitätsverstärkung beim Einsatz der Antikörperkonstrukte kam (Daten nicht dargestellt, vgl. Abbildung 13). So konnte sowohl für CD138xNKG2D als auch für CS1xNKG2D gezeigt werden, dass diese spezifisch an ihr entsprechendes Zielantigen binden.

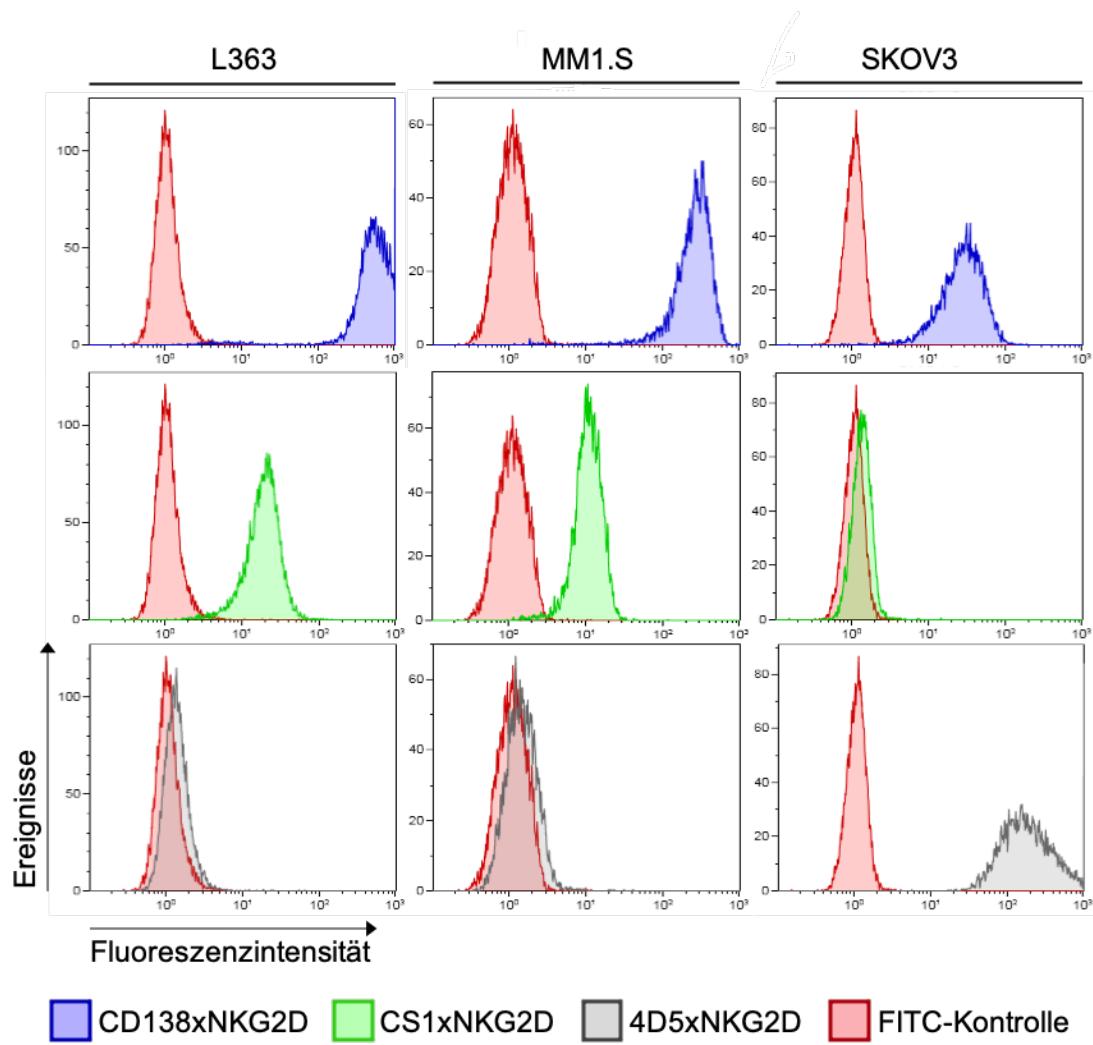


**Abbildung 13** CD138xNKG2D und CS1xNKG2D binden spezifisch an ihre Zielantigene

Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit CHO-CD138-Zellen und CHO-CS1-Zellen. Es wurden jeweils  $3 \times 10^5$  CHO-CD138-Zellen bzw. CHO-CS1-Zellen mit 25 µg/ml CD138xNKG2D (**A**), mit 25 µg/ml CS1xNKG2D (**B**) oder mit CD138-PE bzw. 25 µg/ml Elotuzumab (**C**) inkubiert. Die Kontrollen (FITC- bzw. PE-Antikörper (rot)) zeigen jeweils die unspezifische Hintergrundfluoreszenzintensität an. Die gezeigten Daten sind repräsentative Abbildungen von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens an Plasmazellleukämie-Zellen

Die folgenden Analysen erfolgten an den beiden humanen Plasmazellleukämie-Zelllinien L363 und MM1.S. Beide Zelllinien exprimieren sowohl CD138 als auch CS1. Um die Bindungsfähigkeit des 4D5-Antikörperkonstrukts zu verifizieren wurde die Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 eingesetzt. Diese Zelllinie exprimiert HER2 und außerdem das CD138-Antigen (104). Zunächst wurde die Bindung der Antikörper an das entsprechende Antigen auf der Zielzelle durchflusszytometrisch untersucht. Bei den Versuchsansätzen mit den Antikörperkonstrukten kam es jeweils zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur FITC-Kontrolle, wenn diese mit den Zelllinien, welche das entsprechende Antigen exprimieren, inkubierten (Abbildung 14). Das CD138xNKG2D Fusionsprotein zeigte daher auf allen Zelllinien eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität, weil alle verwendeten Zelllinien CD138 exprimieren (Abbildung 14, Zeile 1). Die Inkubation von CS1xNKG2D mit der Zelllinie MM1.S bzw. L363 zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, welche auf das von diesen Zellen exprimierte, Antigen CS1 zurückzuführen ist (Abbildung 14, Zeile 2). In gleicher Weise wies 4D5xNKG2D nur bei der Inkubation mit SKOV3-Zellen eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf (Abbildung 14, Zeile 3). So konnte die Bindung an das entsprechende Antigen für alle drei Antikörperkonstrukte gezeigt werden. Analog dazu wiesen, in allen Kombinationen, die Inkubationen der Antikörperkonstrukte mit denjenigen Zellen, welche das Antigen des eingesetzten Konstruktes nicht trugen, eine Fluoreszenzintensität auf, welche der Kontrolle entsprach. Damit konnte gezeigt werden, dass es nicht zu unspezifischen Bindungen der Antikörperkonstrukte kam. Zusammenfassend konnte für alle drei Antikörperkonstrukte eine spezifische, Bindung an die verwendeten Tumorzelllinien gezeigt werden, die das sprechende Zielantigen tragen.

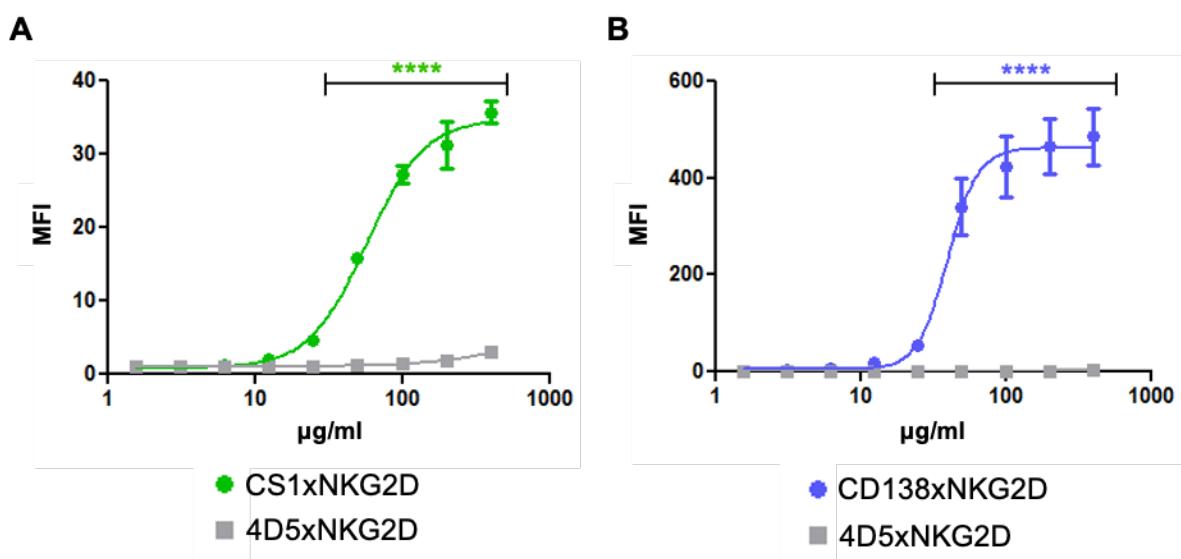


**Abbildung 14** Antikörperkonstrukte binden spezifisch auf Tumorzelllinien mit Zielantigen-Expression

Es wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen der Zelllinien L363, MM1.S und SKOV3 Zelllinie verwendet. Diese wurden mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des jeweiligen Antikörpers inkubiert. Ein für humane kappa Leichtketten spezifischer Antikörper wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Die Daten dieser Abbildung sind beispielhaft für eines von drei unabhängigen Experimenten.

In weiteren Experimenten wurde zur Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (EC<sub>50</sub> Wert) dosisabhängige Bindungskurven in Bezug auf die Antigenbindung auf L363-Zellen durchgeführt und analysiert (Abbildung 15). Dazu wurden für die drei Antikörperkonstrukte Verdünnungsreihen erstellt und durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Der EC<sub>50</sub>-Wert für das Antikörperkonstrukt CS1xNKG2D betrug 57,49  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (95%-Konfidenzintervall (95%-KI) 49,45 - 66,83). Für CD138xNKG2D konnte ein EC<sub>50</sub>-Wert von 39,95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (95%-KI 32,63 - 48,91) errechnet werden. So sind bei dem Konstrukt CD138xNKG2D bereits mit einer Konzentration von 39,95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  50 % aller möglichen Bindungen gesättigt, während

dafür bei CS1xNKG2D eine Konzentration von 57,49 µg/ml benötigt würde. Es konnte für beide Antikörperkonstrukte eine konzentrationsabhängige Dosis-Bindungskurve beschrieben werden. Dabei zeigte CS1xNKG2D eine signifikante konzentrationsabhängige Bindung an L363-Zellen und damit an dem Zielantigen CS1 gegenüber dem Antikörperkonstrukt 4D5xNKG2D (Abbildung 15 A). Ebenso bestätigte sich eine signifikante konzentrationsabhängige Bindung für CD138xNKG2D gegenüber 4D5xNKG2D (Abbildung 15 B).

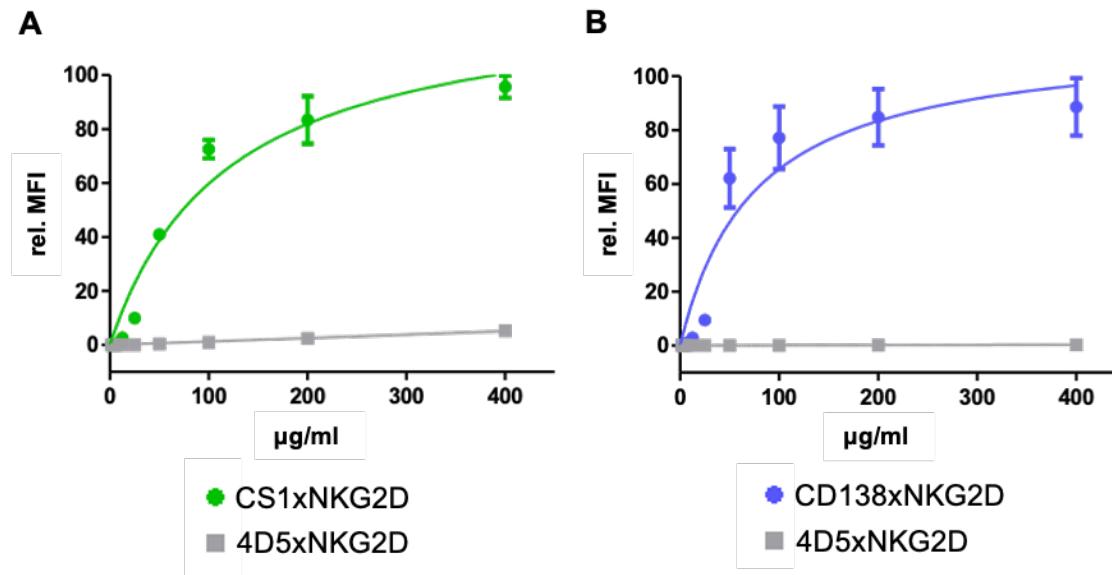


**Abbildung 15** CD138xNKG2D und CS1xNKG2D zeigen an L363-Zellen konzentrationsabhängige Bindung

Konzentrationsabhängige Bindung von (A) CS1xNKG2D (grün) und (B) CD138xNKG2D (blau) im Vergleich mit dem Konstrukt 4D5xNKG2D (grau).  $3 \times 10^5$  L363-Zellen wurden mit steigender Antikörperkonzentration für eine Stunde inkubiert. Für die Verdünnungsreihen wurden Konzentrationen von 0,098 µg/ml bis 400 µg/ml eingesetzt. Im Graphen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der MFI gegen die Proteinkonzentration (µg/ml) aufgetragen. Um signifikante Unterschiede zu verifizieren wurde der two-way-ANOVA Test angewandt. Dabei wurde jede Konzentration von CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D mit den Konzentrationen von 4D5xNKG2D verglichen. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aus Abbildung 15 normalisiert und eine Bindungssättigungskurve erstellt, die einen hyperbolischen Verlauf sowohl für CD138xNKG2D als auch für CS1xNKG2D zeigte (Abbildung 16 A-B). Die  $K_D$  zeigt die Antikörper-Liganden-Wechselwirkung und damit die Affinität des Antikörperkonstrukt zum jeweiligen Antigen an. Das Antikörperkonstrukt CS1xNKG2D ergab einen  $K_D$ -

Wert von 1,476  $\mu\text{M}$ . Für CD138xNKG2D wurde der  $K_D$ -Wert von 0,940  $\mu\text{M}$  errechnet. Dabei sprechen niedrigere  $K_D$ -Werte für eine höhere Affinität des Antikörperkonstruktes.



**Abbildung 16** Dosisabhängige Sättigungskurven

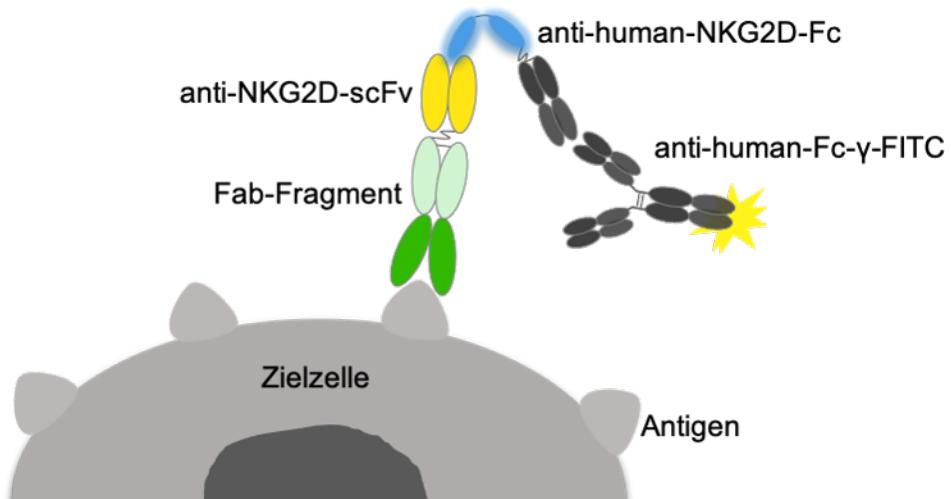
In **A** und **B** sind die Daten aus Abbildung 15 normalisiert (rel. MFI  $\pm$  Standardfehler) und gegen die Proteinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) aufgetragen. Dafür wurden  $3 \times 10^5$  L363-Zellen mit steigender Antikörperkonzentration für eine Stunde inkubiert und mit dem Goat-Anti-Human-kappa FITC Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Für **(A)** CS1xNKG2D (grün) und **(B)** CD138xNKG2D (blau) ergab sich eine hyperbole Sättigungskurve. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Rel. MFI: relative mittlere Fluoreszenzintensität in %.

Zusammenfassend konnte für die Bindung an Plasmaleukämiezelllinien gezeigt werden, dass die Antikörperkonstrukte antigenspezifisch binden, es kam nicht zu unspezifischem Bindungsverhalten und es konnten  $\text{EC}_{50}$ - sowie  $K_D$ -Werte berechnet werden.

### 3.4.3 Untersuchung der bispezifischen Bindung

Zusätzlich wurde die simultane Bindung des Antikörpers an das Zielantigen, sowie an der Bindungsstelle für NKG2D untersucht. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Die L363-Zellen wurden in verschiedenen Ansätzen mit den Antikörperderivaten inkubiert. Danach wurde das NKG2D-Fc Fusionsprotein hinzugefügt. Dieses bindet an den scFv des bispezifischen Antikörpers. Die

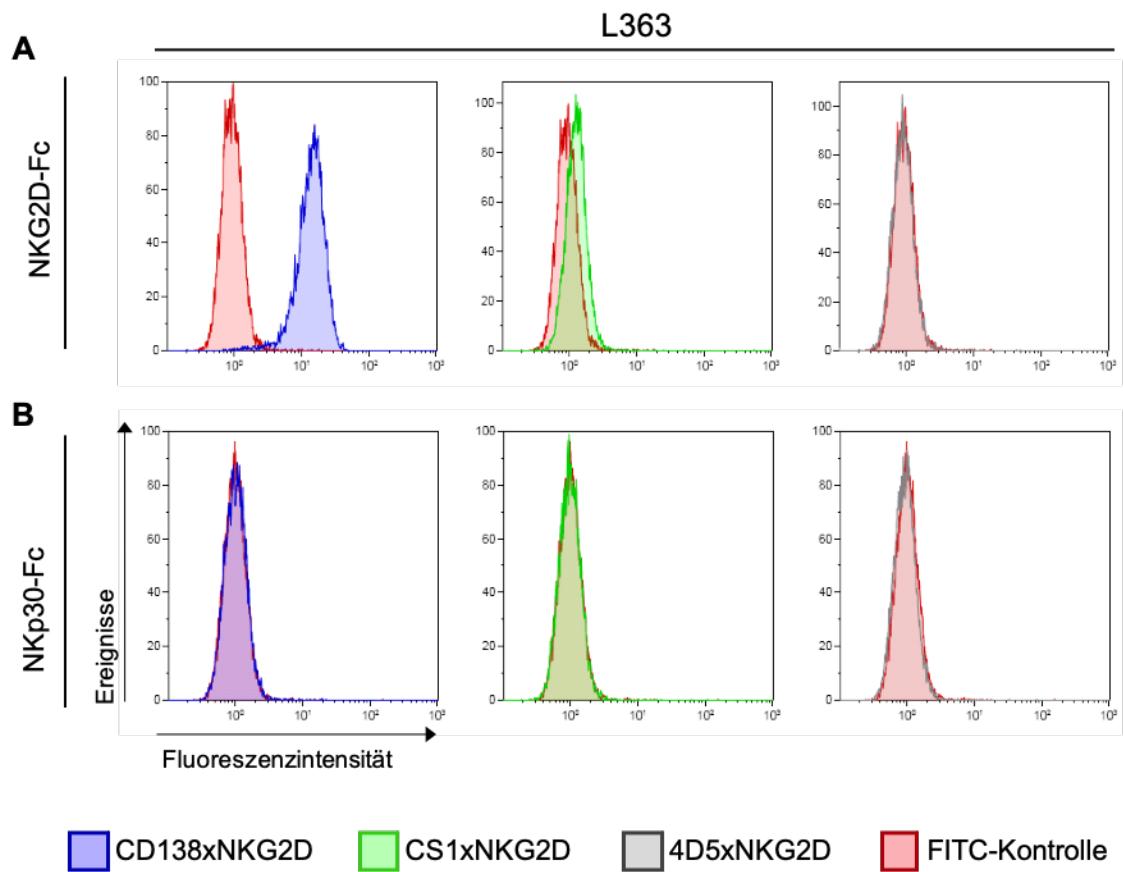
bispezifischen Bindungen an den Zielzellen (L363) und an das NKG2D-Fc wurden dann mit Hilfe eines *anti-human-Fc-γ-FITC* Antikörpers durchflusszytometrisch detektiert.



**Abbildung 17** Schema für den Nachweis der bispezifischen Bindung

Zielzellen exprimieren das Zielantigen, an welchen das Fab-Fragment binden kann. Danach wurde NKG2D-Fc hinzugefügt, welches spezifisch an den scFv der Antikörperkonstrukte binden kann. Der Antikörper *anti-human-Fc-γ-FITC* ist fluoreszenzgekoppelt, sodass es nur bei der simultanen Bindung der Antikörperkonstrukts mit den Antigenen zu einem Fluoreszenzsignal kommen kann.

In Abbildung 18 A sieht man, sowohl bei der Inkubation mit CD138xNKG2D als auch bei der Inkubation mit CS1xNKG2D zusammen mit dem *anti-human-NKG2D-Fc* Protein, eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Dabei zeigte sich jedoch eine lediglich schwache Bindung an CS1-positive Zellen. Im Vergleich dazu zeigte das Antikörperkonstrukt 4D5xNKG2D keine Veränderung der Fluoreszenzintensität. Die Zelllinie L363 exprimierte kein Her2, sodass es in den Proben mit 4D5xNKG2D, zwar zur Bindung mit NKG2D-Fc oder zellulären NKG2D-Liganden kommen könnte, es jedoch nicht zu einer Antikörper-Antigen-Bindung des Fab-Fragments an der Zelloberfläche kommen konnte. Die Inkubation mit NKp30-Fc diente als Negativ-Kontrolle und zeigte bei allen Antikörperkonstrukten keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 18 B). Dies zeigte, dass die Antigenbindungsstelle des scFv spezifisch NKG2D bindet. Damit kann in der Zusammenschau davon ausgegangen werden, dass die Antikörperkonstrukte NKG2D spezifisch binden und ebenso, dass es zu einer simultanen, bispezifischen Bindung kommt.



**Abbildung 18** CD138xNKG2D und CS1xNKG2D binden simultan und bispezifisch.

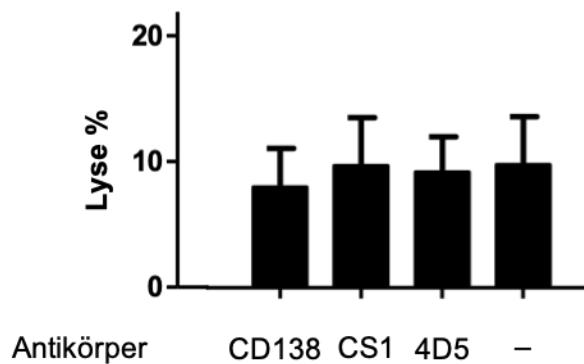
Die L363-Zellen wurden mit  $3 \times 10^5$  Zellen in verschiedenen Ansätzen mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  der jeweiligen Antikörperderivate, (A) dem NKG2D-Fc-Antikörper und dem a-human-Fc- $\gamma$ -FITC inkubiert. (B) In weiteren Ansätzen wurden die Antikörperderivate mit NKp30-Fc und a-human-Fc- $\gamma$ -FITC inkubiert. Die Diagramme sind exemplarisch für ein Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte für die Untersuchungen des Bindungsverhaltens gezeigt werden, dass die Antikörperkonstrukte sowohl spezifisch das entsprechende Zielantigen binden als auch dass simultan bispezifisch das scFv und das Fab gebunden werden können, ohne dass unspezifische Bindungen zu beobachten wären. Damit kann in weiteren Versuchen die zytotoxische Funktionalität der Antikörperkonstrukte getestet werden.

### 3.5 Untersuchung der Zytotoxizität

Im  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuch wurde die zytotoxische Aktivität der Antikörperkonstrukte CD138xNKG2D und CS1xNKG2D untersucht. 4D5xNKG2D

wurde als Negativkontrolle in denselben Experimenten mitgeführt. Aus Vollblut gesunder Spender wurden MNC isoliert, welche als Effektorzellen dienten. Als Zielzellen wurde die Plasmaleukämiezelllinie L363 eingesetzt, welche sowohl CD138 und CS1, als auch CD38 auf der Zelloberfläche exprimiert (71,98). Die Effektorzellen und die Zielzellen wurden in verschiedenen *effector* zu *target* (E:T) Verhältnissen eingesetzt und inkubierten zusammen mit einem der Antikörperderivate.

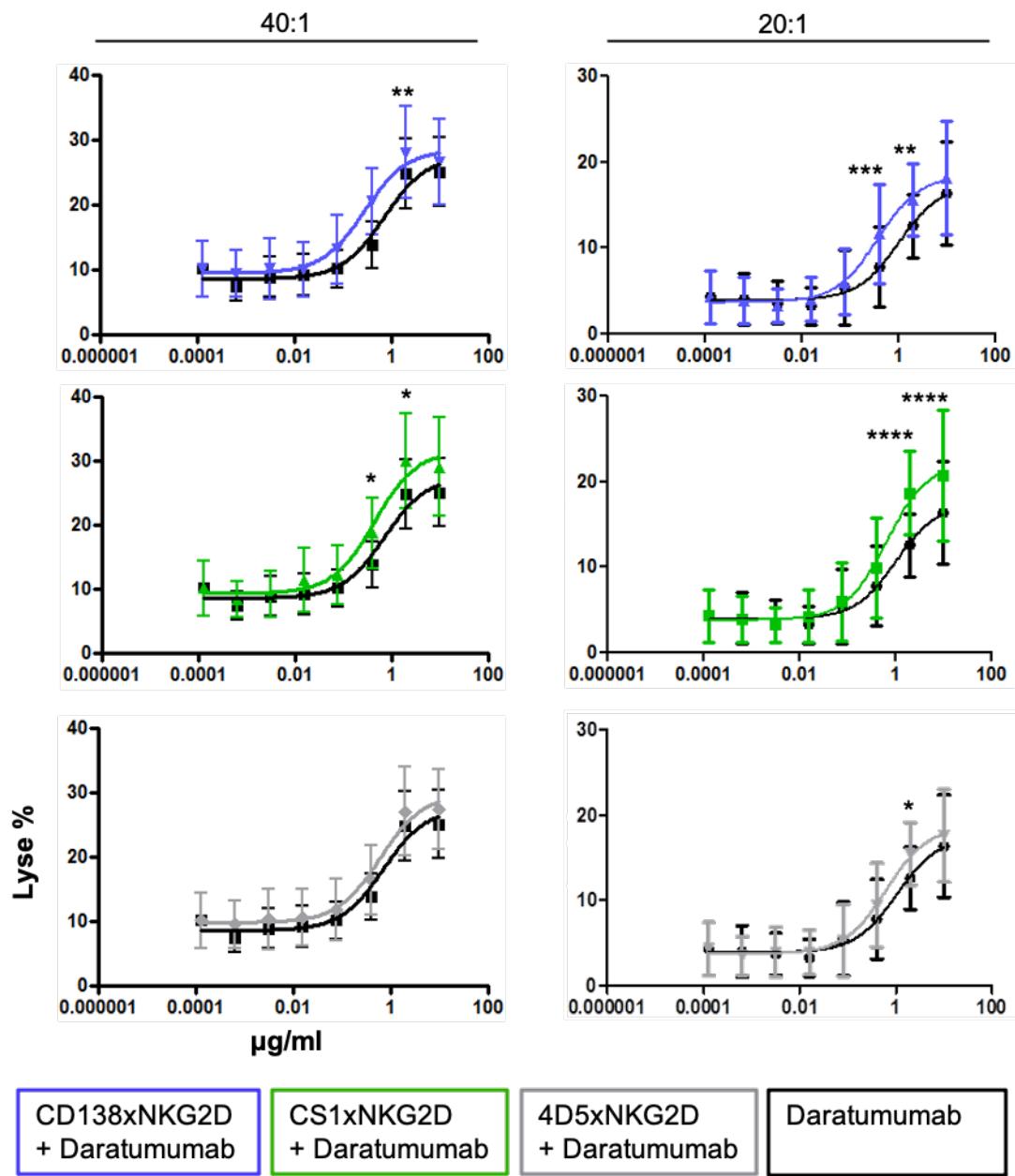


**Abbildung 19** Die Antikörperkonstrukte zeigen zusammen mit Effektorzellen keine erhöhte Lyse

Das Balkendiagramm zeigt die im Chrom-Freisetzungsvorsch mit E:T 40:1 erreichte Lyse, durch Effekte der Effektorzellen allein und mit dem Einsatz der Antikörperkonstrukte CD138xNKG2D, CS1xNKG2D bzw. 4D5xNKG2D. Als Effektorzellen wurden MNC gesunder Spender und als Zielzellen wurden L363-Zellen eingesetzt. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

Die Lyse, in Prozent, beim Einsatz der Antikörperkonstrukte allein sind in Abbildung 19 dargestellt. Dabei zeigen alle drei Antikörperkonstrukte keine Unterschiede in der Tumorzellyse untereinander und im Vergleich zu keiner Antikörperzugabe auf. Aufgrund der fehlenden Wirksamkeit der Antikörperkonstrukte allein wurden diese in weiteren Experimenten in Kombination mit dem bereits zugelassenen monoklonalen Antikörper Daratumumab (71,72) eingesetzt und die Tumorzellyse mittels <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungsvorsch untersucht. Sowohl die titrierte Zugabe von CD138xNKG2D als auch von CS1xNKG2D zeigten dosisabhängige Lyseraten der Zielzellen, die im Vergleich zur Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Daratumumab allein, bei hohen Konzentrationen, signifikant waren. Bei der Kombinationsinkubation Daratumumab mit CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D zeigten sich signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 20). So konnten die Lyseraten bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 durch die Zugabe von 2 µg/ml CS1xNKG2D von 12,59 % (Daratumumab

allein) auf 18,70 % signifikant erhöht werden. Die Lyserate erhöhte sich bei der Zugabe von 2 µg/ml CD138xNKG2D zu Daratumumab, in geringerem Maße, von 12,59 % (Daratumumab allein) auf 15,69 %, bei gleichen Versuchsbedingungen. Die Erhöhung des Anteils an Effektorzellen durch ein E:T-Verhältnis von 40:1 ergaben insgesamt höhere Lyseraten. So konnte zum Beispiel die Lyserate von Daratumumab, nach Zugabe von 2 µg/ml CS1xNKG2D von 24,84 % auf 30,12 % signifikant gesteigert werden. Im Vergleich dazu ergab die Zugabe von 4D5xNKG2D, für beide E:T-Verhältnisse, sehr gering erhöhte Lyseraten bei einer nahezu parallelen, leicht oberhalb verlaufenden, dosisabhängigen Lysekurve im Vergleich zu Daratumumab. Die alleinige Inkubation mit einem der Antikörperkonstrukte zeigte dagegen keine dosisabhängige Lysekurve (Daten nicht dargestellt, vgl. Abbildung 19). Zusammenfassend zeigten sowohl die Antikörperkonstrukte mit Bindungsfähigkeit auf L363-Zellen (CD138xNKG2D, CS1xNKG2D) als auch das Konstrukt ohne Bindungsfähigkeit (4D5xNKG2D), keine zusätzlichen Effekte über diejenigen Effekte der MNC hinaus. Jedoch ergaben sich positive Effekte im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungsversuch in Kombination mit Daratumumab. Die Zugabe von CD138xNKG2D bzw. CS1xNKG2D in höheren Konzentrationen zum monoklonalen Antikörper Daratumumab ergab so einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt. Neben der ADCC-Aktivität über den Fc-Teil von Daratumumab, zeigte die zusätzliche Aktivierung von Effektorzellen über NKG2D damit eine insgesamt höhere ADCC-Aktivität, wenn auch in einem geringen Ausmaß.



**Abbildung 20** Dosisabhängige ADCC-Induktion in  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen

L363-Zellen wurden mit Effektorzellen (MNC) im E:T Verhältnis 40:1 (1. Spalte) oder 20:1 (2. Spalte), sowie steigenden Konzentrationen der Antikörperkonstrukte und Daratumumab inkubiert. In den Graphen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Lyse gegen die Konzentration der Antikörperkonstrukte aufgetragen. Die Kombination eines Antikörperkonstrukt mit Daratumumab wurde mit dem Einsatz von Daratumumab allein (schwarz) verglichen. Signifikante Lyseraten ( $^*p < 0,05$ ) sind mittels two-way-ANOVA berechnet. Alle Werte wurden mit der Bonferroni-Konstante korrigiert. Die Daten wurden für beide E:T Verhältnisse aus je drei unabhängigen Experimenten mit MNC von jeweils drei unterschiedlichen gesunden Spendern berechnet.

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Antikörperkonstrukte hergestellt, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden konnten und außerdem in Lysexperimenten die ADCC zusammen mit dem bereits

klinisch zugelassenen Antikörper Daratumumab steigern konnte, wenn auch in einem geringen Ausmaß.

## 4. Diskussion

Eine unheilbare Erkrankung, wie das Multiple Myelom, welche durch Rezidive immer wieder therapiebedürftig wird, kann von neuartigen Therapiestrategien profitieren. Für die Entwicklung neuer Therapien müssen sowohl etablierte Therapieregime als auch die molekularen und genetischen Eigenschaften der Myelomzellen in Betracht gezogen werden. Hinsichtlich der Entwicklung erfolgreicher Antikörper-basierter Therapien sind vor allem die adressierten Antigene und die Interaktion des Antikörpers mit dem Immunsystem sowie myelomspezifische Faktoren entscheidend. Die vielversprechenden Ergebnisse aus Vorarbeiten mit bispezifischen CD20xNKG2D Antikörpern, gaben die Grundlage für die in dieser Arbeit entwickelten bispezifischen Konstrukte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Herstellung der Antikörperkonstrukte CS1xNKG2D, CD138xNKG2D und 4D5xNKG2D, sowohl als DNA-Sequenz innerhalb des Expressionsvektors, als auch als Protein möglich ist. Für die drei Antikörperkonstrukte konnte außerdem die Funktionalität bezüglich der Zielantigenbindung und simultanen/bispezifischen Bindung bestätigt werden. Des Weiteren wurde die zytotoxische Funktionalität der Konstrukte untersucht. Im Chromfreisetzungsversuch konnte gezeigt werden, dass die Antikörperkonstrukte als Einzelsubstanz zusammen mit MNC keine zytotoxische Effektorzell-vermittelte Lyse von Zielzellen auslösen. In der Versuchsreihe, bei welcher zusätzlich zu einem der Antikörperkonstrukte der monoklonale Antikörper Daratumumab zum Einsatz kam, zeigten sich teilweise verstärkende Effekte im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Daratumumab, sodass ein synergistischer bzw. additiver Effekt vermutet werden könnte. Damit zeigten die Konstrukte CS1xNKG2D und CD138xNKG2D auch zytotoxische Effekte und können so insgesamt als eine mögliche Therapieerweiterung zu Daratumumab weiter untersucht werden. Aufgrund der bisher eher geringen Effekte muss dies jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

### 4.1 Das bispezifische Antikörperformat

Die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten die Fähigkeit der Antikörperkonstrukte spezifisch Antigene zu binden. Dabei zeigten sich jedoch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten beim Vergleich der monovalenten Bindung der drei Antikörperkonstrukte. Ähnliche Unterschiede ergaben sich auch beim Nachweis der simultanen Bindung an beide Antigene. So weist in allen Experimenten

das Konstrukt CD138xNKG2D eine höhere Fluoreszenzintensitätsverschiebung als CS1xNKG2D auf. Dies könnte auf Unterschiede in der Expressionsdichte der Antigene zurückzuführen sein, da auch die Inkubation mit Elotuzumab sowie mit dem CD138-PE Antikörper ähnliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität wie in den Experimenten mit den Konstrukten zeigen. Des Weiteren zeigen sich Unterschiede für den EC<sub>50</sub>-Wert der Bindung und dem K<sub>D</sub>-Wert. Unter den Bedingungen der FACS-Analysen konnte eine höhere Affinität von CD138xNKG2D zu CD138, als die Affinität von CS1xNKG2D zu CS1 berechnet werden. Das CS1xNKG2D Antikörperkonstrukt weist zudem eine 30-mal geringere Affinität als der CS1-gerichtete monoklonale Antikörper Elotuzumab auf (105). Dies könnte im Antikörperformat begründet sein. So zeigten Derocq und Kollegen, für einen CD5-Antikörper, dass die Affinität des Fab-Fragments allein, im Vergleich zum IgG-Antikörper bzw. F(ab')<sub>2</sub>, 7 - 13-fach geringer ist, dies aber nicht die Zytotoxizität des Fab-Konstrukts einschränkt (106). Dies könnte in weiterführenden Experimenten für das vorliegende Antikörperkonstrukt, ebenfalls vergleichend mit einem F(ab')<sub>2</sub>-Tribody untersucht werden. Besonders für das CS1-gerichtete Konstrukt könnten sich aus dem Tribody-Format, weitere Vorteile ergeben. CS1 wird, außer von Zellen des Multiplen Myeloms, auch von NK-Zellen exprimiert. Elotuzumab kann daher über die simultane Bindung von CS1 auf der Zielzelle und auf einer NK-Zelle, die Zytotoxizität von NK-Zellen, CD16-unabhängig, über CS1-CS1-Interaktionen erhöhen (107). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass durch die alleinige Bindung eines Fab-Fragments an CS1 einer NK-Zelle, keine Zytotoxizität ausgelöst werden kann, sondern die zytotoxischen Effekte nur durch F(ab')<sub>2</sub> erreicht werden können (107). In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, ob ein Tribody-Format, mit zwei CS1-gerichteten Fab-Fragmenten und einem NKG2D-gerichtetem scFv, eventuell über Kreuzvernetzungen zytotoxisch noch effektiver sein könnte und damit gegebenenfalls höhere Lyseraten erreicht werden könnte. Weiter hätte dieses Format auch den Vorteil, dass die Größe des Moleküls, im Vergleich zur Molekülgröße eines Bibodys, die Halbwertszeit verlängern würde (34). Dies ist vor allem von Bedeutung, da in der onkologischen Therapie eine langanhaltende Wirkung von Vorteil ist und dies auch die klinische Anwendung vereinfacht. Zusammenfassend ist zukünftig zu untersuchen ob andere Antikörperformate mit gleicher Antigenspezifität dem vorliegenden Format tatsächlich überlegen sind und damit in günstigerer Weise zytotoxisch wirken könnten.

#### **4.2 Bispezifische Antikörper im Vergleich mit natürlichen Liganden**

Weiterhin bietet die Antigenspezifität des Antikörperkonstrukts Vorteile. Das Ablösen von NKG2D-L von der Tumorzelloberfläche stellt einen Mechanismus des Tumors dar, der natürlichen Zytotoxizität des Immunsystems zu entgehen (108,109). So wurde bei Patienten mit Multiplen Myelom eine erhöhte Konzentration von löslichem MICA (sMICA), verglichen mit gesunden Probanden, nachgewiesen (110). Das Antikörperkonstrukt kann, jedoch weiterhin und unabhängig davon, tumorspezifisch über CS1 bzw. CD138 die Oberfläche mit dem NKG2D-scFv für entsprechende Immunzellen markieren und die Aktivierung der NKG2D-Achse erwirken. Außerdem bietet das Antikörperkonstrukt gegenüber dem natürlichen NKG2D-NKG2D-L-System den Vorteil, dass es unabhängig der individuellen NKG2D-L-Polymorphismen bindet. Die natürlichen Liganden von NKG2D weisen eine hohe Anzahl an Polymorphismen auf, welche unter anderem auch deren Oberflächenexpression auf Tumorzellen beeinflusst (111). Des Weiteren können Polymorphismen auch die Affinität zu NKG2D, das Ablösen der Liganden von Oberflächen und letztlich die zytotoxischen Effekte ändern (111). In Zukunft könnten dann Patienten mit einem onkologisch ungünstigen Polymorphismus der NKG2D-L, eine individualisierte Behandlung, welche die natürlichen NKG2D-L umgeht, erhalten. So könnten bispezifische Antikörperkonstrukte, wie CD138xNKG2D oder CS1xNKG2D, bei diesen Patienten bevorzugt zum Einsatz kommen.

#### **4.3 Aktivierung von Effektorzellen und Kreuzvernetzungen**

In Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Bindung des NKG2D-Bibodys dazu führt, dass NK-Zellen aktiviert werden (55). Dies wurde anhand der CD69-Expression von NK-Zellen nach Inkubation mit dem Antikörperkonstrukt und CD20<sup>+</sup> Zielzellen verifiziert. Allerdings konnten diese Ergebnisse bei alleiniger Inkubation des Antikörperkonstrukts mit NK-Zellen ohne CD20<sup>+</sup> Zielzellen, nicht bestätigt werden. Dies führt zu der Annahme, dass die Bindung des NKG2D-scFvs allein keine NK-Zell-Aktivierung auslösen kann, sondern Kreuzvernetzungen dazu notwendig sind. So zeigten die Lysерaten im Chromfreisetzungsvorversuch dieser Arbeit bei der Inkubation allein mit Effektorzellen im Vergleich mit der Inkubation von Effektorzellen und einem der Antikörperkonstrukte keinen signifikanten Unterschied. Damit legen auch die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die alleinige Aktivierung von

NKG2D für die tumorgerichtete Zytotoxizität in diesem Modell keine signifikanten Effekte zeigt und die NK-Zellen wahrscheinlich nicht aktiviert werden.

Die Inkubation von Zielzellen, Effektorzellen und dem bispezifischen CD20-gerichteten Antikörper (CD20xNKG2D) konnte zytotoxische Effekte generieren (55). Dies legt nahe, dass es in diesen Versuchen zu aktivierenden Kreuzvernetzungen kommt, welche die Aktivierung der NK-Zellen ermöglicht. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte die Inkubation mit Zielzellen, Effektorzellen und CD138xNKG2D bzw. CS1xNKG2D keine signifikanten zytotoxischen Effekte zeigen (vgl. Abbildung 19). Insgesamt ist jedoch die Vergleichbarkeit der beiden Versuchsansätze nur bedingt gegeben, als dass verschiedene Zellarten, in diesem Fall CD20<sup>+</sup>-Zellen und Plasmazellleukämiezellen, unterschiedlich sensitiv gegenüber zytotoxischen Effekten sind. Dies zeigt sich ebenso im Vergleich mit den relativen Lyseraten der Lyse-Experimente mit Hinzunahme eines monoklonalen Antikörpers (vgl. (55) und Abbildung 20).

#### **4.4 CD138xNKG2D und CS1xNKG2D zeigen allein keine zytotoxische Aktivität**

Die Antikörperkonstrukte allein zeigten in den Lyse-Experimenten, wie zuvor diskutiert, keinen Effekt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese auch gesundes Gewebe nicht schädigen. Vor einem möglichen in vivo Einsatz, müsste dies jedoch in entsprechenden Versuchen bestätigt werden. Insbesondere CD138 wird physiologisch von Epithelzellen sowie mesenchymalen Zellen exprimiert und ist damit multilokulär in vielen verschiedenen Organsystemen exprimiert (86,87). Gerade aus diesem Grund ist die Schonung gesunden Gewebes eine Voraussetzung für die Verträglichkeit der Therapie. So könnte der Einsatz von CD138xNKG2D, zwar das gesunde Gewebe schonen, jedoch beim gleichzeitigen Einsatz von Daratumumab, tumorzellspezifisch, die zytotoxische Wirkung von Daratumumab verstärken, was als Dual-Dual *Targeting* bezeichnet wird, da durch diese Kombination zwei Zielantigene auf Tumorzellen und zwei aktivierende NK-Zell-Rezeptoren adressiert werden. Die Chromfreisetzungsversuche mit Daratumumab und 4D5xNKG2D könnten einen Hinweis darauf geben. So wurden in diesen Ansätzen ebenfalls L363-Zellen verwendet, welche kein HER2 exprimieren. Das Antikörperkonstrukt 4D5xNKG2D konnte in diesen Ansätzen also nicht an den Zielzellen binden. Unerwarteterweise zeigten sich in diesen Ansätzen zusammen mit Daratumumab eine minimale

Steigerung der Zelllyse. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass Effektorzellen, dual, über NKG2D und den FcR stimuliert wurden und die Zelllyse etwas gesteigert werden konnte. Andere Arbeiten konnten diesen Effekt nicht zeigen (112), sodass diese Hypothese in weiterführenden Experimenten untersucht werden müsste. Dabei müsste auch evaluiert werden, ob sich bei den Konstrukten CD138xNKG2D und CS1xNKG2D ähnliche Effekte zeigen lassen, indem entsprechend CD138<sup>negative</sup> bzw. CS1<sup>negative</sup> Zelllinien eingesetzt werden.

#### **4.5 Zusätzliche Effekte durch die bispezifischen Antikörper und mögliche Kombinationstherapien**

In Zytotoxizitäts-Experimenten wurde simultan mit jedem der Antikörperkonstrukte der monoklonale Antikörper Daratumumab eingesetzt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede, verglichen, zum alleinigen Einsatz von Daratumumab. So konnten simultan verschiedene Effektormechanismen aktiviert werden bzw. ADCC über zwei verschiedene Signalwege verstärkt werden. Daratumumab kann NK-Zellen über den FcR und den ITAM-abhängigen nachgeschalteten Signalweg aktivieren. Die Bindung an NKG2D, über eines der Antikörperkonstrukte, aktiviert dagegen ITAM-unabhängig, PK3I und Gbr2. Damit konnte in diesen Chrom-Freisetzungsversuchen gezeigt werden, dass durch die Zugaben des Antikörperkonstrukts CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D die ADCC gesteigert wird. Dieses sogenannte Dual-Dual-*Targeting* zeigte auch in anderen Arbeiten bereits Erfolge. So konnte dies für den rekombinanten CD20- und ULBP2-gerichteten Immunliganden gezeigt werden (54,112,113). Ebenso zeigten die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit dem Antikörperkonstrukt CD20xNKG2D, dass der Einsatz eines Antikörperkonstrukts zusammen mit Daratumumab synergistisch wirkt (55). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass der simultane Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern keine zusätzliche ADCC-Steigerung ergibt (114). Wahrscheinlich wären dadurch die FcγR-Effektormechanismen in gegenseitiger Konkurrenz (113). In Zukunft müssten die Effekte des Dual-Dual-*Targeting*, wie zuvor für andere rekombinante Konstrukte gezeigt, für CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D mit Patientenproben und letztendlich auch in einem geeigneten Maus-Modell bestätigt werden. Des Weiteren könnten *in vivo* Modelle, zeigen, ob die Kombination auch im Tumormikromillieu entsprechende Erfolge zeigt. Die Kombinationstherapie mit Daratumumab ist auch aus klinischen Aspekten interessant, da Daratumumab bis heute die einzige Antikörpertherapie ist, welche in der Erstlinientherapie zugelassen

ist (115). Außerdem ist zusätzlich zur Kombination von Daratumumab mit CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D, die Kombination von Wirkstoffen anderer etablierter Therapieschemata interessant. So konnte der simultane Einsatz von Bortezomib die NK-Zell-vermittelten anti-Tumor Effekte verbessern, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (116). Die Ergebnisse von Yu et al. zeigen zusätzliche zytotoxische Effekte für die Kombination des monoklonale Antikörper VIS832, welcher gegen CD138 gerichtet ist, mit Bortezomib oder Lenalidomid, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (117). Es wäre also zu untersuchen, ob diese Effekte in Kombination mit Bortezomib oder Lenalidomid und den Konstrukten der vorliegenden Arbeit erreicht werden können. Weiterhin müsste auch untersucht werden, ob auch die klinisch eingesetzten drei- bzw. vierfach Therapien durch die Antikörperkonstrukte optimiert werden könnten.

Eine andere denkbare Kombinationstherapie wäre mit BCMA-CD3-gerichteten bispezifischen Antikörpern wie Teclistamab oder GPRC5D-CD3-gerichteten Talquetamab, welche bereits zur Therapie zugelassen wurden (78,83,118). In Versuchen mit dem CD20-NKG2D-gerichtetem bispezifischen Antikörpern in Kombination mit dem CD19xCD3-gerichteten Blinatumomab, konnte die T-Zell-vermittelte Lyse signifikant gesteigert werden (55). So könnte in entsprechenden Versuchen mit einem BCMA-CD3 gerichteten bispezifischen Antikörper wie Teclistamab und CS1xNKG2D bzw. CD138xNKG2D ebenso untersucht werden, ob die T-Zell-vermittelte Lyse gesteigert werden kann.

Ein anderer Ansatz wäre die Erweiterung der CAR-T-Zell Therapie mit den Antikörperkonstrukten CD138xNKG2D oder CS1xNKG2D. Die zugelassenen CAR-T-Zell Therapien mit Ciltacabtagene autoleucel sowie Idecabtagene vicleucel sind beide gegen BCMA gerichtet. BCMA wird jedoch heterogen exprimiert. Sowohl innerhalb eines Patientenkollektivs als auch innerhalb unterschiedlicher Myelom-Subgruppen eines Patienten kann die BCMA-Expression von BCMA<sup>negativ</sup> bis BCMA<sup>bright</sup> reichen (119). Damit kann die BCMA-gerichtete CAR-T-Zell-Therapie auch bei langer CAR-T-Zell-Persistenz wahrscheinlich nicht alle Myelomzellen erreichen. Die Kombination mit CS1xNKG2D oder CD138xNKG2D könnte daher gegen BCMA<sup>negativ/dim</sup> Populationen zusätzlich zytotoxisch wirken. Weiterhin zeigte sich auch, dass nach einer BCMA-gerichteten Therapie, als Umgehungsmechanismus, die BCMA-Expression auf malignen Plasmazellen reversibel herunter reguliert wird (120). Die Kombinationstherapie mit Daratumumab und CD138xNKG2D bzw. CS1xNKG2D

könnte damit als Therapie bis zur möglichen Re-Exposition mit der BCMA-gerichteten CAR-T-Zell-Therapie genutzt werden. Diese und weitere Überlegungen könnten nach sorgfältiger Prüfung *in vitro* und *in vivo* zukünftig die Therapiestrategie für das Multiple Myelom erweitern und somit der Therapieverbesserung einen Schritt näherkommen.

#### 4.6 Optimierung durch IL-2 und IL-15

Andere weiterführende Versuche könnten die Funktionalität der Antikörperkonstrukte weiter charakterisieren. Für die Antikörperkonstrukte CD138xNKG2D und CS1xNKG2D gibt es keine Daten zu Zytotoxizitäts-Experimenten mit stimulierten NK-Zellen. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen durch IL-2 und IL-15 stimuliert, expandiert und aktiviert werden können (121,122). Des Weiteren wurde auch die Zytokinausschüttung zum Beispiel von NK-Zellen durch die Interaktion mit den Antikörperkonstrukten noch nicht untersucht. Chan und Kollegen konnten mit einem ähnlichen bispezifischen CS1-NKG2D gerichteten Antikörper vielversprechende Ergebnisse zeigen. Die NK-Zellen, die in diesen Versuchen verwendeten MNC wurden zuvor mit IL-2 aktiviert (123). Damit konnten die Lyseraten im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert werden (123). Das in der vorliegenden Arbeit hergestellte Antikörperkonstrukt CS1xNKG2D zeigte auch ohne IL-2 mit MNC und Daratumumab teilweise signifikant erhöhte Lyseraten. Eventuell könnten diese Ergebnisse durch die Stimulation von MNC mit IL-2 noch verbessert werden. Des Weiteren konnten Chan und Kollegen zeigen, dass mit den IL-2-aktivierten MNC und dem bispezifischen Konstrukt die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) angeregt wurde. Dabei kann die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen sowohl die Expression von TNF-related-apoptosis-inducing Ligand (TRAIL), als auch die Sensibilisierung desselben bewirken (124). Dies könnte ebenfalls ein Effekt des CS1xNKG2D Konstrukts sein und könnte in einem ähnlichen Versuch untersucht werden. Mit dem CD16-BCMA gerichteten *innate cell engager* (ICE) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Hinzugabe von IL-15, die Zytotoxizität gesteigert werden konnte (125). Dabei wäre eine Kombination mit den hier verwendeten bispezifischen Antikörperkonstrukten ein weiterer interessanter Aspekt, um gegebenenfalls noch bessere Lyseraten zu erzielen.

Die NKG2D-gerichteten bispezifischen Antikörperkonstrukte zeigten in dieser Arbeit nicht nur ihre Funktionalität, sondern werfen auch neue Fragestellungen zur Verbesserung der Antikörperkonstrukte auf. In Zukunft werden weiterführende *in vitro* und *in vivo* Versuche nötig sein, um die Effektivität abschließend zu bewerten und damit klinische Studien in Aussicht zu stellen. Nach sorgfältiger Prüfung könnten CS1xNKG2D und CD138xNKG2D einen neuartigen Therapieansatz darstellen oder etablierte Therapien erweitern. Dies könnte in Zukunft dann der Schlüssel zu verbesserten, klinischen Langzeitergebnissen sein und letztendlich möglicherweise zur Heilung des Multiplen Myeloms beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine unheilbare, maligne Erkrankung, welche durch Rezidive gekennzeichnet ist. Die Therapie dieser hämatologischen Neoplasie umfasst, neben der Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation und verschiedener Chemotherapiekombinationen auch immuntherapeutische Ansätze. Das Potential der Immuntherapie könnte durch die Entwicklung neuartiger Strategien noch weiter ausgeschöpft werden. Dies ist vor allem in Hinblick auf die Therapieresistenzmechanismen notwendig. Dabei gewinnen bispezifische Antikörper immer mehr an Bedeutung. Bispezifische Antikörper können gezielt Effektorpopulationen in die räumliche Nähe der Tumorzellen bringen und durch Effektormechanismen die Zelllyse auslösen. Aktuell werden in klinischen Studien Therapieansätze mit bispezifischen Antikörpern, welche auf die Rekrutierung von T-Zellen zielen, überprüft. Triggermoleküle, wie NKG2D können sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen rekrutieren und somit Immunantworten modulieren oder aktivieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit NKG2D als Triggermolekül in bispezifischen Antikörpern zur Aktivierung von Effektorzellen eingesetzt und damit spezifisch gegen Myelomzellen gerichtet werden kann. Dazu wurden NKG2D-gerichtete bispezifische Antikörper, die zusätzlich gegen die Antigene CD138 bzw. CS1 auf Zellen des Multiplen Myeloms gerichtet sind, hergestellt und charakterisiert. Die beiden bispezifischen Antikörperkonstrukte konnten erfolgreich in Säugerzellen hergestellt werden und zeigten spezifische mono- bzw. bivalente Bindungen an ihre Zielantigene CD138, CS1 und NKG2D. In Analysen zur Zytotoxizität mit Tumorzellen und mononukleären Zellen (MNC) zeigten beide Antikörperkonstrukte als Einzelsubstanz keine Verstärkung der NK-Zell-vermittelten Lyse. Der simultane Einsatz des klinisch eingesetzten monoklonalen Antikörpers Daratumumab im selben Versuchsaufbau mit jeweils einem der Antikörperkonstrukte zeigte jedoch signifikant erhöhte Lyseraten. Die Lyseraten wurden dabei mit dem alleinigen Einsatz von Daratumumab verglichen.

Die positiven Ergebnisse geben Hinweise, dass das Adressieren von zwei verschiedenen aktivierenden Signalwegen eine zusätzliche Steigerung der Effektorzell-vermittelten Lyse bewirken kann. Somit konnte gezeigt werden, dass NKG2D als Triggermolekül effektiv eingesetzt werden kann. Es sind jedoch weitere Versuche zur näheren Charakterisierung der vermittelten Mechanismen notwendig. Außerdem können die Ergebnisse darauf hinweisen, dass das Potential der klinischen

Therapie mit Daratumumab noch weiter ausgeschöpft werden könnte, da durch den simultanen Einsatz des bispezifischen Antikörperkonstrukts der untersuchte Effektormechanismus gesteigert werden konnte. NKG2D-gerichtete bispezifische Antikörper, die Myelomzellen adressieren, sind damit ein möglicher Ansatz, der durch weiterführende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen verfolgt werden muss. Zukünftig könnten dann diese oder ähnliche Antikörperperformate die Effektivität der Therapie des Multiplen Myeloms in ihrer Wirkung verstärken und erfolgreich klinisch angewendet werden.

## Literaturverzeichnis

1. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(6):473–80.
2. Ehrlich P. Croonian lecture - On immunity with special reference to cell life. Vol. 66, *Proceedings of the Royal Society of London.* 1900. p. 424–32.
3. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire yG immunglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 Mar 21;63:78–85.
4. Porter RR. Structural Studies of Immunoglobulins. *Science* (1979). 1973 May 18;180(4087):713–6.
5. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. 914–914 p. (Springer-Lehrbuch).
6. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495–7.
7. Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* (1979). 1979;206(4416):347–9.
8. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy1. *Cancer Res.* 1985;45:879–85.
9. Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol.* 1985 Aug;135(2):1530–5.
10. Boulianne GL, Nobumichi H, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 1984;312:643–6.
11. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, 01i VT. Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Nati Acad Sci USA.* 1984;81:6851–5.
12. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997 Sep 15;90(6):2188–95.

13. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):435–45.
14. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986;321:522–5.
15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*. 2001 Mar 15;344(11):783–92.
16. Giusti RM, Shastri KA, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA Drug Approval Summary: Panitumumab (Vectibix<sup>TM</sup>). *Oncologist*. 2007 May;12(5):577–83.
17. Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 2007 Oct;25(10):1134–43.
18. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348:552–4.
19. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu Rev Immunol*. 1994 Apr;12(1):433–55.
20. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011 Aug 25;365(8):725–33.
21. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2021 Feb 25;384(8):705–16.
22. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2021. *MAbs*. 2021 Jan 1;13(1):1860476.
23. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun 22;15(6):361–70.
24. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr 22;12(4):278–87.
25. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010 Jan;20(1):34–50.

26. Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012 Feb;22(1):3–13.
27. DiLillo DJ, Ravetch J V. Differential Fc-receptor engagement drives an anti-tumor vaccinal effect. *Cell.* 2015 May 21;161(5):1035–45.
28. Redman JM, Hill EM, AlDeghaither D, Weiner LM. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol.* 2015 Oct 1;67(2):28–45.
29. De Haij S, Jansen JHM, Boross P, Beurskens FJ, Bakema JE, Bos DL, et al. In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res.* 2010 Apr 15;70(8):3209–17.
30. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch J V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6(4):443–6.
31. Kellner C, Derer S, Valerius T, Peipp M. Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods.* 2014 Jan 1;65(1):105–13.
32. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (1979).* 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
33. Zander H, Müller-Egert S, Zwiewka M, Groß S, van Zandbergen G, Engelbergs J. Checkpointinhibitoren in der Tumortherapie. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2020 Nov 1;63(11):1322–30.
34. Kontermann RE. Strategies to Extend Plasma Half-Lives of Recombinant Antibodies. *Biodrugs.* 2009;23(2):93–109.
35. Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol Ther.* 2018 May;185:122–34.
36. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gökbuget N, Topp MS, et al. Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome–Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2017 Jun 1;35(16):1795–802.
37. Pillarisetti K, Powers G, Luistro L, Babich A, Baldwin E, Li Y, et al. Teclistamab is an active T cell–redirecting bispecific antibody against B-cell maturation antigen for multiple myeloma. *Blood Adv.* 2020 Sep 22;4(18):4538–49.
38. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science (1979).* 1999 Jul 30;285(5428):727–9.

39. Lazarova M, Steinle A. The NKG2D axis: an emerging target in cancer immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2019 Apr 3;23(4):281–94.
40. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*. 2001 May 1;2(5):443–51.
41. Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science (1979)*. 1999 Jul 30;285(5428):730–2.
42. Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):524–32.
43. Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. *Immunity*. 2001;14:123–33.
44. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun*. 2013 May 1;13:8.
45. Lanier LL. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(6):1–10.
46. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity*. 2008 Apr 11;28(4):571–80.
47. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):713–25.
48. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker j, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255–60.
49. Perez C, Prajapati K, Burke B, Plaza-Rojas L, Zeleznik-Le NJ, Guevara-Patino JA. NKG2D signaling certifies effector CD8 T cells for memory formation. *J Immunother Cancer*. 2019 Dec 18;7(1):48.
50. Soderquest K, Walzer T, Zafirova B, Klavinskis LS, Polić B, Vivier E, et al. Cutting Edge: CD8 + T Cell Priming in the Absence of NK Cells Leads to Enhanced Memory Responses. *The Journal of Immunology*. 2011 Mar 15;186(6):3304–8.

51. Trembath AP, Markiewicz MA. More than Decoration: Roles for Natural Killer Group 2 Member D Ligand Expression by Immune Cells. *Front Immunol.* 2018 Feb 12;9:1–9.
52. Peipp M, Klausz K, Boje AS, Zeller T, Zielonka S, Kellner C. Immunotherapeutic targeting of activating natural killer cell receptors and their ligands in cancer. *Clin Exp Immunol.* 2022 Jul 22;209(1):22–32.
53. Von Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS, Schnell R, Borchmann P, Merkert S, et al. A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood.* 2006;107(5):1955–62.
54. Kellner C, Hallack D, Glorius P, Staudinger M, Mohseni Nodehi S, de Weers M, et al. Fusion proteins between ligands for NKG2D and CD20-directed single-chain variable fragments sensitize lymphoma cells for natural killer cell-mediated lysis and enhance antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Leukemia.* 2012 Apr 18;26(4):830–4.
55. Lutz S, Klausz K, Albici AM, Ebinger L, Sellmer L, Teipel H, et al. Novel NKG2D-directed bispecific antibodies enhance antibody-mediated killing of malignant B cells by NK cells and T cells. *Front Immunol.* 2023 Oct 27;14:1–13.
56. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th, revised ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 417 p.
57. Wörmann B, Driessen C, Einsele H, Gunsilius E, Kortüm M, Kröger N, et al. Onkopedia das Leitlinienportal der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie). 2018. Multiples Myelom. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html?searchterm=multiples+mye>
58. Gerecke C, Fuhrmann S, Strifler S, Schidth-Hieber M, Einsele H, Knop S. Diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;(Table 1):637–63.
59. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):538–48.
60. International Myeloma Working Group [Internet]. [cited 2022 Jan 15]. Available from: <https://www.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-diagnosis-multiple-myeloma>

61. Panopoulou A, Streetly MJ. Myeloma and MGUS. *Medicine*. 2017 May;45(5):311–7.
62. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(25):2582–90.
63. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2019 May 21;10(1121):1–17.
64. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012 May 12;12(5):335–48.
65. Rasche L, Weinhold N. Pathogenesis of multiple myeloma. *Internist*. 2019 Jan 1;60(1):3–9.
66. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: from biology findings to treatment approaches. *Blood*. 2019 Apr 4;133(14):1534–9.
67. Ria R, Vacca A. Bone Marrow Stromal Cells-Induced Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 17;21(2):613.
68. Bhutani M, Foureau DM, Atrash S, Voorhees PM, Usmani SZ. Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia*. 2020 Jan 27;34(1):1–20.
69. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *The Lancet*. 2015;385(9983):2197–208.
70. Palumbo A, Anderson KC. Multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2011;59(7):627–30.
71. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, et al. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*. 2011;186(3):1840–8.
72. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 25;375(8):754–66.
73. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2015 Aug 13;373(7):621–31.

74. Dimopoulos MA, Lonial S, Betts KA, Chen C, Zichlin ML, Brun A, et al. Elotuzumab plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: Extended 4-year follow-up and analysis of relative progression-free survival from the randomized ELOQUENT-2 trial. *Cancer*. 2018;124(20):4032–43.
75. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: Evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(12):1841–9.
76. Topp MS, Duell J, Zugmaier G, Attal M, Moreau P, Langer C, et al. Anti-B-Cell Maturation Antigen BiTE Molecule AMG 420 Induces Responses in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2020 Jan 2;38(8):775–83.
77. Moreau P, Garfall AL, van de Donk NWCJ, Nahi H, San-Miguel JF, Oriol A, et al. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2022 Aug 11;387(6):495–505.
78. Tecvayli | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Oct 27]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecvayli>
79. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2019 May 2;380(18):1726–37.
80. Abecma | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Oct 27]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma>
81. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *The Lancet*. 2021 Jul 24;398(10297):314–24.
82. Carvykti | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Nov 2]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/carvykti>
83. Talvey | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Oct 27]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/talvey>
84. Chari A, Minnema MC, Berdeja JG, Oriol A, van de Donk NWCJ, Rodríguez-Otero P, et al. Talquetamab, a T-Cell-Redirecting GPRC5D Bispecific Antibody for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2022 Dec 15;387(24):2232–44.

85. Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Prabhu SA, Gliksman M, Tai B, et al. Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine. *Oncotarget*. 2015 Jul 22;6(30):28694–715.
86. Uhlén M, Thul PJ, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E. Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2021 Feb 19]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115884-SDC1/blood>
87. Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Al-Khalili Szigyarto C, et al. A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008 Oct;7(10):2019–27.
88. Kind S, Merenkov C, Büscheck F, Möller K, Dum D, Chirico V, et al. Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Dis Markers*. 2019 Dec 30;2019:1–11.
89. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(4):482–8.
90. Teng YHF, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology*. 2012 Jan;31(1):3–16.
91. Dhodapkar M V., Sanderson RD. Syndecan-1 (CD 138) in Myeloma and Lymphoid Malignancies: A Multifunctional Regulator of Cell Behavior Within the Tumor Microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 1999 Jan;34(1–2):35–43.
92. Sun C, Mahendravada A, Ballard B, Kale B, Ramos C, West J, et al. Safety and efficacy of targeting CD138 with a chimeric antigen receptor for the treatment of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2019 Mar 22;10(24):2369–83.
93. Kelly KR, Ailawadhi S, Siegel DS, Heffner LT, Somlo G, Jagannath S, et al. Indatuximab ravtansine plus dexamethasone with lenalidomide or pomalidomide in relapsed or refractory multiple myeloma: a multicentre, phase 1/2a study. *Lancet Haematol*. 2021 Nov 1;8(11):794–807.
94. van der Schans JJ, Wang Z, van Arkel J, van Schaik T, Katsarou A, Ruiter R, et al. Specific Targeting of Multiple Myeloma by Dual Split-signaling Chimeric Antigen Receptor T cells Directed against CD38 and CD138. *Clinical Cancer Research*. 2023 Oct 13;29(20):4219–29.
95. Veillette A, Guo H. CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Oct;88(1):168–77.

96. Boles KS, Mathew PA. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics*. 2001;52(3–4):302–7.
97. Kumaresan PR, Lai WC, Chuang SS, Bennett M, Mathew PA. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol Immunol*. 2002 Sep;39(1–2):1–8.
98. Tai YT, Dillon M, Song W, Leiba M, Li XF, Burger P, et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieus. *Blood*. 2008;112(4):1329–37.
99. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(7):621–31.
100. Shah UA, Mailankody S. Emerging immunotherapies in multiple myeloma. *BMJ*. 2020 Sep 21;370(m3176):1–19.
101. Gogishvili T, Danhof S, Prommersberger S, Rydzek J, Schreder M, Brede C, et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7+ normal lymphocytes. *Blood*. 2017;130(26):2838–47.
102. Li C, Xu J, Luo W, Liao D, Xie W, Wei Q, et al. Bispecific CS1-BCMA CAR-T cells are clinically active in relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2024 Jan 17;38(1):149–59.
103. Hudis CA. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine*. 2007 Jul 5;357(1):39–51.
104. Lee YJ, Wu CC, Li JW, Ou CC, Hsu SC, Tseng HH, et al. A rational approach for cancer stem-like cell isolation and characterization using CD44 and prominin-1(CD133) as selection markers. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):78499–515.
105. Manning ML. Pharmacology Reviews: Empliciti (elotuzumab). 2015 Jun.
106. Derocq JM, Casellas P, Laurent G, Ravel S, Vidal H, Jansen F. Comparison of the cytotoxic potency of T101 Fab, F(ab')2 and whole IgG immunotoxins. *J Immunol*. 1988 Oct 15;141(8):2837–43.
107. Pazina T, James AM, Colby KB, Yang Y, Gale A, Jhatakia A, et al. Enhanced SLAMF7 homotypic interactions by elotuzumab improves NK cell killing of multiple myeloma. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(10):1633–46.

108. Xing S, Ferrari de Andrade L. NKG2D and MICA/B shedding: a 'tag game' between NK cells and malignant cells. *Clin Transl Immunology*. 2020 Jan 22;9(12):1–10.
109. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*. 2006 Mar 1;66(5):2520–6.
110. Zingoni A, Cecere F, Vulpis E, Fionda C, Molfetta R, Soriani A, et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *The Journal of Immunology*. 2015 Jul 15;195(2):736–48.
111. Zuo J, Mohammed F, Moss P. The Biological Influence and Clinical Relevance of Polymorphism Within the NKG2D Ligands. *Front Immunol*. 2018 Aug 16;9(01820).
112. Kellner C, Günther A, Humpe A, Repp R, Klausz K, Derer S, et al. Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *Oncoimmunology*. 2016 Jan 2;5(1):e1058459.
113. Kellner C, Gramatzki M, Peipp M. Promoting natural killer cell functions by recombinant immunoligands mimicking an induced self phenotype. *Oncoimmunology*. 2013 Jun 27;2(6):e24481.
114. Klitgaard JL, Koefoed K, Geisler C, Gadeberg O V., Frank DA, Petersen J, et al. Combination of two anti-CD5 monoclonal antibodies synergistically induces complement-dependent cytotoxicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2013 Oct;163(2):182–93.
115. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos M V., Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2021 Mar 1;32(3):309–22.
116. Hallett WHD, Ames E, Motarjemi M, Barao I, Shanker A, Tamang DL, et al. Sensitization of Tumor Cells to NK Cell-Mediated Killing by Proteasome Inhibition. *The Journal of Immunology*. 2008 Jan 1;180(1):163–70.
117. Yu T, Chaganty B, Lin L, Xing L, Ramakrishnan B, Wen K, et al. VIS832, a novel CD138-targeting monoclonal antibody, potently induces killing of human multiple myeloma and further synergizes with IMiDs or bortezomib in vitro and in vivo. *Blood Cancer J*. 2020 Nov 2;10(11):110.

118. Zhao J, Ren Q, Liu X, Guo X, Song Y. Bispecific antibodies targeting BCMA, GPRC5D, and FcRH5 for multiple myeloma therapy: latest updates from ASCO 2023 Annual Meeting. *J Hematol Oncol.* 2023 Aug 3;16(92):1–4.
119. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 Feb 25;18(2):71–84.
120. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, van der Stegen SJC, Giavridis T, Mansilla-Soto J, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature.* 2019 Apr 4;568(7750):112–6.
121. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994 Oct 1;180(4):1395–403.
122. Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, Todryk S, Hegarty JE, Feighery C, et al. Selective Expansion and Partial Activation of Human NK Cells and NK Receptor-Positive T Cells by IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology.* 2001 Sep 15;167(6):3129–38.
123. Chan WK, Kang S, Youssef Y, Glankler EN, Barrett ER, Carter AM, et al. A CS1-NKG2D bispecific antibody collectivel activates cytolytic immune cells against multiple myeloma. *Cancer Immunol Res.* 2018 Jul 1;6(7):776–87.
124. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005 Feb;42(4):501–10.
125. Kakiuchi-Kiyota S, Ross T, Wallweber HA, Kiefer JR, Schutten MM, Adedeji AO, et al. A BCMA/CD16A bispecific innate cell engager for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia.* 2022 Apr 1;36(4):1006–14.
126. van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. *Cancer Res.* 2018 May 15;78(10):2449–56.
127. Shah UA, Mailankody S. CAR T and CAR NK cells in multiple myeloma: Expanding the targets. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2020 Mar 1;33(1):101141.

## Anhang

**Tabelle 13** Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz</b>
Autoklav VX150	Systec, Linden
AF 206 Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Chicago, IL, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
<i>Blockheater</i>	Bibby Scientific, Stone, UK
ChemiDoc™ XRS + System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Certomat BS-T Schüttelinkubator	Satorius Stedim Biotech, Göttingen
Durchflusszytometer (Epics/Navios 10/3)	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
E.A.S.Y 440K Gel-Dokumentationskammer	HeroLAB, Wiesloch
Eppendorf Reference Pipette	Eppendorf, Hamburg
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Gel-Gieß-Vorrichtung (PAGE)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Glasplatten und Kämme	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Gefrierschrank Kendro Typ HFU 686 Top	Heraeus, Hanau
Hera Cell 240 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hera safe Reinluftbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HeroLab Transilluminator	HeroLAB, Wiesloch
HAT infors Schüttelinkubator	Infors HAT, Einsbach
Kühlschrank	Liebherr, Bulle
Laboport Pumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Lichtmikroskop (Axiovert 40c/Axiostarplus)	Carl Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer RCT basic	Merck, Darmstadt
MAXCyte STX-Einheit	Maxcyte, Inc., Gaithersburg, MA, USA
<i>MicroBeta TriLux 1450 LSC &amp; Luminescence Counter</i>	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

<i>Micro Pulser Electroporator</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Mikrowelle	Continent, Bordeaux, FR
MilliQ A10	Merck, Darmstadt
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna instruments, Vöhringen
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
<i>PowerPac HC Universal Power Supply</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Schüttler 3006	GFL, Burgwedel
Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Universal Hood II Imager	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wide Mini-Sub Cell GT Agarosegelkammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
<i>Wide Mini Protean 3 Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
XB 2200C Waage Prescisa	PESA, Wetzikon, CH

Tabelle 14 Labormaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Bechergläser	Schott, Mainz
Biosphere Fil. Tips farblos (10/ 100/ 1250 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Dialysierschlauch, Cellulose Typ	Roth, Karlsruhe
Drigalskispatel	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	Feather, Osaka, JPN
Elektroporationsküvette Gene Pulser Cuvette	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Elektroporationsküvetten für MAXCyte (OC-400)	Maxcyte, Inc., Gaithersburg, MA, USA
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

<i>Extra Thick Blot Filter Paper</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Flaschen mit Schraubverschluss	Schott, Mainz
Handschuhe Latex (peha-soft, puderfrei)	Hartmann Group, Bellevue, WA, USA
Handschuhe Nitril (nitra-tex)	Ansell Healthcare, Richmond, AUS
Kanülen	Becon Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten, UVette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Messzylinder	Kartell, Noviglio, I
Micro-Schraubröhrchen, 1,5 ml/ 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm Verschlussfolie	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen, 10/ 200/ 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plateseal Folie	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Poly-Prep-Chromatographie Tropfsäule	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
PVDF-Membran, Amershan Hybond-P	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Röhrchen, 15/ 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Safe Seal micro tube, 1,5 ml/ 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten, 2/ 5/ 10/ 25/ 50 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette, 8.2 ml, 9 NC	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Millipore Express Plus, (groß 0,22 µm	Merck, Darmstadt
Sterilfilter Acrodisc Syringe (klein) 0,22 µm	Pall, Part Washington, NY, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Vivaspin 6 Ultrafiltrationssäulen	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen CHO-S	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb	Becon Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
6-, 10-, 96-well Platte (flacher und runder Boden)	Sarstedt, Nümbrecht

**Tabelle 15** Zellkulturmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz</b>
<i>Accutase solution</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD CHO Medium (1x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

CD OptiCHO	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CHO CD EfficientFeed	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fetales Kälber Serum (FCS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GlutaMAX	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HAT Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HT Supplement	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MaxCyte-Elektroporationspuffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
McCoy's 5A ( <i>modified</i> ) Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Penicillin und Streptomycin (PenStrep)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pluronic F68	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ) Medium 1640 (1x) + GlutaMAX	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Sodium Butyrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Yeastolate TC UF	Becon Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA

**Tabelle 16** Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Lonza, Basel, CH
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Blotting-Grade Blocker</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<i>CH1-XL Affinity Matrix</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<sup>51</sup> Chromium	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Comassie Brilliant Blue R 250	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
<i>Gel Loading Dye Purpel</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
<i>Natriumbutyrate (1 mM)</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Roti Blue	Carl Roth, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Steriles Wasser	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>Szintillationslösung (Optiphase Hisafe 3)</i>	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
2x YT	Carl Roth, Karlsruhe
10x PBS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
6x DNA-Ladepuffer	Carl Roth, Karlsruhe

**Tabelle 17** Verwendete Kits

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz</b>
<i>Detection Kit WB</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>NucleoSpin Plasmid Kit</i>	Machery-Nagel, Düren
<i>NucleoBond Xtra Maxi Kit</i>	Machery-Nagel, Düren
<i>NucleoBond PC EF Kit (AX 2000, Mega)</i>	Machery-Nagel, Düren
<i>Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>QIAquick Gelextraction Kit</i>	Qiagen, Venlo, NL

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp für die Überlassung des spannenden Themas und die Möglichkeit zur Promotion in der Arbeitsgruppe. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp für die hervorragende Betreuung, die Hilfestellung bei der wissenschaftlichen Problemlösung sowie meiner dadurch entstandenen Begeisterung für experimentell wissenschaftliches Arbeiten danken.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Laborteam für die lehrreiche und schöne Zeit. Hier gilt mein Dank Dr. rer. nat. Sebastian Lutz für die Betreuung und Einführung in die Laborarbeit. Für die Geduld und das Verständnis in der Einarbeitungszeit sowie der Beantwortung aller Fragen bezüglich Methoden und Geräte möchte ich mich außerdem besonders bei Britta von Below und Anja Muskulus sowie Anna Böttiger bedanken.

Weiterhin möchte ich ein großes Dankeschön an Dr. rer. nat. Carina Gehlert und Dr. rer. nat. Dorothee Winterberg für die Genauigkeit und Geduld beim Korrekturlesen sowie den Denkanstößen zur weiteren Verbesserung der Arbeit aussprechen. Die gemeinsame Zeit mit Euch im Labor hat mir jeden Tag Spaß gemacht.

Mein Dank gilt Sven Cuntz, der es weiß mich in allen Lebens- und Gemütslagen zu unterstützen und mir auch bei diesem Thema in Diskussion und Rat zur Seite stand.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: insbesondere meinen Eltern Elisabeth und Christof Ebinger, welche mir das Studium und damit auch die Promotion erst ermöglichten und die mich zu jeder Zeit unterstützen. Und meiner Großmutter Margarete Ebinger<sup>†</sup>, die mich in meinem Lebensweg stets ermutigte und unterstützte. Danke an meine Geschwister Alexa und Luca Ebinger, ich konnte bei Allem auf Euch zählen.

**Affidavit****Eidesstattliche Versicherung**

Ebinger, Lea Luisa Dorothea

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:  
Entwicklung NKG2D-gerichteter bispezifischer Antikörper zur Therapie des Multiplen  
Myeloms

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient  
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,  
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der  
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades  
eingereicht wurde.

Heidelberg, den 29.02.2024

## Publikationen

Lutz S., Albici A.-M., Ebinger L., Teipel H., Frenzel A., Langner A., Krohn S., Hust M., Schirrmann T., Dübel S., Scherließ R., Humpe A., Gramatzki M., Klausz K., Kellner C., Peipp M. (2022): **Neue NKG2D-gerichtete bispezifische Antikörper verstärken die antikörpervermittelte Lyse von Lymphomzellen durch NK- und T-Zellen.** Oncol. Res. Treat., 45 (suppl. 2), 11 – 346.

Lutz S, Klausz K, Albici A-M, Ebinger L, Sellmer L, Teipel H, Frenzel A, Langner A, Winterberg D, Krohn S, Hust M, Schirrmann T, Dübel S, Scherließ R, Humpe A, Gramatzki M, Kellner C and Peipp M (2023): **Novel NKG2D-directed bispecific antibodies enhance antibody-mediated killing of malignant B cells by NK cells and T cells.** Front. Immunol. 14:1227572. doi: 10.3389/fimmu.2023.