

Thomas Konatschnig

Dr. med.

Zur Komplementresistenz maligner Tumoren: Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung rekombinanter chimärer Antikörperfragmente gegen den membrangebundenen Komplementregulator CD59 sowie das Lymphozyten-assoziierte Oberflächenantigen CD19

Geboren am 24.02.1979 in Celle

Staatsexamen am 24.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. vet. M. Kirschfink

Trotz des raschen medizinischen Fortschritts in den letzten Jahrzehnten stellen Krebserkrankungen nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in den Industriestaaten dar. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Komplementresistenz vieler Tumoren sowohl in der Pathogenese als auch hinsichtlich der unzureichenden therapeutischen Beeinflussbarkeit bösartiger Neoplasien eine zentrale Bedeutung zukommt. Die Überexpression membrangebundener Komplementregulatoren, insbesondere CD59 (Protectin), konnte hierbei als wesentlicher Resistenzmechanismus identifiziert werden. Durch Blockade dieser Regulatoren mittels monoklonaler Antikörper konnte in einer Vielzahl von in-vitro Studien eine deutliche Steigerung der Tumorzell-Lyse erzielt werden.

Während murine monoklonale Antikörper aufgrund ihres hohen immunogenen Potenzials und ihrer ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften (lange Plasmahalbwertszeit, geringe Tumorpenetration etc.) nur begrenzt klinisch anwendbar sind, zeichnen sich rekombinant hergestellte chimäre bzw. humanisierte Antikörper und v.a. Antikörperfragmente durch eine wesentlich bessere Verträglichkeit und pharmakologische Steuerbarkeit aus.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Herstellung chimärer Antikörperfragmente gegen den Komplementregulator CD59 und ihre funktionelle Charakterisierung bezüglich ihrer Fähigkeit zur Tumorzellbindung und Tumorzell-Lyse in vitro. Da Komplementregulatoren wie CD59 von nahezu allen kernhaltigen Zellen in unterschiedlichem Maße exprimiert

werden, sollte im Hinblick auf eine höhere Tumorzellspezifität zusätzlich der Versuch unternommen werden, bispezifische chimäre Antikörperfragmente gegen CD59 und den B-Zellmarker CD19 herzustellen.

Hierzu wurden zunächst die Gene für die variablen Regionen des monoklonalen Antikörpers MEM43, der gegen CD59 gerichtet ist, in den bakteriellen Expressionsvektor pHOG21 kloniert und ein α -CD59-scFv-Fragment exprimiert. Nach Feststellung der Bindungsfähigkeit dieses Antikörperfragments wurde die α -CD59-scFv-DNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pLNOH2 kloniert und mit dem Fc-Abschnitt von humanem IgG3 fusioniert. Ebenso wurde die DNA für einen α -CD19-scFv in den Vektor pLNOH2 kloniert und mit dem Fc-Abschnitt von humanem IgG1 fusioniert. Durch Doppeltransfektion eukaryotischer Zellen mit beiden Vektoren ist es so prinzipiell möglich, bispezifische IgG1/IgG3-Hybridantikörper zu produzieren.

Eukaryotische CHO-Zellen wurden sequentiell oder simultan mit den beiden verschiedenen Vektoren transfiziert, per Grenzverdünnungsmethode vereinzelt und mittels Durchflusszytometrie auf Antikörperproduktion geprüft. Antikörperproduzierende Klone wurden selektiert und subkloniert. Neben Klonen, die nur Antikörper einer Spezifität (α -CD19 oder α -CD59) sezernierten, konnten auch Klone, die Antikörper gegen beide Antigene produzieren, etabliert werden. Allerdings handelte es sich nur um jeweils monospezifische α -CD19-IgG1- und α -CD59-IgG3-Homodimere; die Bildung bispezifischer α -CD19* α -CD59-IgG1/IgG3-Heterodimere konnte nicht beobachtet werden.

Anti-CD59-scFv-Fc-Fragmente wurden zur weiteren Charakterisierung aus dem Zellkulturüberstand gereinigt und nach Demonstration ihrer Bindungsfähigkeit an CD59⁺-Tumorzellen bezüglich ihrer komplementaktivierenden und CD59-blockierenden Wirkung geprüft. Zwar konnte weder an kernhaltigen humanen Tumorzellen noch an kernlosen humanen Erythrozyten eine Steigerung der komplementvermittelten Zell-Lyse beobachtet werden - eine funktionelle Blockade des Komplementregulators CD59 scheint durch dieses Antikörperfragment somit nicht zu erfolgen; allerdings gelang es, nach Bindung des α -CD59-scFv-Fc-Fragments die Ablagerung von C1q und C3 auf den Tumorzellen als Zeichen der Aktivierung des klassischen Weges mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen. Hiermit wäre die Grundlage für die Rekrutierung proinflammatorischer Effektorzellen an die Tumorzelle gegeben. Durch oberflächengebundenes C3 kann z.B. die Induktion einer zytotoxischen Reaktion durch NK-Zell-Aktivierung erreicht werden, was in weiteren funktionellen Tests für das hier erhaltene Antikörperfragment zu prüfen wäre.

Insgesamt ist festzustellen, dass das exprimierte α -CD59-Antikörperkonstrukt die in es gesetzten Erwartungen nur teilweise erfüllen konnte. Es konnte die Grundlage geschaffen werden für die rekombinante Generierung von chimären Anti-Komplementregulator-Antikörperfragmenten, die - aufgrund der Ubiquität humaner Komplementregulatoren - nach Kopplung mit spezifischen Anti-Tumor-Antikörpern eine Erweiterung des therapeutischen Spektrums gegen eine Vielzahl von Tumoren darstellen könnten.