

Moritz Christian Niesert

Dr. med.

Entwicklung, Charakterisierung und funktionelle Analyse eines humanen Anti-CD47-Antikörpers zur Immuntherapie maligner Erkrankungen.

Fach/Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Jürgen Krauss

CD47 ist ein ubiquitäres Membranprotein und ein entscheidender, an zahlreichen Funktionen beteiligter, marker of self. Insbesondere die inhibitorische Wirkung auf Makrophagen über Interaktion mit SIRP α ist wichtig für Zellumsatz und -homöostase. Die Überexpression von CD47 auf einer Vielzahl maligner Tumore, vor allem auf zirkulierenden Krebsstammzellen verschiedener Entitäten, ist ein für Metastasierung und Gesamtüberleben negativer prognostischer Marker und ein neues vielversprechendes Ziel für die immunmodulatorische Therapie.

In vorangegangenen Arbeiten konnte die Wirksamkeit einer Antikörper-vermittelten Blockade der CD47-SIRP α Interaktion in vitro und in vivo, als Einzeltherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, belegt werden. Zurzeit befinden sich mehrere Anti-CD47 Konstrukte in der klinischen Entwicklung.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines vollhumanen Anti-CD47-Antikörpers aus der LyNDAL Phage Display Bibliothek, dessen Reformation in ein IgG1 Format sowie die biochemische, biophysikalische und funktionelle Charakterisierung.

Hierfür wurde die extrazelluläre Domäne des CD47-Proteins in drei verschiedene Fusionsproteine (CD47-hFc, CD47-mFc und CD47-His) als Antigen für die Phage Display Selektion kloniert, eukaryotisch produziert und homogen aufgereinigt. Mit allen Antigenen wurde ein Serum-ELISA zur Vorauswahl der eingesetzten LyNDAL Bibliotheken durchgeführt und anschließend eine Selektion über drei Selektionsrunden durchgeführt. Die Selektion gegen das CD47-hFc und CD47-mFc Antigen zeigte eine Anreicherung spezifischer Binder. Die CD47-His Selektion ergab keine Anreicherung spezifischer Klone. Zur Nachselektion der in der CD47-hFc Binder wurde das CD47-hFc Antigen proteolytisch gespalten und die CD47-Domäne zur Selektion in einer vierten Runde eingesetzt. Der aus dieser Selektion hervorgegangene Klon CD47-SM5-E7 wurde für die weitere Entwicklung ausgewählt. CD47-SM5-E7 scFv wurde periplasmatisch in E.coli produziert und homogen aufgereinigt. Die Oberflächenplasmonresonanz-Messung zeigte eine Dissoziationskonstante von 392nM. Der selektionierte scFv wurde in einen kommerziellen humanen IgG1 Vektor kloniert und der CD47-SM5-E7 IgG mit hoher Ausbeute produziert und homogen aufgereinigt.

Die Antigenspezifität konnte sowohl für den scFv als auch den IgG1 Antikörper mittels ELISA bestätigt werden. In der Oberflächenplasmonresonanzanalyse zeigte sich eine moderate Affinität des entwickelten CD47-SM5-E7 IgG mit einer Dissoziationskonstanten im monovalenten Bindungsmodell nach Langmuir von 18nM.

Zur Analyse der funktionellen Eigenschaften des entwickelten Antikörpers wurde ein in vitro Phagozytoseassay etabliert. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Induktion der Phagozytose von NALM-6 Tumorzellen durch humane Makrophagen unter Behandlung mit

dem CD47-SM5-E7 IgG im Vergleich zur Behandlung mit einem irrelevanten Antikörper und einem kommerziell erhältlichen, murinen Anti-CD47-Antikörper.

Zur Charakterisierung der Wirkung des Antikörpers auf das Tumormikromilieu wurden histologische Untersuchungen und Zytokinanalysen an vier verschiedenen explant Tumoren durchgeführt. In der histologischen Untersuchung zeigte sich eine vermehrte Dichte CD3+ Zellen bei zugleich geringerer CD8+ Zelldichte. Die Zytokinanalysen waren komplex und wiesen für mehrere Tumore moderate Erhöhungen der für Makrophagen und T-Zell Aktivierung relevanten Zytokine auf.

In dieser Arbeit wurde ein vollhumaner Anti-CD47-Antikörper entwickelt und biochemisch, biophysikalisch sowie funktionell charakterisiert. Der entwickelte CD47-SM5-E7 Antikörper zeigt ein interessantes Wirkprofil und steht für eine Affinitätsreifung und weitere präklinische Entwicklung zur Verfügung. Neben dem reformatierten Antikörper wurde ein Panel an CD47 spezifischen scFv selektioniert, aus denen weitere Kandidaten ausgewählt werden sollen. Klonierungs-, Produktions- und Aufreinigungsstrategien stehen für die Reformatierung dieser Kandidaten zur Verfügung. Ansätze zur funktionellen Charakterisierung der Antikörper in vitro wurden in dieser Arbeit definiert.

Der entwickelte humane Antikörper und weitere selektionierte scFv stehen als vielversprechende Kandidaten für die weitere Entwicklung zur Verfügung und können möglicherweise in Zukunft einen relevanten Beitrag zur immunmodulatorischen Therapie zahlreicher Tumorentitäten leisten.