

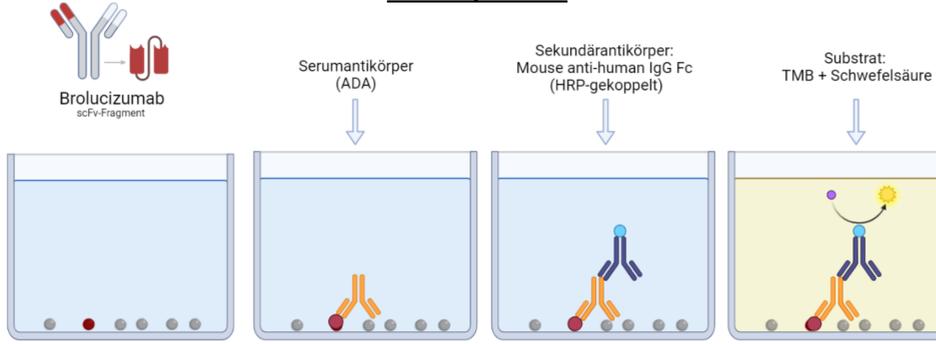
Untersuchung funktioneller Eigenschaften von Anti-Brolucizumab-Antikörpern

Hintergrund

In einer vorangegangenen Studie im Forschungslabor der Universitätsaugenklinik Greifswald (Busch et al. 2022¹) wurde das Vorkommen von Anti-Drug-Antikörpern (ADA) gegen Brolucizumab in Serum- und Glaskörper-Proben einer humanen Querschnittskohorte untersucht. Grundlage hierfür bildete das vermehrte Auftreten von intraokularen Entzündungen und retinalen Vaskulitiden nach intravitrealen Injektion von Brolucizumab als Anti-VEGF-Medikament zur Behandlung von gefäßassozierten Netzhauterkrankungen. Die ADA wurden mittels indirektem ELISA sowohl bei Patienten mit vorheriger Brolucizumab-Behandlung (induzierte ADA, 27,9 %), als auch bei Patienten ohne vorherige Brolucizumab-Exposition nachgewiesen (pre-existing ADA, 15,4 %). In diesem Projekt soll untersucht werden, ob die ADA wirkstoffneutralisierende Eigenschaften aufweisen und in wie weit sie das Komplementsystem aktivieren können.

Methoden

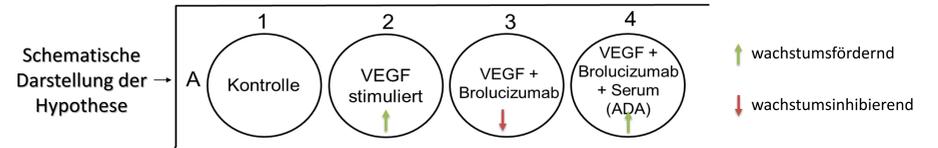
1 Indirekter ELISA zum Nachweis von ADA in humanen Serumproben



2 Bestimmung neutralisierender Eigenschaften von ADA mit Hilfe von zellbasierten Assays

a) Proliferations-Assay (CyQUANT)

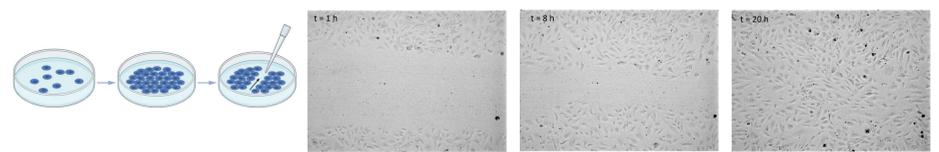
Messung der Viabilität und Proliferation der Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) unter Stimulation mit unterschiedlichen Induktoren/Inhibitoren



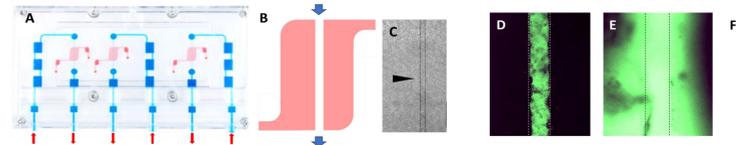
b) Sphäroid-Assay



c) Scratch-Assay

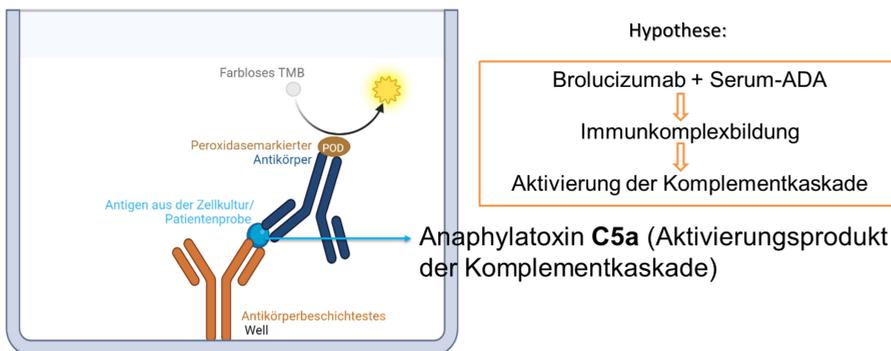


d) Organ on Chip / Leakage-Assay



3 Aktivierung des Komplementsystems

a) Quantifizierung von C5a in Zellkulturüberständen mittels Sandwich-ELISA



b) Nachweis des terminalen Komplementkomplex (C5b-9) mittels Immunhistochemie/-fluoreszenz

Ergebnisse

A OD-Werte der ADA aus Serumproben

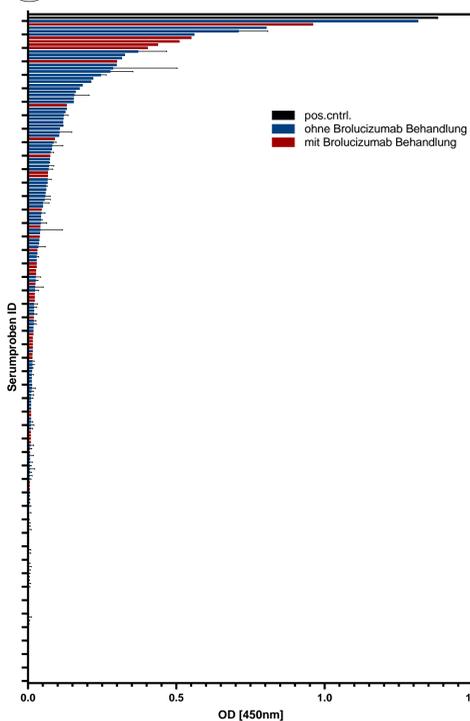


Abb. A zeigt Messergebnisse von Anti-Drug-Antikörpern gegen Brolucizumab in humanen Serumproben. Serumproben bei denen eine OD > 0,1 ermittelt wurde, werden als ADA-positive Seren in der Zellkultur eingesetzt.

B CyQUANT-Proliferations-Assay

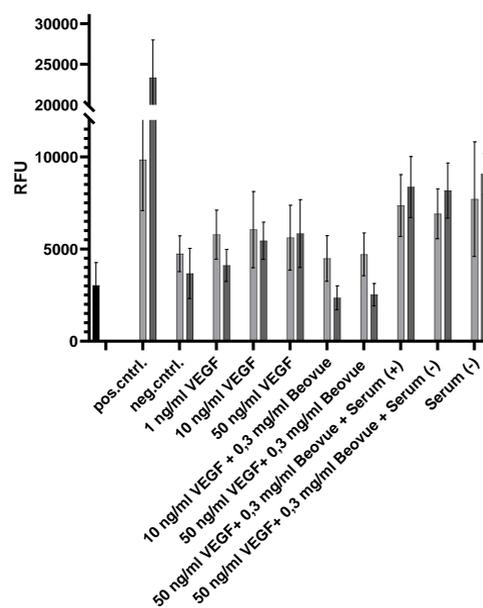


Abb. B zeigt die Ergebnisse des CyQUANT-Proliferations-Assays. HUVECS wurden über einen Zeitraum von zwei (T2) oder vier Tagen (T4) mit unterschiedlichen Konzentrationen an VEGF, Brolucizumab (Beovue) und humanen Seren mit (+) und ohne (-) ADAs kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Einfrieren lysiert und ein fluoreszierender DNA-Farbstoff hinzugegeben. Mit einem Mikroplattenreader wird nach einer Excitation bei 485 nm die Emission bei 530 nm gemessen. Die Fluoreszenz ist ein Maß für den DNA-Gehalt und damit die Zellproliferation. RFU = relative fluorescence unit

C Sphäroid-Assay

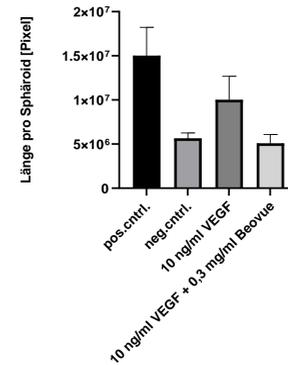


Abb. C Quantifizierung der Längen der Sphäroide. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SD) der aufsummierten Längen der Auswüchse aller auswertbaren Sphäroide.

D Scratch-Assay

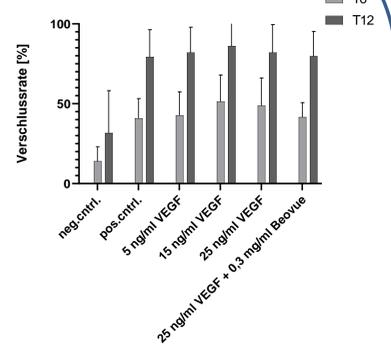


Abb. D zeigt die Verschlussrate des Scratch-Assays. Hierbei wurde die Breite des Scratches über einen Zeitraum von 12 Stunden gemessen. Anschließend wurde die prozentuale Verschlussrate ermittelt, indem die Breite bei T0 als 0% gesetzt wurde.

pos.cntrl.: Vollmedium ≙ Basalmidmedium + Supplements + 5 % FCS
neg.cntrl.: Basalmidmedium + 2 % FCS
VEGF-Stimulation: 1; 5; 10; 15; 25; 50 ng/ml VEGF in Basalmidmedium (+2 % FCS)
Brolucizumab (Beovue): 0,3 mg/ml Beovue + Basalmidmedium (+ 2 % FCS)
Serum: 50 ng/ml VEGF + Basalmidmedium (+2 % FCS) + 25 % humanes Serum (+/- ADA) + Beovue 0,3 mg/ml