

Aus der
Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Rheumatologie: Univ.-Prof. Dr. med. M. Schneider

Reduktion von Anti-Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure-Antikörpern
aus dem Serum von Patienten
mit Systemischen Lupus Erythematoses:
Klinische Studie (Phase 1) mit dem neuen Antigen-Heteropolymer ETI104

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Stocks

2006

Meinen Eltern Anne und Dieter Stocks
in Dankbarkeit

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Schneider

Ko-Referent: Specker

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	5
2 SYSTEMISCHER LUPUS ERYTHEMATODES.....	7
2.1 GESCHICHTE	7
2.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	7
2.2.1 Autoantikörper.....	8
2.2.2 Genetik	10
2.2.3 Zelluläre Immunität.....	10
2.2.4 Immunkomplexe und Komplementproteine	11
2.2.5 Komplementdefizienz	12
2.2.6 Hormonelle Faktoren	12
2.3 EPIDEMIOLOGIE UND KLASSIFIKATION	13
2.4 PROGNOSE.....	14
2.5 KLINIK	15
2.6 THERAPIE	17
2.6.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika	17
2.6.2 Antimalariamittel (Hydroxychloroquin/Chloroquin)	17
2.6.3 Glukokortikoide	17
2.6.4 Immunsuppressiva	18
2.6.5 Immunglobuline.....	19
2.6.6 Plasmapherese und Immunadsorption.....	19
2.6.7 Neue experimentelle Therapieansätze.....	20
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 STUDIENPOPULATION	22
3.1.2 Einschlusskriterien	22
3.1.3 Ausschlußkriterien.....	22
3.2 PATIENTENPOPULATION.....	23
3.2.1 Einschlußkriterien.....	23
3.2.2 Ausschlußkriterien.....	23
3.3 STUDIENBESCHREIBUNG.....	24
3.4 MEDIKAMENTENBESCHREIBUNG	26
3.5 BESTIMMUNG VON HUMANEN ANTI-MAUS-ANTIKÖRPER (HAMA).....	26
3.6 RADIOIMMUNOASSAY (RIA) ZUR BESTIMMUNG VON ANTI-dsDNS-ANTIKÖRPERN IM SERUM.....	27
3.7 BESTIMMUNG DER KOMPLEMENTFAKTOREN C3 UND C4.....	27
3.8 LABORCHEMISCHE UND HÄMATOLOGISCHE PARAMETER	27
3.9 HIV- UND HEPATITISEROLOGIE.....	27
3.10 VERWENDETE REAGENZIEEN	27
3.11 ANTIKÖRPER FÜR FACS-ANALYSEN	27
3.12 PHARMOKOKINETISCHE ASSAYS	28
3.12.1 Nachweis von gebundenem ETI104 an Erythrozyten von Probanden und Patienten und von anti-dsDNS-Antikörpern an Patientenerythrozyten	28
3.12.2 Nachweis von freiem ETI104 im Plasma von Probanden und Patienten	29
3.12.3 Nachweis von freien anti-dsDNS-Antikörpern im Patienten-Plasma mittels FACS-Analysen	30
3.12.4 Nachweis von CR1 auf Erythrozyten.....	30
3.12.5 Nachweis von intaktem ETI104.....	30
3.13 FACS-ANALYSEN.....	31
3.14 STATISTIK.....	31

4 ERGEBNISSE	33
4.1 SICHERHEITSPROFIL VON ETI104	33
4.1.2 Bildung von HAMA	35
4.2 AKTIVITÄT UND BINDUNG DES MEDIKAMENTS	36
4.2.1 Bindung von ETI104 <i>in vitro</i> an Erythrozyten von gesunden Probanden	36
4.2.2 Bindung und Clearance von ETI104 aus dem Plasma <i>in vivo</i> bei gesunden Probanden	36
4.2.3 Bindung von ETI104 und von anti-dsDNS-Antikörper an Erythrozyten <i>in vivo</i> bei Patienten mit SLE	37
4.2.4 Bindung der anti-dsDNS-Antikörper an Erythrozyten und Reduktion aus dem Plasma	37
4.3 <i>IN VITRO</i> FUNKTIONALITÄT VON ETI104	38
4.4 ABBILDUNGEN	39
5 DISKUSSION	48
6 ZUSAMMENFASSUNG	57
7 LITERATURVERZEICHNIS	59
8 ANHANG	70
8.1 TABELLE 4: ABKÜRZUNGEN	70
8.2 TABELLE 5: MATERIALLISTE	72
8.3 TABELLE 6: STUDIENÜBERSICHT VOM SCREENING BIS TAG 28	73
8.4 TABELLE 7: SLAM-SCORE	74
8.5 TABELLE 8: DEMOGRAFISCHE DATEN ALLER 6 SLE-PATIENTEN	76
8.6 TABELLE 9: NEBENWIRKUNGEN	77
8.7 TABELLE 10: ZUSAMMENFASSUNG DER HAMA-WERTE	78
8.8 PATIENTENEINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG	79

1 Einleitung und Zielsetzung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung unklarer Ätiologie, die durch vielfältige klinische Manifestationen und durch die Produktion von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) gekennzeichnet ist. Organschäden beim SLE werden nach aktueller Auffassung überwiegend durch Autoantikörper und komplementaktivierende Immunkomplexe hervorgerufen (Sturfelt 2002).

Das Spektrum der Standardtherapie des SLE reicht von nichtsteroidalen Antiphlogistika, niedrigdosierten Glucocorticoiden, Hydroxychloroquin und Azathioprin bis hin zu Cyclophosphamid (Lahita 2000).

Da insbesondere für Anti-Doppelstrang-Desoxyribonukleisäure-Antikörper (Anti-dsDNS-Antikörper) in verschiedenen klinischen Studien eine direkte pathogenetische Rolle z.B. bei der Entstehung der Lupusnephritis nachgewiesen wurde (Mills 1994), sind neben diesen etablierten Immunsuppressionen verschiedene Therapieansätze (Plasmapherese, Immunadsorption) zur gezielten Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörper untersucht worden. Eine geprüfte Therapieoption konnte daraus jedoch bisher nicht etabliert werden, da die Ansätze zwar eine vorübergehende effektive Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörper in der Zirkulation zeigten, aber nicht zu einer gesicherten klinischen Response führten.

Über eine andere Möglichkeit der Immunmodulation mit Hilfe eines so genannten „antigen-based Heteropolymer (AHP)“ berichtete Taylor erstmals 1991 (Taylor et al 1991). AHPs bestehen aus einem monoklonalen Antikörper (aus der Maus), der spezifisch an den Komplementrezeptor 1 (CR1) bindet, der auf Erythrozyten exprimiert wird. Dieses neue Therapieverfahren wurde entwickelt, um definierte Pathogene aus der Blutzirkulation zu eliminieren und bereits in *in vivo* Studien an Affen untersucht, (Taylor 2001). In einer Toxizitätsstudie an Primaten zeigten sich keinerlei negative Auswirkungen auf serologische, hämatologische und histo-pathologische Parameter. Der Prototyp eines solchen AHPs ist ETI104: ETI104 besteht aus einem monoklonalem Antikörper (mab) gegen CR1, welcher mit dsDNS als Antigen gekoppelt ist. Die Gabe von ETI104 führte bei Affen zu einer raschen Reduktion der infundierten Anti-dsDNS-Autoantikörper aus dem Serum.

Ziel dieser vorgelegten Studie war es, erstmalig die Tolerabilität und Toxizität von ETI104 an gesunden Probanden bei einer Einmal-i.v.-Gabe zu prüfen. Außerdem sollten an Probanden die Bindung von ETI104 an Erythrozyten sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo* untersucht werden.

In der zweiten Phase der Studie sollte dann die Tolerabilität, Toxizität und die Reduktion der im Blut zirkulierenden Anti-dsDNS-Autoantikörper durch ETI104 bei insgesamt 6 SLE-Patienten über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht werden.

2 Systemischer Lupus erythematodes

2.1 Geschichte

Das klinische Bild des kutanen Lupus Erythematodes (LE) wurde 1945 erstmalig von Hebra beschrieben, wobei der Begriff „Lupus erythémateux“ von Casenave geprägt wurde. Der SLE galt früher als eine sehr seltene, meist tödlich endende Erkrankung. Die Einführung der immunologischen Diagnostik, eingeleitet durch die Entdeckung der LE-Zellen im Knochenmark von SLE-Patienten im Jahre 1848 an der Mayo-Klinik Rochester USA und dem sich daraufhin anschließenden Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) Ende der 50er Jahre, führte zu einer deutlich häufigeren Diagnosestellung, da abortive und klinisch untypische Verlaufsformen erfassbar wurden. Der Krankheitsverlauf und die Prognose der Erkrankung sind weiterhin sehr variabel und werden vor allem von der Schwere der führenden Manifestationen bestimmt (Boumpas 1995).

2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht aufgeklärt. Diskutiert wird eine multifaktorielle Genese, an der endogene (u.a. genetische, hormonelle) und exogene (z.B. mikrobielle Erreger, UV-Exposition) Faktoren zusammenwirken. Gesichert ist eine Autoimmunpathogenese. Es werden eine Vielzahl von Autoantikörpern, die mit nukleären, zytoplasmatischen oder Zellmembranantigenen reagieren, im Serum nachgewiesen. Über die Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen in den kleinen Arterien und Arteriolen kommt es zu den entsprechenden entzündlichen Organveränderungen. Möglich ist auch ein direkt zytopathogener Effekt der Autoantikörper, wenn sie beispielsweise gegen Zellmembranen (antierythrozytäre Antikörper) gerichtet sind (Lahita, 1999).

2.2.1 Autoantikörper

Ein wichtiges immunologisches Merkmal des SLE ist die Produktion von Autoantikörpern gegen eine Reihe verschiedener, vor allem nukleärer Antigene (von Muhlen 1995). Während ein Teil der Autoantikörper lediglich als serologischer Marker der Erkrankung dient, konnte für andere Antikörper eine direkte zytogenetische Rolle nachgewiesen werden (Boumpas et al 1995; Mills 1994). Sie können unmittelbar zu einer zellulären Schädigung beitragen, z.B. bei Autoimmunzytopenien oder mit Zelloberflächen oder Plasmaproteinen interferieren, wie z.B. bei dem Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom (Lahita 1999). Autoantikörper sind an der Entstehung von Immunkomplexen und den durch sie hervorgerufenen entzündlichen Vorgängen beteiligt, z.B. bei der Glomerulonephritis (Rekvig 2004, Putterman 2004). Eine besondere Rolle in diesem Zusammenhang spielen die Anti-dsDNA-Autoantikörper, deren Titer häufig mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Zhang et al 2002; Olhoffer et al 1997). Weniger häufig werden Anti-Sm-Antikörper gefunden, die für SLE jedoch hochspezifisch sind. Auto-Antikörper gegen das ribosomale Protein P werden gehäuft bei Patienten mit ZNS Beteiligung beobachtet (Hiepe et al 1996).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über verschiedene Subspezifitäten antinukleärer Antikörper und ihre Assoziation mit speziellen Manifestationen des SLE (Hiepe et al 1996; von Muhlen 1995).

Autoantikörper gegen	Häufigkeit (%)	Klinische Manifestationen
Zellkerne (ANA)	96%	
ds-DNS	78%	Nephritis, ZNS-Beteiligung
Histon	70%	Medikamentenind. SLE
Sm	10% – 30%	Nephritis, ZNS-Beteiligung
U1 - RNP	13% – 32%	Raynaud-Phänomen, Myositis
Ro (SS – A)	25% – 60%	Sjögren–Syndrom, Pneumonitis, Lymphopenie, Photosensitivität, leukozytoklastische Vaskulitis, subakut kutaner LE, kongenitaler Herzblock, neonataler LE
La (SS – B)	19%	Sjögren–Syndrom, kongenitaler Herzblock, neonataler LE, subakut kutaner LE, seltener Nephritis
Ribosomales P	11% – 38%	Psychosen, Leberbeteiligung, Nephritis
RA33	20%	erosive Arthritis
Cardiolipin	24	Antiphospholipid-Syndrom

Tabelle 1: Diagnostische Bedeutung verschiedener Autoantikörper bei SLE (nach Hiepe u. Burmester, 1996)

Der Grund für die Autoantikörperproduktion bei SLE ist nicht bekannt. Obwohl viele Hinweise dafür sprechen, dass das B-Lymphozyten-Zell-System (B-Zell-System) unspezifisch aktiviert ist, liegen andererseits zahlreiche Befunde dafür vor, dass es sich bei der Autoantikörperbildung des SLE um eine Antigen-induzierte, durch T-Lymphozyten (T-Zellen) vermittelte Immunantwort handelt.

- Die Antikörper sind nicht nach dem Zufallsprinzip gegen alle potentiell in Frage kommenden Autoantigene gerichtet, sondern bevorzugt gegen Strukturen des Zellkerns (von Muhlen 1995).
- Das Antikörperprofil eines Patienten ist im Krankheitsverlauf meistens stabil.
- Die Prädominanz der Immunglobulinklasse IgG und die Höhe der Antikörpertiter sprechen für das Vorliegen einer typischen sekundären Immunantwort.
- Somatische Mutationen von Antikörpern, die für einen antigenabhängigen und durch T-Helferzellen vermittelten Reifungsprozess der entsprechenden B-Lymphozyten sprechen, lassen sich auch in der variablen Region von Anti-dsDNA-Antikörpern nachweisen (van Es et al 1991).

Neben einer genetischen Disposition könnte ein infektiöser Triggermechanismus erforderlich sein, um die überschießende Immunreaktion hervorzurufen. Eine entsprechende Bedeutung wurde Superantigenen, Viren und Retroviren zugesprochen (Gordon 1996).

Neuere Hypothesen zur Entstehung der SLE-typischen Antikörper heben die Beobachtung hervor, dass Antikörper z.B. gegen ds-DNA und Histone im Experiment nicht durch Injektion nackter DNA induziert werden, wohl aber, wenn diese Proteine als intakte Nukleosomen gegeben wurden. Da Nukleosomen hauptsächlich während der Apoptose entstehen, ist denkbar, dass eine gesteigerte Apoptose (Casciola-Rosen et al 1996) oder eine reduzierte Elimination apoptotischen Materials zur Immunogenität von Nukleosomen beitragen (Hermann et al 1998). Diese Theorie ist gut vereinbar mit dem gehäuftem Auftreten von SLE nach Exposition gegenüber UV-Licht, welches Apoptose z.B. von Keratinozyten der Haut induzieren kann.

2.2.2 Genetik

Genetische Untersuchungen, vor allem Familienuntersuchungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen SLE und genetischen Faktoren hin. Bei bis zu 10% der Patienten haben ein oder mehrere Verwandte einen SLE (Hochberg et al 1985). Es zeigt sich eine Konkordanz des SLE bei eineiigen Zwillingen, die in der Literatur zwischen 25 und 67% angegeben wird, nicht jedoch bei zweieiigen Zwillingen (Deapen et al 1992).

Verschiedene Genexpressionen zeigen eine erhöhte Empfänglichkeit für einen SLE. Hierzu gehören der homozygote Mangel von C1q, C1r und C1s, die mit den HLA-System verknüpft sind (Koide et al 2002), von C2 und C4 (unabhängig vom HLA-System) sowie partielle Defizite an C4 (insbesondere C4a).

Bestimmte HLA-Klasse-II-Gene (DR und DQ) disponieren zur Bildung bestimmter Autoantikörper (Anti-dsDNA, Anti-Sm, Antiphospholipide). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen SLE und T-Zell-Rezeptor-, Immunglobulin-, Komplementrezeptor-, TNF- (Tumornekrosefaktor), Fc-Rezeptor- sowie Apoptosegenen (Paul et al 2002).

2.2.3 Zelluläre Immunität

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur zellulären Immunität des SLE ist es bislang nicht sicher gelungen, die Autoimmunphänomene des SLE auf einen dominierenden Befund der zellulären Immunologie zurückzuführen. Es finden sich vielmehr verschiedene Variationen, deren Rolle nur bedingt geklärt sind.

Auffällig ist zunächst eine allgemeine, vor allem die T-Zellen betreffende Lymphopenie, die mit dem Vorkommen antilymphozytärer Antikörper assoziiert ist (Gorla 1990). Während die CD8+-T-Suppressorzellen kaum verändert sind, findet sich eine deutliche Abnahme der CD4+-T-Helferzellen, was zu einer deutlichen Reduktion der CD4/CD8-Ratio führt. In vitro-Untersuchungen weisen zum einen auf eine verminderte Proliferation sowie eine reduzierte Aktivität der Helfer-, Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen hin (Sobel et al 2002). Darüber hinaus lassen sich erhebliche Funktionsstörungen von T-Lymphozyten nachweisen. Insbesondere die IL-2-abhängige Proliferation ist deutlich vermindert. Sowohl die IL-2-Sekretion wie auch die IL-2-Rezeptorexpression scheinen alteriert zu sein (Herndon et al 2002). Die Frage, ob in der Summe der Funktionsstörungen auf T-Zell-Ebene eine verstärkte T-Helferzell-Funktion für B-Zellen oder eine verminderte T-Zell-Suppressorfunktion vorliegt, ist dabei nicht endgültig geklärt. Die zentrale Auffälligkeit auf der Ebene der B-Lymphozyten ist zunächst die gesteigerte polyklonale B-Zell-Aktivität derselben. Die Spontanproliferation von B-Lymphozyten in vitro sowie deren Immunglobulinproduktion (Ig-Produktion) ist bei SLE erhöht. Eine Erhöhung des Serum-IgG-Spiegels auf das Doppelte des Normwertes ist keine Seltenheit. Auffällig ist eine Erhöhung der CD19+ und CD27+ exprimierenden B-Lymphozyten (Odendahl et al 2000). Während die erhöhte B-Zell-Aktivität in tierexperimentellen (murinen) Lupusmodellen zumindest zum Teil als Ausdruck eines inhärenten B-Zell-Defektes angesehen wird, ist dies für den humanen Lupus nicht belegt. Dagegen konnte eine wesentliche Rolle T-Zell-abhängiger Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wahrscheinlich gemacht werden (Horwitz et al 2002).

2.2.4 Immunkomplexe und Komplementproteine

Die Bildung zirkulierender Immunkomplexe ist ein physiologischer Immunmechanismus, der der Eliminierung von pathogenen Antigenen dient. Beim SLE ist die ungewünschte Ablagerung von Immunkomplexen an den kleinen Gefäßen der verschiedenen Organe wesentlich an den Entzündungsvorgängen beteiligt. Diese exzessive und überschießende Immunkomplexbildung führt zu einer Erschöpfung des Retikuloendothelialen Systems (RES), so dass sich die Clearance der Immunkomplexe reduziert. Außerdem wird über Störungen der Immunkomplexclearance durch Defekte der Fc- und Komplementrezeptoren des Monozyten-Makrophagen-Systems berichtet (Cohen et al 2002).

2.3 Epidemiologie und Klassifikation

Die Erkrankung kommt weltweit in territorial unterschiedlicher Häufigkeit vor, sie beginnt bei jungen Frauen (nach der Menarche) in der zweiten oder dritten Lebensdekade, (McCarty et al 1995). Die Prävalenz liegt in Europa und Nordamerika bei etwa 40 pro 100 000 Einwohnern, variiert jedoch in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit. Frauen erkranken ca. 10-13 mal häufiger als Männer. Die Inzidenz in der Allgemeinbevölkerung liegt bei 6-7 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Hochberg 1990, Mills 1994).

Für die Klassifikation des SLE stehen die 1982 von der American Rheumatism Association (jetzt American College of Rheumatology) modifizierten Kriterien zur Verfügung. Kriterium 10 wurde 1997 modifiziert. (Hochberg 1997).

Definitionsgemäß müssen 4 der 11 ausgewählten Kriterien vorliegen, um einen gegebenen Patienten als SLE erkrankt zu klassifizieren. Die Sensitivität der 1982 definierten Kriterien wird mit 96%, ihre Spezifität mit 96-99% angegeben. Diese Kriterien haben ihre Bedeutung, um die Vergleichbarkeit der Studien zu verbessern. Für die Frühdiagnose sind sie weniger gut geeignet (Tan et al 1982).

Tabelle 2: Klassifikationskriterien des systemischen Lupus erythematoses des ACR**(Nach Tan et al. 1982, 1997 modifiziert)**

1. Schmetterlingserythem	Erythem der Nase und Wangen, aber auch an den anderen Hautpartien – besonders Streckseiten der Arme und Halsausschnitt
2. Diskoide Hautveränderungen	Im Gesicht oder an anderen lichtexponierten Partien; lokalisierte, meist rote Plaques mit (follikulären) Hyperkeratosen, Pigmentverschiebungen und Atrophie
3. Photosensibilität	Verstärkte Lichtreaktionen an allen ausgesetzten Hautpartien
4. Schleimhautulzera	Orale oder nasopharyngeale Ulzerationen, lokalisiert und gewöhnlich schmerzlos
5. Arthritis	Nichterosive Arthritis an 2 oder mehreren Gelenken
6. Serositis	a) Pleuritis b) Perikarditis
7. Nephritis	a) persistierende Proteinurie >0,5 g/l oder b) Zylindrurie oder Erythrozyturie
8. ZNS-Beteiligung (nicht durch Medikamente oder metabolisch bedingt)	a) Krampfanfälle b) Chorea minor c) Psychosen
9. Hämatologische Befunde	a) hämolytische Anämie b) Leukozytopenie (<4 000/mm ₃) c) Thrombozytopenie (<100 000/mm ₃) d) Lymphozytopenie (<1 500/mm ₃)
10. Immunologische Befunde	a) Nachweis von Anti-dsDNA-Antikörpern b) Nachweis von Anti-Sm-Antikörpern oder c) Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern für mindestens 6 Monate durch: <ul style="list-style-type: none">• Anticardiolipinantikörper der IgG- oder IgM-Klasse• Positiver Test für Lupusantikoagulans oder• Falsch-positiver Test auf Syphilis und bestätigter Treponema pallidum-Immobilisations- (TPI) oder Fluoreszenz-Treponemaantikörper-Absorptionstest (FTA)• Falsch-positiver WaR (Antikardiolipinantikörper), mindestens 6 Monate persistierend
11. Antinukleäre Antikörper	ANA = 1:160

4 oder mehr der 11 Kriterien müssen zur Klassifikation erfüllt sein.

2.4 Prognose

Die Prognose galt vor der Ära der Glukokortikoid-Therapie als extrem schlecht. Die verbesserte Frühdiagnose, die Intensivierung der Therapie und der allgemeine medizinische Fortschritt der supportiven Therapie haben zu einem deutlichen Anstieg der Überlebensraten geführt.

In der Erlanger Kohorte der SLE-Patienten werden heute 5-Jahres-Überlebensraten von annähernd 97% erreicht. Nach 10 Jahren leben noch etwa 90% der Erlanger SLE-Patienten und nach 20 Jahren (geschätzte) 70%. Die große Mehrzahl nicht nur der Erlanger SLE-Patienten hat heute eine sehr gute Prognose quoad vitam, (Manger et al 2004)

Während schwere, unbeherrschbare Lupusschübe insbesondere die Frühletalität der Erkrankung bedingen, ist die zunehmend in den Vordergrund rückende Spätmortalität vorwiegend auf chronische Krankheits- und Therapiefolgen zurückzuführen, vor allem auf eine vorzeitige Arteriosklerose.

2.5 Klinik

Prinzipiell gibt es fast kein Organsystem, das bei SLE nicht beteiligt sein kann. Obwohl manche Symptome, wie Allgemeinsymptome, Arthralgien, Erythem, Raynaud-Syndrom und Nephritis, relativ häufig und oft diagnostisch wegweisend sind, ist prinzipiell jede Kombination einzelner Symptome möglich. Eine Zusammenstellung der häufigsten Symptome zeigt Tabelle 2 (Gladman et al 1994).

Fast alle Patienten klagen über allgemeine Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust, die oft auch die ersten Beschwerden darstellen. Selten übersteigen die Temperaturen 39°C. Bei hohem Fieber muß immer auch an eine Infektion gedacht werden. Müdigkeit und Abgeschlagenheit sind oft die einzigen Symptome, über die Patienten auch nach erfolgreicher Behandlung eines Schubes berichten.

Tabelle 3: Häufigkeit der Symptome und der Beteiligung verschiedener Organsysteme bei SLE zu irgendeinem Zeitpunkt während des Krankheitsverlaufes bei 605 SLE-Patienten (nach Gladman u. Urowitz [3])

Manifestation	Häufigkeit (%)
Allgemeinsymptome	73 / 84
Arthritis	56 / 63
Arthralgien	77 / 85
Erythem	57 / 81
Schleimhautulzera	18 / 54
Pleuritis	23 / 37
Pneumonitis	9 / 17
Perikarditis	20 / 29
Myokarditis	1 / 4
Raynaud-Syndrom	33 / 58
Thrombophlebitis	2 / 8
Vaskulitis	10 / 37
Nephritis	44 / 77
Nephrotisches Syndrom	5 / 11
Azotämie	3 / 8
ZNS-Beteiligung	24 / 54
Augenbeteiligung	5 / 5
Gastrointestinale Beteiligung	22 / 47
Pankreatitis	1 / 4
Lymphadenopathie	25 / 32
Myositis	5 / 7

1. Zahl = Häufigkeit bei Beginn der Erkrankung,
2. Zahl = Häufigkeit im Gesamtverlauf.

2.6 Therapie

Das Behandlungsziel besteht in einer Beeinflussung der Symptome, Reduktion der Krankheitsaktivität und Verhinderung eines Fortschreitens der Erkrankung und der entsprechenden Organmanifestationen. Die Entscheidung über die Art der Therapie hängt von verschiedenen Faktoren ab. Im Vordergrund stehen dabei die Aktivität des SLE sowie die Art und Schwere der Organmanifestationen. Daneben sind auch das Alter und Begleiterkrankungen zu berücksichtigen.

Das Standardspektrum der etablierten Therapie reicht von abwartendem Verhalten bei milden Verläufen über nichtsteroidale Antiphlogistika, niedrigdosierte Glucocortikoide, Hydroxychloroquin und Azathioprin bis hin zum Cyclophosphamid. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Behandlungsansätze ist bisher von einer lebenslangen Erkrankung und lebenslangen Therapie-, zumindest aber Beobachtungsbedarf auszugehen (Lahita 1999).

Nicht-Steroidale Antirheumatika: Diese Medikamente können eine ausreichende Behandlung darstellen, wenn Arthralgien oder milde Serositiden im Vordergrund stehen (Lahita 1999).

Antimalariamittel: Bei Arthralgien oder Myalgien sowie bei kutanen Manifestationen können Antimalariamittel eingesetzt werden. Dokumentiert sind Verbesserungen von Hautveränderungen und eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz (The Canadian Hydroxychloroquine Study Group 1991). Therapeutische Effekte können frühestens nach 6 Wochen beobachtet werden. Die volle Wirkung tritt nach etwa 6 Monaten unter einer Standarddosis von 250 mg für Chloroquin, bzw. von 200 - 400 mg für Hydroxychloroquin auf.

Glukortikoide: haben einen hohen Stellenwert in der Therapie des SLE. Insbesondere durch ihren raschen Wirkungseintritt sind sie bei der Behandlung von akuten Schüben unentbehrlich (Bertoni et al 1994). In einer initialen Dosierung von etwa 1mg/kgKG/Tag Prednisolonäquivalent lassen sich stärkere Krankheitsschübe beherrschen. Nach Rückgang der Krankheitsaktivität muß versucht werden, die Prednisolondosis unter Kontrolle der Aktivitätsparameter langsam zu reduzieren und eventuell abzusetzen.

Wenn sich die Krankheitsaktivität des SLE unter Glukokortikoiden nicht ausreichend beeinflussen lässt oder viszerale Manifestationen vorliegen, ist eine zusätzliche immunsuppressive Therapie indiziert.

- Azathioprin: Das glukokortikoidsparende Purinanalogon wird bei Patienten mit mittlerer Krankheitsaktivität eingesetzt. Bei Lupusnephritis war es der Glukokortikoidmonotherapie tendenziell überlegen. (Austin III et al 1986). Die Behandlungsdauer mit einer Dosis von 50-150 mg/d beträgt typischerweise mehrere Jahre.
- Cyclophosphamid: Insbesondere bei sehr schweren Organmanifestationen besteht die Indikation für die Gabe von Cyclophosphamid. Dabei hat sich wegen der geringeren Kumulativdosis die intravenöse Bolustherapie für zunächst 6 Monate in vierwöchigen Abständen gegenüber der peroralen kontinuierlichen Langzeitmedikation durchgesetzt. Bei der intravenösen Bolustherapie erhalten die Patienten 500-1000 mg/m². Danach wird die Applikation in 6-jährlichen Abständen über weitere 18 Monate fortgesetzt werden, da mit diesem Behandlungsprotokoll eine Stabilisierung der Nierenfunktion und eine Reduktion der Rezidiv-Rate erzielt wurde.

Methotrexat, Cyclosporin A, Mycophenolat Mofetil, Leflunomid: Als Alternative bei der immunsuppressiven Therapie bieten sich Methotrexat (MTX), Cyclosporin A (CSA), Mycophenolat mofetil (MMF) und Leflunomid an. Methotrexat führte zu einer Verbesserung einer Arthritis, kutanen Vaskulitis, Myositis und Serositis (Wong et al 2005, Ruiz-Irastorza et al 2001). Wegen einer Nephrotoxizität wird CSA eher zurückhaltend beim SLE eingesetzt, wobei insbesondere die therapierefraktäre Proteinurie beim nephrotischen Syndrom anspricht und die Myelotoxizität (z.B. Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie) weitaus geringer ausgeprägt ist, als bei MTX und MMF. Mycophenolat mofetil wird in der immunsuppressiven Induktionstherapie und Remissions-Erhaltungstherapie momentan zunehmend als vielversprechende Alternative bei Patienten eingesetzt, die auf hohe Dosen von Cyclophosphamid oder Azathioprin nicht ansprechen (Carreno et al 2002, Contreras et al 2004)

Leflunomid zeigt nach sechsmonatiger Therapie in placebokontrollierten Studien einen signifikanten Rückgang der Krankheitsaktivität bei milden bis moderaten Verläufen eines SLE (Tam et al 2004).

Immunglobuline: Die Wirksamkeit der hochdosierten intravenösen-Immunglobuline beim SLE ist umstritten. Vor allem die Immunthrombozytopenie lässt sich durch die Immunglobulintherapie temporär günstig beeinflussen. Die Immunglobulintherapie bietet sich bei Patienten als eine Alternative an, bei denen Kontraindikationen für eine hochdosierte Glukokortikoid- oder Immunsuppressive Therapie vorliegen. Dies betrifft u.a. die Schwangerschaft, begleitende Infektionen oder perioperative Zustände.

Plasmapherese und Immunadsorption: Mittels Plasmapherese können pathogenetische Autoantikörper und Immunkomplexe aus der Zirkulation der Patienten entfernt werden. Die Plasmapherese in Kombination mit immunsuppressiver Therapie (Kortikosteroide, Cyclophosphamid) erwies sich in randomisierten, kontrollierten Studien bei Patienten mit Lupusnephritis (Lewis et al 1992) als nicht signifikant überlegen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die eine alleinige medikamentöse immunsuppressive Therapie erhielten. Sie kann jedoch eine wichtige Option darstellen in akuten, lebensbedrohlichen Krankheitsphasen, bei denen hochdosierte Glukokortikoide und Immunsuppressiva nicht gegeben werden können, sowie bei Therapieversagern. Durch Synchronisation von Plasmapherese und i.v.-Cyclophosphamid sowie sich anschließender oraler Cyclophosphamidgabe konnten bei schweren Verlaufsformen therapiefreie Remissionen erzielt werden (Euler et al 1998).

Die Immunadsorption über Antiimmunglobulin-Adsorber oder Protein-A-Säulen hat den Vorteil der radikaleren Antikörperelimination. Andere Proteine wie Gerinnungsfaktoren (Braun et al 1994) werden zudem nicht eliminiert. Darüber hinaus entfällt im Vergleich zur Plasmapherese der high volume Austausch des gesamten Plasmas (Schneider et al 1997).

Dies ist ein wichtiger Schritt bei der sicheren Klärung von zirkulierenden Immunkomplexen, und bewahrt somit den Organismus vor Schäden durch Ablagerung von Immunkomplexen in empfindlichen Geweben, wie z.B. den Nieren.

Die neue HP-Technologie besteht aus zwei kovalent gebundenen monoklonalen Antikörpern. Einer dieser Antikörper bindet direkt an die Komplementrezeptoren, der andere Antikörper bindet spezifisch das zu entfernende Pathogen.

Das HP stellt so eine „Sofort-Immunität“ dar, da es u. a. die komplementabhängige Immunantwort umgeht und somit die schnellere und effektivere Elimination der Pathogene ermöglicht.

Eine Subgruppe der HPs sind die sogenannten „antigen-based-Heteropolymere“ (AHP). Diese sind mit spezifischen, einzelnen Antigenen gekoppelt um so pathogene (Auto)-Antikörper zu binden und zu eliminieren.

Das erste entwickelte AHP ist ET1104, welches als Antigen dsDNA an den Anti-CR1-Antikörper gekoppelt hat.

In einer Studie von Taylor et al konnte an Primaten gezeigt werden, dass ET1104 in unterschiedlichen Dosierungen eine rasche Reduktion infundierter Anti-dsDNA-Autoantikörper bewirkt. Die Gabe hatte keinerlei negative Auswirkungen auf serologische, hämatologische und histologische Parameter zur Folge (Taylor 2001).

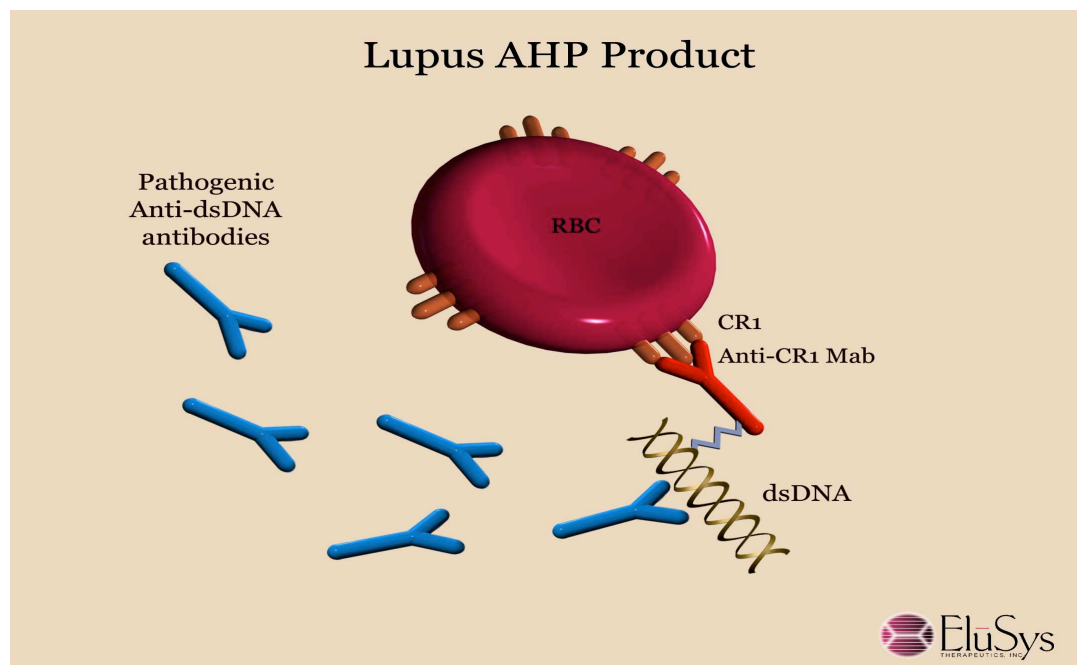


Abbildung 1 zeigt schematisch das Wirkprinzip der AHP-Technik (Elusys therapeutics Inc., Pine Brook, NJ, USA).

2.6.2 Neue experimentelle Therapieansätze

In in vitro und in vivo Studien werden aktuell weitere, meist experimentelle Therapieansätze untersucht. Zum Beispiel wurden selektive Antikörper gegen einzelne Lymphozytensubklassen (z.B. T-Zell-Antikörper, wie Anti-CD4 und Anti-CD5 oder B-Zell-Antikörper, wie Anti-CD20 oder Anti-BLYS), gegen Rezeptoren der Zell-zu-Zell-Interaktion (z.B. gegen Adhäsionsmoleküle, wie Anti-CD11a, Anti-CD54, Anti-CD40 und Anti-LFA1), inhibieren T-Zell-Ko-Aktivatoren (Anti-CD154 und/oder CTLA4-Ig) oder gegen lösliche Entzündungsmediatoren, wie Interleukin (IL)-6, IL10 oder Anti-C5 geprüft (Tahir et Isenberg 2005, Übersicht siehe Lahita 1999).

Weitere Daten liefert LJP394, ein Molekül, welches selektiv in Anti-dsDNS-Antikörper produzierenden B-Lymphozyten Toleranz induziert. In den ersten Phase-II/III Studien reduzierte dieses Molekül hochaffine Anti-dsDNS-Antikörper bei SLE-Patienten um ca. 30%. Dies ging gleichzeitig mit einem reduzierten Risiko für das Auftreten eines renalen Rezidives einher (McNeeley et al, 2001; Alarcón-Segovia et al, 2003). Obwohl in der folgenden Phase-III-Studie diejenigen Patienten klinisch profitierten (signifikante Reduktion der Rezidive von Nieren- bzw. Organbeteiligungen), bei denen effektiv Anti-dsDNS-Autoantikörper gesenkt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der LJP394 behandelten Patienten gegenüber der Gruppe mit alleiniger immunosuppressiver Standardtherapie (Cardiel et al 2003).

Eine andere Möglichkeit der Immunmodulation soll in der hier präsentierten Studie untersucht werden. Auf der Basis der Immunadhärenz (IA) wurde ein neuartiges Heteropolymer (HP) System entwickelt. Die IA bezeichnet die physiologische Elimination diverser Pathogene aus der Blutzirkulation. Wenn ein Antigen, z.B. viral oder bakteriell, in den Organismus eindringt, bildet dieser spezifische Antikörper, welche daran binden. Dieser so entstandene Antigen/Antikörper-Komplex aktiviert das Komplementsystem und bindet als so genannter Immunkomplex (IC) an Komplementrezeptoren (CR1, CD35) auf Erythrozyten. Die Erythrozyten transportieren die gebundenen Immunkomplexe zu ortsständigen Makrophagen in der Leber und Milz, wo diese abgeräumt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Nach Genehmigung dieser doppelt blind- und plazebokontrollierten Phase-I-Studie durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Düsseldorf wurde in der ersten Phase die Tolerabilität und Toxizität einer einzigen intravenösen Medikamentenapplikation über 15 min an elf männlichen, gesunden Probanden, mit einem durchschnittlichen Alter von 35 Jahren (22 – 51 Jahre), untersucht. Diese freiwilligen Probanden (Normal healthy volunteers: NHV) wurden von der Focus GmbH/ Neuss/ Deutschland geworben. Die ersten acht NHV wurden in zwei Gruppen mit jeweils vier Probanden aufgeteilt. In der ersten Gruppe erhielten drei Probanden jeweils 1 mg ETI104, einem vierten wurde eine Placebolösung verabreicht. In der zweiten Gruppe erhielten drei Probanden 5 mg ETI104, ein vierter ebenfalls eine Placebolösung. Später wurden drei weitere Probanden (NHV 101-103) mit 5 mg ETI104 dosiert, um weitere Untersuchungen zur funktionellen Aktivität des *in vivo* gebundenen Medikaments durchzuführen. Klinisch manifeste Erkrankungen, bekannte Allergien bestanden bei diesen Probanden nicht. Ebenfalls hatte keiner der Patienten eine Vormedikation zum Studienzeitpunkt.

3.1.2 Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 50 Jahren
- Body mass index (BMI) zwischen 18 und 28 kg/m²
- Systolischer Blutdruck 90-140 mmHg, diastolischer Blutdruck 60-90 mmHg
- Herzfrequenz 40-90/min
- Protokollgemäße Verhaltensweise der Probanden

3.1.3 Ausschlußkriterien

- Alter unter 18 Jahren
- Klinisch auffälliges EKG
- Klinisch auffällige laborchemische Parameter (Blutbild, Leber-, Nierenwerte)
- Vorbekannte Allergien oder relevante allergische Reaktionen
- Einnahme verschreibungspflichtiger Medikamente innerhalb 28 Tage vor Medikation
- Einnahme rezeptfreier Medikamente innerhalb 14 Tage vor Medikation
- Einnahme von Drogen innerhalb 30 Tage vor Medikation
- HIV-AK und/oder Hepatitis B-AK und/oder Hepatitis C-AK positiv
- Vorhergegangener Kontakt mit Mausantikörpern (z.B. in anderen Studien)

3.2 Patientenpopulation

Die Patientenpopulation setzte sich aus vier weiblichen und zwei männlichen SLE-Patienten, im Alter von 26 bis 55 Jahren (Durchschnitt 36,6 Jahre) zusammen. Alle Patienten wiesen eine stabile Krankheitsaktivität auf und erfüllten die unten aufgeführten Einschlusskriterien. Die Tabelle 8 im Anhang zeigt detaillierte klinische Daten der einzelnen Patienten. Die sechs SLE-Patienten wurden aus der Kollagenoseambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf rekrutiert und betreut. Die Krankheit wurde gemäß den ACR Kriterien (Tan et al 1982, modifiziert 1997) diagnostiziert, die Krankheitsaktivität anhand des „Systemic Lupus activity measurement score“ (SLAM) bestimmt. In der Studie erhielten alle sechs SLE-Patienten offen 5 mg des Medikaments in einer einzigen Injektion über 15 min.

3.2.1 Einschlußkriterien

- Alter 18 Jahre oder älter
- Beschriebener SLE
- Autoantikörpertiter gegen ds-DNS über 25 IU/ml bestimmt in einem Radioimmunoassay (RIA)
- Orale Kortikosteroidtherapie mit einem Prednisolonäquivalent nicht über 10 mg/d. Keine Therapieveränderung innerhalb der letzten sechs Monate
- Stabiler Krankheitsverlauf während der letzten sechs Monate
- Schriftliche Einverständniserklärung
- Einnahme oraler Kontrazeptiva (bei Frauen) während der folgenden sechs Monate

3.2.2 Ausschlußkriterien

- Alter unter 18 Jahren
- SLAM score >1 eines Organs mit Ausnahme von Haut und Gelenken (falls SLAM score stabiler Wert, auch >2)
- Hinweise auf eine signifikante Nierenerkrankung definiert durch einen erhöhten Serum-Kreatinin-Spiegel (>2,0 mg/dL)
- Hinweise auf eine signifikante Lebererkrankung definiert durch erhöhte GPT, GOT, GT, AP oder gesamt Bilirubin- Werte (>200% der Normalwerte)
- Leukopenie (<2500 Leukozyten/mm³) oder Neutropenie (<1000 Neutrophile/mm³) und/oder thromboembolische Komplikationen in der Anamnese
- Nicht oder unzureichend behandelte Hypertonie definiert als diastolischer Blutdruck >100 mmHg, instabile Angina pectoris oder signifikante kardiovaskuläre oder zerebrovaskuläre Ereignisse (z.B. Myokardinfarkt, Schlaganfall)
- Hinweise auf ein Anti-Phospholipid-Syndrom
- Hinweise auf maligne Tumoren und/oder HIV-Infektion
- Schwangere und/oder adipöse Frauen / Männer

3.3 Studienbeschreibung

Definierte laborchemische und pharmakokinetische Parameter wurden an einem Screening-Besuch der Probanden, sowie jeweils am Tag 0, 1, 2, 7, 14, und Tag 28 nach Medikamenteneinnahme bestimmt:

Hämatologische Parameter:

- Differentialblutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten)

Laborchemische Parameter:

- Albumin
- Alkalische Phosphatase
- Gesamtbilirubin
- Chlorid
- Cholesterin
- Eisen
- Eiweiß (gesamt)
- γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT)
- Glucose
- Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT)
- Glutamat-Pyruvat-Transferase (GPT)
- Harnsäure
- Harnstoff
- Immunglobuline
- Kalzium
- Kreatinin
- Kreatinin-Phosphatkinase
- Laktat-Dehydrogenase (LDH)
- Natrium
- Triglyceride

Virusstatus

- Hepatitis B und C, HIV-Antikörpertiter

Urinanalysen:

- Bilirubin
- Blutbestandteile (Erythrozyten, Leukozyten)
- Eiweiß
- Ketonkörper
- Mikroskopische Betrachtung (wenn erforderlich)
- Nitrit
- PH-Wert
- Spezifisches Gewicht
- Uringlukose
- Urobilinogen

Andere Parameter:

- AHP-Bindung an Erythrozyten (FACS Analysen)
- AHP-Konzentration im Plasma (FACS Analysen)
- CR1 Rezeptor auf Erythrozyten (FACS Analysen)
- Anti-Ds-DNS-Autoantikörper im Plasma (RIA)
- humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA)-Titer im Plasma
- Komplementfaktoren im Plasma (C3/C4)

Am Tag 0 wurde erstmals vor Medikamenten- bzw. Placebogabe Blut zu pharmakokinetischen Untersuchungen und bei Patienten zur Bestimmung der Anti-dsDNS-Autoantikörpertiter abgenommen. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 120 und 240 min nach Injektion, bzw. an den folgenden Tagen 1, 2, 7, 14 und 28 wurden Blutproben zur Bestimmung der oben genannten Parameter entnommen.

Die Komplementfaktoren C3/C4 wurden zu den Zeitpunkten 0, 4 std und an den Tagen 1, 2, 7, 14 und 28 bestimmt.

Für hämatologische und laborchemische Routineparameter wurden zu den Zeitpunkten 0, 4 std sowie an den Tagen 7 und 28 Blutproben entnommen. HAMA wurden beim Screening und an den Tagen 14 und 28 bestimmt.

Zusätzlich wurden Urinanalysen der einzelnen Testpersonen zweimal am Tag 0 (vor und nach Medikamenten- bzw. Placebogabe) und an den Tagen 1, 7 und 28 durchgeführt.

Zur Sicherheit wurden sowohl die Probanden als auch die Patienten 24 Std stationär aufgenommen. Es wurden Blutdruck-, EKG- sowie Körpertemperatur-Kontrollen regelmäßig durchgeführt. Tabelle 6 im Anhang zeigt das Studienprotokoll im Detail.

3.4 Medikamentenbeschreibung

Das Studienmedikament ETI104, ein kovalent gebundenes Polymer, bestand aus einem monoklonalen Mausantikörper der Klasse IgG₁ konjugiert an ds-DNS, die aus Lachshoden gewonnen wurde. Dieser Komplex besitzt eine Bindungsstelle für den menschlichen CR1, der sich u. a. auf Erythrozyten befindet. Es wurde nach den Richtlinien der „current Good Manufacturing Practices“ (CGMP) entwickelt und gemäß der „U.S. Points to Consider“ (PTC) und der Internationalen Konferenz of Harmonization guidance getestet. ETI104 wird von der „Goodwin Biotechnology Inc.“ (GBI), Plantation, FL, USA, hergestellt. Die hybridisierte Zelllinie für Anti-CR1-Mausantikörper wurde von R. Taylor/ W. Sutherland, Universität von Virginia entwickelt.

DsDNS aus Lachshoden wurde von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA bezogen. Die Konjugation beider Anteile wurde in den GBI-Laboratorien durchgeführt. Das Medikament wurde in einer flüssigen Form geliefert, in einer Endkonzentration von 1 mg/ml in Phosphate buffered saline (PBS) mit einem pH-Wert von 7,5.

3.5 Bestimmung von humanen Anti-Maus-Antikörper (HAMA)

Die Bildung der HAMA (zur Bestimmung der Immunität gegen ETI104) wurde an den Tagen 0, 14 und 28 mittels Radioimmunoassays (Dr. M. B. Khazaeli, University of Alabama, Birmingham Alabama) gemessen. Eine positive HAMA-Antwort wurde definiert als der Mittelwert von Tag 0 plus 3 Standardabweichungen (für Probanden >52 ng/ml; für SLE Patienten >22 ng/ml), musste aber gleichzeitig mindestens doppelt so hoch sein wie der Wert vor Dosierung mit ETI104. HAMA- Werte >250 ng/ml wurden als „starke“ Antwort definiert.

3.6 Radioimmunoassay (RIA, Farr-Assay) zur Bestimmung von Anti-dsDNS-Antikörpern im Serum

Ein Radioimmunoassay wurde zur quantitativen in vitro-Bestimmung der hochaffinen Antikörper gegen doppelsträngige DNS (dsDNS) in Humanserum eingesetzt (Trinity Biotech, Irland). Der Messbereich lag bei 0-100 IU/ml, der Normwerte war <7 IU/ml; alle Werte wurden in Vierfach-Bestimmungen durchgeführt.

3.7 Bestimmung der Komplementfaktoren C3 und C4

Die Komplementfaktoren C3 und C4 wurden mittels Nephelometrie (Behring Werke AG, Marburg, Deutschland) bestimmt. Die Normwerte lagen für C3 bei 90-180 mg/dl, für C4 bei 10-40 mg/dl.

3.8 Laborchemische und hämatologische Parameter

Die verschiedenen Routinewerte für die Blutproben wurden im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universitätsklinik Düsseldorf ermittelt (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Boege).

3.9 HIV- und Hepatitisserologie

Sowohl die HIV- als auch die Hepatitis-Antikörper-Titer wurden im Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universitätsklinik Düsseldorf bestimmt (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer).

3.10 Verwendete Reagenzien

Tabelle 4 im Anhang zeigt eine Übersicht über das verwendete Material.

3.11 Antikörper für FACS-Analysen

Für den Nachweis der konstanten IgG-Region von ET1104 wurde der Antikörper ALEXA488-goat-anti-mouse-IgG (Pharmingen, Heidelberg, Germany) in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Der dsDNS-Anteil wurde mit PicoGreen[®] ebenfalls in einer Verdünnung von 1:200 markiert. Die Anti-dsDNS-Antikörper, die an ET1104 gebunden haben, wurden mit ALEXA488-anti-human-IgG und -anti-human-IgM (Pharmingen, Heidelberg, Germany) in einer Konzentration von 1:200 gefärbt.

Die Komplement-Rezeptoren auf Erythrozyten wurden mit ALEXA[®]488–7G9, in einer Verdünnung von 1:179 nachgewiesen (freundlicherweise von R. Taylor / W. Sutherland, University of Virginia zur Verfügung gestellt). Alle Antikörper wurden in PBS/BSA verdünnt.

3.12 Pharmokokinetische Assays

Die venösen Blutproben wurden in 4 ml EDTA-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) zu den oben beschriebenen Zeitpunkten abgenommenen (siehe 3.3) und 1 ml mit 5 ml PBS/BSA zweimalig gewaschen (3000 rpm/3min). Je nach Ansatz wurden diese zu einer 1% oder 10%igen Erythrozytenlösung verdünnt.

Zur Plasmagewinnung wurde das Vollblut 3 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei –20°C eingefroren.

Zur Erstellung der Standardkurven wurden alle vier Wochen Erythrozyten der Blutgruppe 0 (0-Erys) von einem Spender gewonnen und zur Konservierung 1:2 mit Alservers[®] verdünnt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Hiervon wurden vor dem Einsatz 2 ml zweimal in 10 ml PBS/BSA gewaschen. 500 µl Pellet wurde mit 4,5 ml PBS/BSA zu einer 10%igen Erythrozytenlösung verdünnt. Für die CR1 Standardkurve wurden die Zellen auf 1% weiterverdünnt.

3.12.1 Nachweis von gebundenem ETI104 an Erythrozyten von Probanden und Patienten und von Anti-dsDNS-Antikörpern an Patientenerythrozyten

Zu den definierten Zeitpunkten wurde gebundenes ETI104 an Erythrozyten mittels FACS bestimmt. Hierfür wurde 50 µl der 1%igen Erythrozytensuspension in FACS-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden in Doppelbestimmungen mit 100 µl PicoGreen bzw. 50 µl Alexa[®]488-goat-anti-mouse (Verdünnung siehe oben) mit den Zellen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Lyse der Erythrozyten 10 min mit 1:10 verdünnter FACS-Lysing-Solution behandelt (BD, HD). Als Negativkontrolle wurde statt Antikörper 50 µl PBS/BSA verwendet (no stain). Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml PBS/BSA gewaschen, alle Ansätze wurden zur Konservierung mit 1 ml Cytofix (1:4 verdünnt in PBS/BSA) resuspendiert und max.

1 std bei 4°C bis zur Messung im Kühlschrank gelagert (gilt für alle FACS-Analysen). Alle Messungen wurden doppelt angesetzt und einmal gemessen.

Parallel wurde zu jedem Zeitpunkt eine Standardkurve für die Bindung von ETI104 an Erythrozyten erstellt. Hierfür wurden 100 µl der 0-Erys mit je 10 µl der verschiedenen ETI104-Verdünnungen (50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,6, 0,8, 0,4 ng/µl) bzw. 10 µl PBS/BSA für die Negativkontrolle in FACS-Röhrchen im Schüttelbad bei 37°C 15 min inkubiert (Opsonierung). Nach der Opsonisierung der 0-Erys wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS/BSA gewaschen. Das Pellet wurde aufgeschüttelt und in 1 ml PBS/BSA zu einer 1%igen Erythrozytenlösung verdünnt und bei 4°C bis zur Antikörper-Markierung im Kühlschrank gelagert. Für die Markierungen (in Doppelbestimmungen) wurden die Zellen jeweils mit 50 µl PicoGreen bzw. Alexa[®]488-goat-anti-mouse (Verdünnung siehe oben) gefärbt.

Zum Nachweis von gebundenen Anti-dsDNS-Antikörpern an Erythrozyten bei Patienten wurden die Zellen wie oben beschrieben mit 25 µl Alexa488-goat-anti human-IgG und -IgM gefärbt. Hierfür wurde ebenfalls eine Anti-dsDNS-AK-Standardkurve erstellt. Ein definiertes SLE-Plasma (genannt 5149) wurde zur Erstellung der Anti-dsDNS-AK-Standardkurve mit PBS/BSA 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 verdünnt. Für die Kurve wurden mit ETI104 gesättigte (250 ng) 0-Erys mit 50 µl der verschiedenen Verdünnungen des Plasmas 5149 gemischt. Als Negativkontrolle wurde 50 µl eines Kontroll-Plasmas (Proband) verwendet (1:5 in PBS/BSA verdünnt). Die Ansätze wurden bei 37°C 15 min im Schüttelbad inkubiert und dann zweimal mit 2 ml PBS/BSA gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS/BSA zu einer 1%igen Erythrozytenlösung resuspendiert und mit Alexa[®]488-goat-anti- human-IgG und -IgM wie oben beschrieben gefärbt.

3.12.2 Nachweis von freiem ETI104 im Plasma von Probanden und Patienten

Freies ETI104 im Plasma der Probanden und Patienten wurde zu allen Zeitpunkten nach Inkubation der Plasmen mit 0-Erythrozyten gemessen. Jeweils 50 µl der 1%igen 0-Erys wurden hierfür mit 50 µl der jeweiligen Plasmen für 15 min bei 37°C inkubiert und dann zweimal gewaschen. Der Nachweis des konstanten Teils von ETI104 an den 0-Erythrozyten wurde mit 50 µl Alexa[®]488-goat-anti-mouse geführt, der dsDNS Teil wurde mit 100 µl PicoGreen gefärbt. Negativkontrollen wurden je 50 µl PBS/BSA parallel inkubiert.

3.12.3 Nachweis von freien Anti-dsDNS-Antikörpern im Patienten-Plasma mittels FACS-Analysen

Anti-dsDNS-Antikörper im Plasma von Patienten wurden an ETI104 gesättigte Erythrozyten gebunden und dann mittels Alexa[®]488-goat-anti-human-IgG und -IgM gefärbt. Hierfür wurden je 50 µl des Patienten-Plasmas mit 50 µl der 250 ng ETI104 gesättigten O-Erys inkubiert. Alle Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS/PSA gewaschen. Die Proben wurden mit je 25 µl Alexa[®]488-goat-anti-human-IgG und -IgM gefärbt, die Negativkontrolle mit je 50 µl PBS/BSA versetzt.

Alle Proben wurden bei Raumtemperatur 30 min inkubiert, zweimal gewaschen, lysiert, mit Cytifix resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C maximal 1 std im Kühlschrank gelagert.

3.12.4 Nachweis von CR1 auf Erythrozyten

Zum Nachweis der linearen Bindung von ETI104 wurde beim Screening eine CR1-Standardkurve angesetzt. Die Erythrozyten wurden wie oben beschrieben mit verschiedenen ETI104-Verdünnungen opsoniert, gewaschen und mit jeweils 50 µl Alexa[®]7G9-Antikörper gefärbt.

Zu den Zeitpunkten 0 std, 4 std, Tag 1 und Tag 7 wurde der CR1 Gehalt auf Erythrozyten mittels FACS bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der 1%igen Erythrozyten mit 50 µl Alexa[®]7G9-Antikörper und als Negativkontrolle mit 50 µl PBS/BSA inkubiert. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben weiter behandelt.

3.12.5 Nachweis von intaktem ETI104

Zur Überprüfung der Funktionalität von ETI104 wurden drei weitere Probanden (101, 102 und 103) mit 5 mg ETI104 dosiert und zu den oben angegebenen Zeitpunkten (siehe 3.3) Blutproben entnommen. Es wurden wie oben beschrieben von den Probanden 1%ige Erythrozytensuspensionen erstellt, von denen dann 50 µl mit 50 µl eines SLE-Standard-Plasmas (Anti-dsDNS Titer: 471 IU/ml) inkubiert wurden. Die Zellen wurden in Doppelbestimmungen mit 100 µl PicoGreen, 50 µl Alexa[®]488-goat-anti-mouse (Verdünnung siehe oben) bzw. 25 µl Alexa[®]488-goat-anti-human-IgG und -IgM gefärbt. Als Negativkontrolle wurde statt Antikörper 50 µl PBS/BSA verwendet (no stain).

Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Lyse der Erythrozyten 10 min mit 1:10 verdünnter Facs-Lysing-Solution behandelt (BD, HD). Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml PBS/BSA gewaschen, alle Ansätze wurden zur Konservierung mit 1 ml Cytofix (1:4 verdünnt in PBS/BSA) resuspendiert und max. 1 std bei 4°C bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Alle Messungen wurden doppelt angesetzt.

3.13 FACS-Analysen

Alle Proben wurden zweifach angesetzt und in einem FACS-Sort mit CellQuest 4.1 als Software (beides Becton Dickinson) analysiert. In einem vordefinierten Erythrocyten Gate wurden 10.000 Ereignisse gezählt. Die Ergebnisse wurden als Geo mean Fluoreszens (MFI)-Wert ausgewertet.

3.14 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Student-t-Test durchgeführt. Bei diesem Signifikanztest wurde die Gleichheit bzw. Unterschiedlichkeit der zu vergleichenden Gruppen an einem Parameter gemessen, und zwar an dem Erwartungswert. Deshalb wurde der t-Test auch als **parametrischer Test** bezeichnet. Der Erwartungswert ist im übertragenen Sinn der Mittelwert der Grundgesamtheit. Das Ergebnis des t-Test wurde als p-Wert ausgegeben. Anhand dieses p-Werts wurde entschieden, ob beobachtete Unterschiede statistisch signifikant sind (wenn der p-Wert kleiner ist als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau) oder nicht. Als Irrtumsniveau (Signifikanzniveau) wurde ein Wert von 0,02 zur Ablehnung der Nullhypothese definiert.

Eine Voraussetzung für den Einsatz des t-Tests war die Annahme einer Normalverteilung der zu betrachtenden Zielvariable.

Beim t-Test wurde die Differenz zweier Stichprobenmittelwerte dividiert durch den Standardfehler dieser Differenz als Prüfgröße (Teststatistik) T herangezogen. Die Division durch den Standardfehler führte zu einer Normierung. Ausgehend von der Annahme einer Normalverteilung der Zielvariable folgte t einer ähnlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung, nämlich der t-Verteilung (Lange et al 2001).

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs wurde zur besseren Diskriminierung des Signifikanzniveaus zusätzlich ein non-parametrischer Wilcoxon-Test durchgeführt, welcher insgesamt die gleichen Resultate erbrachte.

Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben kann anstelle des t-Tests für verbundene Stichproben verwendet werden. Er ist ein non-parametrischer Test, der nicht voraussetzt, dass die Messgröße (bzw. die Differenzen) normal verteilt sind. Es wird lediglich angenommen, dass die Differenzen stetig und symmetrisch verteilt sind. Die Nullhypothese stimmt mit der des t-Tests für verbundene Stichproben überein. Die Differenzen werden in wachsender Reihenfolge ihrer absoluten Zahlenwerte geordnet, mit Randzahlen versehen und die Summe der Randzahlen R_+ und R_- der Differenzen mit gleichem Vorzeichen (positive und negative) gebildet. Differenzen mit dem Wert 0 werden bei der Randzahlenbestimmung ausgeschlossen und der Stichprobenumfang n entsprechend verringert.

4 Ergebnisse

4.1 Sicherheitsprofil von ETI104

Um die Sicherheit des Medikamentes zu beurteilen, wurde von den gesunden Probanden sowie von den SLE-Patienten Blut zur Bestimmung hämatologischer und laborchemischer Parameter am Tag 0 (vor Medikation), 4 std nach Medikamentengabe sowie von Tag 1 bis 28, entnommen. Außerdem wurden regelmäßig Urinalysen sowie EKG- und Vitalparameterkontrollen durchgeführt. Einzelheiten siehe Tabelle 6 im Anhang „Studienübersicht“.

Anhand der zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Blutabnahmen konnte gezeigt werden, dass ETI104 insgesamt die untersuchten laborchemischen Parameter nicht nachteilig beeinflusst. Insbesondere wiesen Leber- und Nierenfunktion keine Veränderungen oder Einschränkungen auf. Auch erbrachten die Untersuchungen keinerlei signifikante Abweichungen im Hinblick auf Leukozyten- (inklusive Differentialblutbild) und Thrombozytenzahlen. Die Messungen der Vitalparameter (Blutdruck, Atem- und Herzfrequenz sowie Körpertemperatur) zeigten ebenfalls keine pathologischen Werte. Weder bei den Probanden noch bei den SLE-Patienten wurden signifikante EKG-Veränderungen festgestellt.

Bei den SLE-Patienten kam es nach 4 std zu einem nicht signifikanten Abfall des Hämoglobins (Hb) (mittlerer Hb vor Medikation: 13,83 g/dl SD +/- 1,565 ; 4 std nach Infusion: 11,88, SD +/-1,356; p 0,053). Der Abfall wurde nicht durch Hämolyse verursacht, da es zu keinem signifikanten Abfall des Haptoglobins oder zu einem Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) kam (Werte t0: Haptoglobin 201,67; SD +/- 75,66, 4h: 173,67; SD +/- 63,31, LDH t0: 186,83; SD +/- 68,58; 4h: 153; SD +/- 62,80, Werte beide mit $p > 0,05$ nicht signifikant). Siehe auch Abbildungen 1a, b und c.

Die Komplementfaktoren C3 und C4 wurden zu den Zeitpunkten 0 std, 4 std, Tag 1 und Tag 7 bestimmt. Bei allen Probanden lagen die Werte über den gesamten Zeitraum der Studie im Normbereich. Bei vier der sechs der SLE-Patienten waren die C3- und C4-Werte vor Medikamentengabe unterhalb der Norm. Nach Gabe von ETI104 war nach 4 std ein weiterer Abfall zu beobachten. Am ausgeprägtesten war dies für die Patienten 01 und 05, die beide den höchsten RIA-Wert für Anti-dsDNS-Antikörper aufwiesen und auch die stärkste (absolute und relative) Reduktion von Anti-dsDNS-Antikörpern zeigten.

Bei Patient 01 fiel C3 von 98 auf 63 mg/dl, C4 von 24 auf 6 mg/dl, bei Patient 05 fiel C3 von 82 auf 62 mg/dl und C4 von 11 auf 6 mg/dl.

Die durchschnittliche Reduktion von C3 aller Patienten betrug 17% (von 7% - 36%), C4 fiel um 28% (von 7% bis 75%). Dieser Abfall war jedoch nur transient und die Werte erreichten zwischen 24 std und 48 std wieder ihren Ausgangswert (mit Ausnahme von Patient 01, der in Tabelle 8 im Anhang ausführlich dokumentiert ist). Der Unterschied zwischen 0 std und 4 std in der Gesamtgruppe aller sechs Patienten war für C3 mit einem p-Wert von 0,072 statistisch nicht signifikant, für C4 waren die Werte (p 0,043) signifikant unterschiedlich. Einzelheiten siehe Abbildung 2a und 2b und Tabelle 8 im Anhang. Es fand sich keinerlei klinische Manifestation zu dem beobachteten Abfall der Komplementwerte.

Bei den Patienten zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Änderung der Krankheitsaktivität (bestimmt durch den SLAM-Score, siehe Tabelle 8). Zusammenfassend konnten weder bei den Probanden noch bei den Patienten während des gesamten Beobachtungszeitraums schwerwiegende Nebenwirkungen (s.g. „serious adverse event“: SAE) durch das Medikament festgestellt werden. Es wurden insgesamt zehn nicht bedenkliche Nebenwirkungen (s.g. „adverse event“: AE) bei den Probanden und elf bei den SLE-Patienten beobachtet. Hiervon wurden sechs Ereignisse als „möglicherweise mit der Medikamentengabe in Verbindung stehend“ betrachtet. Bei drei Probanden der 5 mg-Gruppe und bei drei SLE Patienten wurde eine Reaktion im Bereich des Kanülenpflaster festgestellt. Die Affektionen bildeten sich bei allen Betroffenen spontan ohne Therapie nach 2-24 std wieder zurück. Systemische Beeinflussungen waren nicht zu beobachten.

Eine Patientin wurde bei vorbekannter Meniskusläsion während der Studie operiert, was die Kriterien eines SAE erfüllt.

Detaillierte Angaben über alle Nebenwirkungen gehen aus der Tabelle 9 im Anhang hervor.

4.1.2 Bildung von HAMA

Die Messung der humanen Anti-Maus-Antikörper (HAMA) mittels Radioimmunoassay (RIA) an den Tagen 0, 14 und 28 diente sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den SLE-Patienten zur Erfassung der eventuell entwickelten Immunität gegenüber ETI104. HAMA-Werte >250 ng/ml wurden als eine „starke“ Antwort definiert (Spertini et al 1999). Der durchschnittliche HAMA-Wert aller Probanden zum Zeitpunkt 0 std betrug 21,1 ng/ml; SD+/- 10,3. Ein Wert von 52 ng/ml (21,3 + 3 Standardabweichungen) wurde als signifikante, positive Reaktion definiert. Ein Proband, der 1 mg des Medikaments erhielt und drei Probanden, die 5 mg erhielten, entwickelten bis zum Tag 28 eine „leichte“ HAMA-Antwort mit Werten <100 ng/ml. Einer der Probanden, dem die höhere Medikamentendosis appliziert wurde, wies am Studienende einen HAMA-Wert von 112 ng/ml auf. Die SLE-Patienten zeigten am Tag 0 einen durchschnittlichen HAMA-Wert von 15 ng/ml; SD: +/-2,4 ng/ml, wobei hier ein Wert von 22,1 ng/ml (15 + 3 Standardabweichungen) als signifikante, positive Reaktion definiert worden war. Vier der sechs Patienten entwickelten eine „leichte“ HAMA-Antwort bis zum Tag 28 (80, 77, 179, 200 ng/ml).

Sowohl die absoluten HAMA-Werte als auch die Häufigkeit der positiven Antworten in den einzelnen Gruppen waren nicht unterschiedlich.

Im gesamten Studienverlauf entwickelten sowohl Probanden als auch Patienten keine HAMA-Werte über 200 ng/ml. Gemäß den Angaben der Literatur zu Anti-Maus-Antikörpern im Menschen (Kimball et al 1995) wurden alle Werte als unbedenklich, klinisch nicht signifikant angesehen.

Für Einzelheiten siehe auch Tabelle 10 im Anhang.

4.2 Aktivität und Bindung des Medikaments

4.2.1 Bindung von ETI104 *in vitro* an Erythrozyten von gesunden Probanden

Die Bindung von ETI104 an Erythrozyten konnte *in vitro* im Vollblut gesunder Spender gezeigt werden. Nach 15 min Inkubation der Erythrozyten mit steigenden Dosierungen (16 – 500 ng) von ETI104 wurden die Zellen für den Nachweis der konstanten Region des Antikörpers mit Alexa[®]488-goat-anti-mouse (GAM) und für den Nachweis des DNS-Anteils mit PicoGreen markiert.

Abbildungen 4a und 4b zeigen Beispiele der FACS[®]-Analysen eines gesunden Probanden. Dargestellt ist die Bindung von ETI104 an Erythrozyten, ersichtlich an der Zunahme der Fluoreszenz von PicoGreen und Alexa[®]488-goat-anti-mouse nach Inkubation der Zellen mit ETI104. Wie in Abb. 4c zu erkennen, besteht eine lineare Zunahme der Fluoreszenz mit steigender ETI104-Dosierung bis zu einer Sättigung bei etwa 500 ng/ml (Beispiel der Messung eines Probanden, andere Probanden zeigen i.W. die gleiche Kinetik).

Die kompetitive Bindung von ETI104 an CR1 auf Erythrozyten wurde nachgewiesen, indem Erythrozyten *in vitro* mit ETI104 vorinkubiert wurden und danach CR1 mit dem spezifischen Antikörper 7G9 (ALEXA[®]-markiert) gefärbt wurde. Abbildung 5 zeigt die proportionale Abnahme der CR1-Dichte auf Erythrozyten bei steigender ETI104-Dosierung *in vitro*, ausgedrückt als Geo-Mean-Fluoreszenz.

Auch *in vivo* konnte durch Abnahme der Fluoreszenz des spezifischen 7G9 Signals die Bindung an CR1 gezeigt werden (Beispiel siehe Abbildung 6).

4.2.2 Bindung und Clearance von ETI104 aus dem Plasma *in vivo* bei gesunden Probanden

Für die pharmakokinetischen Daten wurde mittels FACS[®] die Bindung von ETI104 an Erythrozyten gemessen

Bei allen Probanden wurde eine schnelle und effektive Bindung des Medikaments am Erythrozyten bereits zum ersten Messzeitpunkt nach 15 min nachgewiesen, was an einer Zunahme der Fluoreszenz von PicoGreen (Nachweis des DNS-Anteil) und GAM (für die Nachweis der konstanten Region des Antikörpers) zu sehen ist (Beispiel für Probanden siehe Abbildung 7a).

Freies ETI104 im Plasma der Probanden wurde durch Inkubation des Plasmas mit Standarderythrozyten (Blutgruppe 0) nachgewiesen: Bei zwei Probanden, die 5 mg des Medikaments erhielten, war bis 30 min nach Injektion eine geringe Menge von ungebundenem ETI104 im Plasma nachweisbar (Beispiel in Bild 7b).

Abhängig von der applizierten Dosis konnte die Bindung des konstanten Antikörperanteils von ETI104 auf den Erythrozyten 2 – 14 Tage durch GAM-Färbung nachgewiesen werden. Nach dem 14. Tag zeigte keiner der Probanden mehr gebundenes ETI104 an den Erythrozyten (Beispiel siehe Abb. 7a). Das PicoGreen-Signal (Nachweis des DNS-Anteils) war deutlich kürzer als das GAM-Signal detektierbar (siehe Abbildung 7a).

4.2.3 Bindung von ETI104 und von Anti-dsDNS-Antikörpern an Erythrozyten *in vivo* bei Patienten mit SLE

Nach den Versuchen zur Bindungskinetik und -kapazität von ETI104 an gesunden Probanden, wurden im Folgenden Untersuchungen zur Funktionalität, insbesondere zur Fähigkeit der Bindung von Anti-dsDNS-Antikörpern *in vivo*, an SLE-Patienten durchgeführt. Bei allen sechs Patienten war ebenfalls eine schnelle Bindung von ETI104 an Erythrozyten nachweisbar. Abbildungen 8 (a-f) zeigen die Bindung von ETI104 detailliert bei allen sechs SLE-Patienten. Nach 15 min war bei allen Patienten freies Medikament im Plasma detektierbar, bei einem Patienten bis zu max. 2 std (nicht gezeigt).

4.2.4 Bindung der Anti-dsDNS-Antikörper an Erythrozyten und Reduktion aus dem Plasma

Parallel zur Bindung von ETI104 an Erythrozyten (s.o.) konnte eine schnelle Bindung des Zielpathogens (hier Anti-dsDNS-Antikörper) aus dem Plasma an ETI104 bei allen sechs Patienten gezeigt werden (siehe Abb. 8a-f).

Außerdem wurde zu definierten Zeitpunkten (siehe Tabelle 6 im Anhang) im Plasma mittels RIA die hochaffinen Anti-dsDNS-Autoantikörper und durch FACS®-Analysen die Gesamtmenge der Anti-dsDNS-Autoantikörper bestimmt.

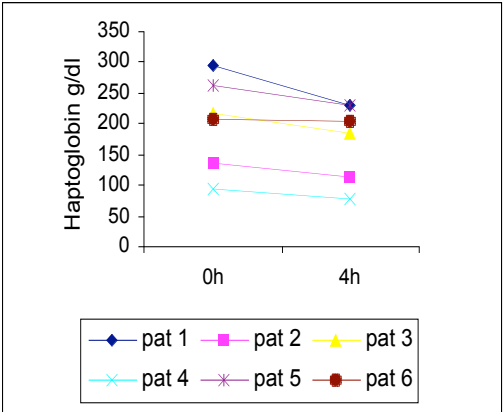
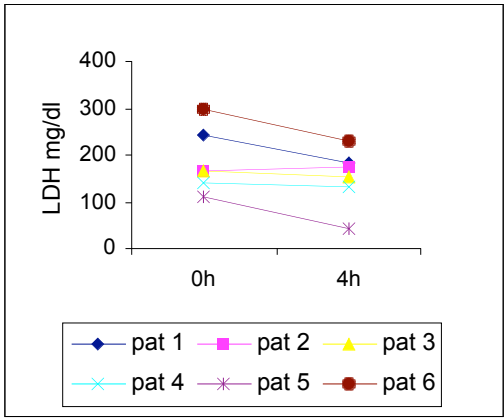
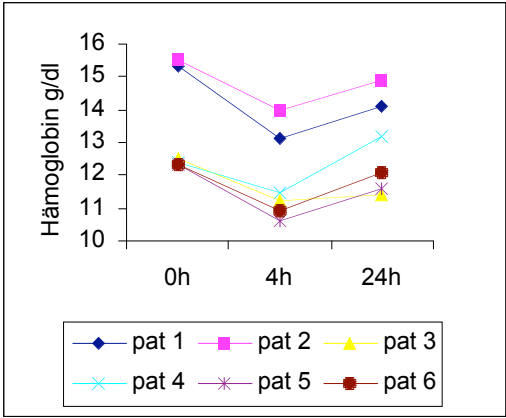
Bei allen sechs Patienten konnte 15 min nach Medikamentengabe eine effektive Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper im Serum von durchschnittlich 55% (43 – 62%) des Ausgangswerts dokumentiert werden (siehe Abbildung 9). Auch die Gesamtmenge der Anti-dsDNS-Antikörper konnte nach 15 min um 65% (40- 79%) reduziert werden (nicht gezeigt).

Bei fünf von sechs Patienten wurden die niedrigsten Titer 15 min nach ETI104-Gabe dokumentiert, bei Patient 01 nach 4 std. (Abbildung 10). Nach 1-2 std war ein Anstieg der Anti-dsDNS-Autoantikörper zu beobachten: am Tag 1 erreichten alle sechs Patienten durchschnittlich 81% ihres Ausgangswertes. Nach 28 Tagen war bei insgesamt vier von sechs SLE-Patienten der RIA unter dem Ausgangswert (Pat. 1, 2, 3 und 6), bei drei von sechs war die Reduktion im Student-t-Test statistisch signifikant ($p < 0,03$). Patient 01 und 02 zeigten eine 18%ige Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörper, Patient 06 eine 10%ige Reduktion (siehe Abbildung 12). Patient 04 und 05 wiesen zum Studienende einen nicht signifikanten Anstieg der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper um 13% bzw. 7% auf. Die durchschnittliche Reduktion aller sechs Patienten betrug am Tag 28 2% auf 98% vom Ausgangswert (zwischen 18%iger Reduktion bis zu 13%igem Anstieg im Vergleich zu den Ausgangswerten; Abbildung 11).

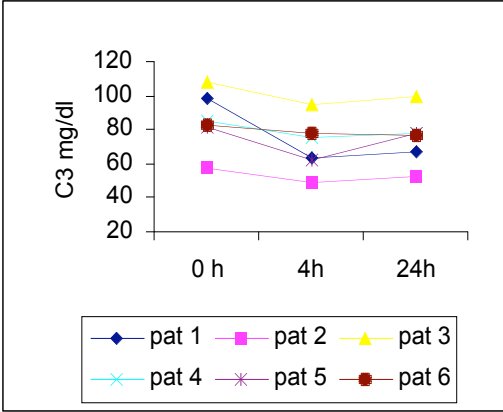
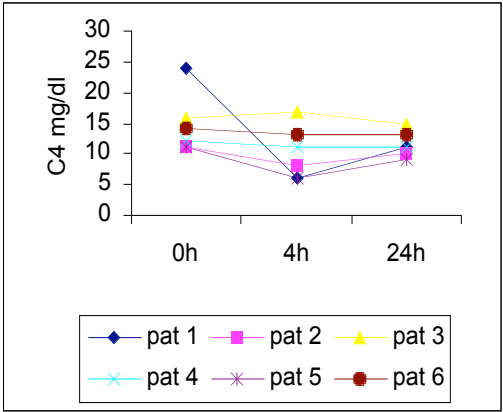
4.3 *In vitro* Funktionalität von ETI104

Der schnelle Abfall der PicoGreen-Fluoreszenz gegenüber dem GAM-Signal (siehe Abbildung 7a) legt einen Verlust der Aktivität des Medikaments nahe. Um die Stabilität von ETI104 zu prüfen, wird das Vollblut dreier weiterer Probanden zu den im Kap. 3.3 genannten Zeitpunkten entnommen, nachdem ihnen vorher 5 mg des Medikaments appliziert wurde. Diese *in vivo* ETI104-gesättigten Erythrozyten werden dann *in vitro* mit einem definierten SLE Plasma (RIA-Wert 507 IU/ml) inkubiert und anschließend mit den Antikörpern Alexa[®]488-goat-anti-human-IgG und -IgM (GAH) sowie PicoGreen und Alexa[®]488-goat-anti-mouse gefärbt.

Bei allen drei Patienten ist initial in den ersten 15 min ein paralleler Anstieg aller drei Fluoreszenzen (PicoGreen, GAM und GAH) in den FACS[®]-Analysen zu erkennen. Während das GAM-Signal bis Tag 2 konstant und an Tag 14 noch schwach nachweisbar ist, nimmt die Fluoreszenz des PicoGreens nach 15 min ab und ist nach 2 std nicht mehr detektierbar. Das GAH-Signal liegt von der Kinetik dazwischen: während es nach 60 min abgeschwächt ist, erreicht es bei zwei der drei Probanden nach 4 std und bei einem Probanden am Tag 1 den Ausgangswert (ein Beispiel ist in Abb. 12 gezeigt).



Abbildungen 1a,b und c: Werte von Hämoglobin (bis 24h), Laktatdehydrogenase (LDH) und Haptoglobin zum Zeitpunkt t0 (vor Medikamentengabe) und 4h nach Medikamentenapplikation der sechs SLE-Patienten.



Abbildungen 2a und b: Komplementfaktoren C3 und C4 der sechs SLE-Patienten zu den Zeitpunkten t0, 4h und 24h nach Medikamentenapplikation.

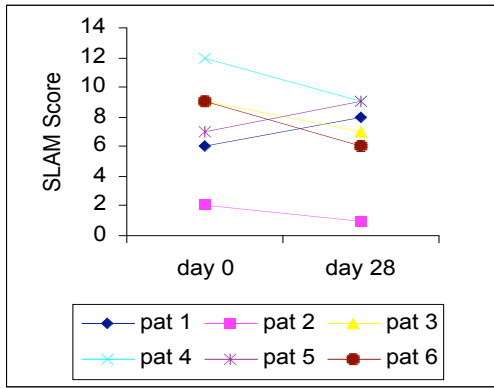
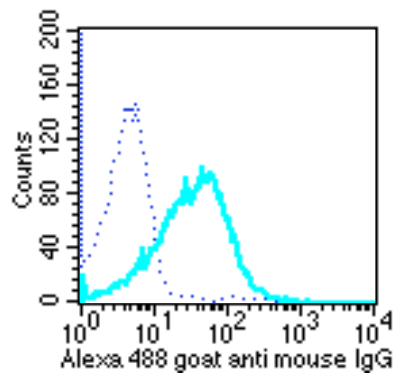
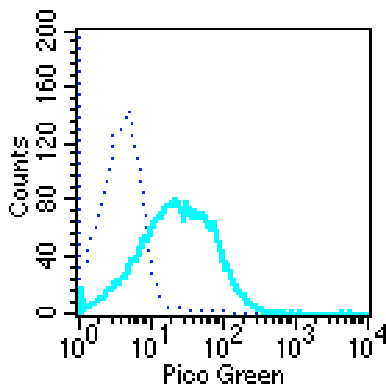


Abbildung 3: Werte der SLAM-Scores der sechs SLE-Patienten vor Medikamentenapplikation am Tag 0 und am Tag 28.



Abbildungen 4a und b: Beispiel der FACS®-Analysen mit PicoGreen zur Markierung des DNS-Anteils (linkes Histogramm) und mit Alexa-goat-anti-mouse zum Nachweis der konstanten IgG Region von ETI104 (rechts). Das gepunktete Histogramm zeigt jeweils die Messung ohne Zugabe von ETI104, das durchgehende Histogramm die Messung mit 500 ng ETI104.

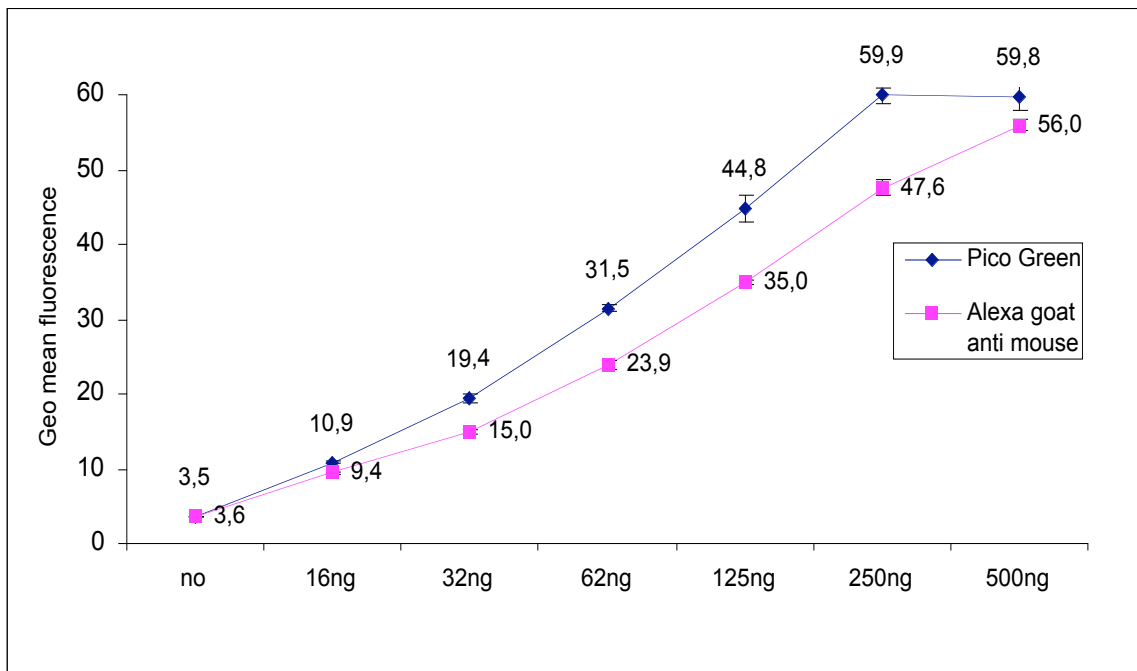


Abbildung 4c: Darstellung der proportionalen Bindung von ETI104 an den Erythrozyten (gefärbt mit PicoGreen und Alexa[®]-goat-anti-mouse) mit steigender Medikamentendosierung (0 – 500 ng).

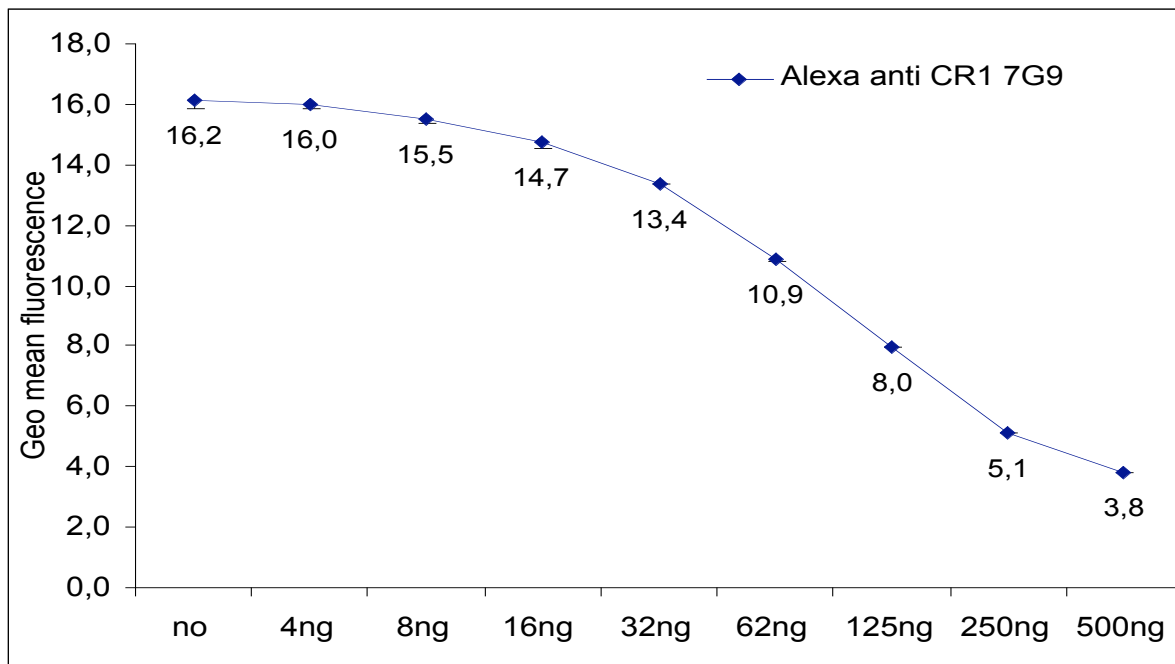


Abbildung 5: Dargestellt ist die kompetitive Bindung von ETI104 an CR1 auf Erythrozyten, indem die Erythrozyten **in vitro** mit verschiedenen ETI104-Konzentrationen (0 – 500 ng) inkubiert wurden.

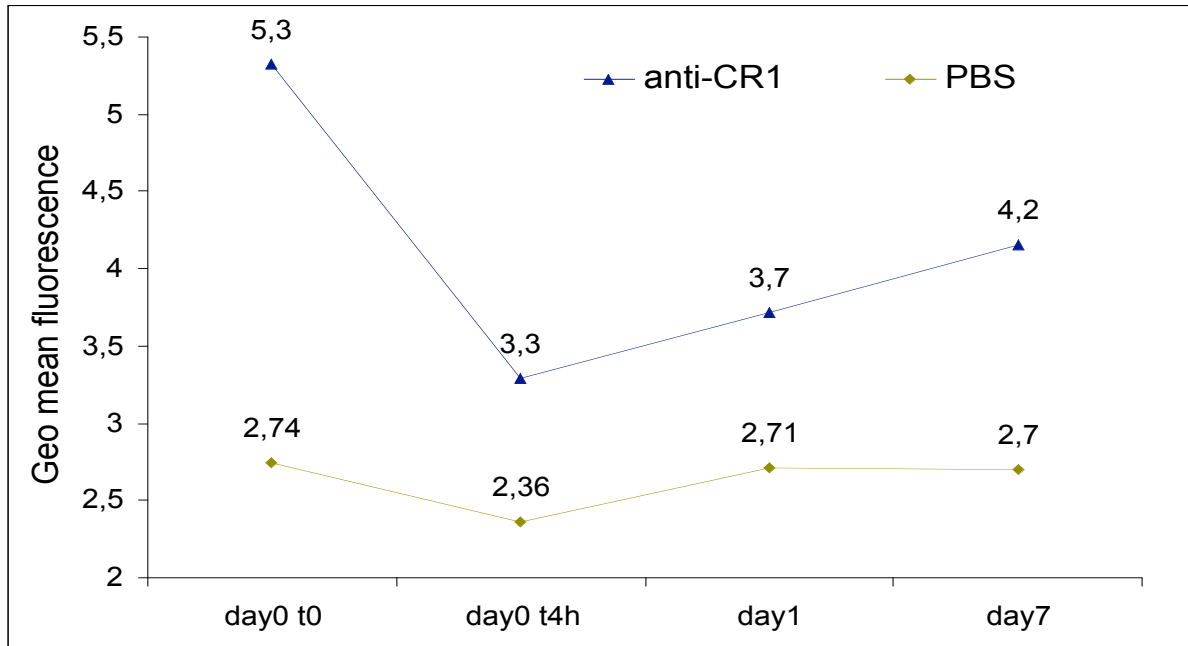


Abbildung 6: Darstellung der kompetitiven Bindung von ET1104 zu verschiedenen Zeitpunkten an CR1 auf Erythrozyten *in vivo* mit 5 mg ET1104 und Markierung von CR1 mit Alexa-7G9. Die PBS-Kurve dient als Negativ-Kontrolle.

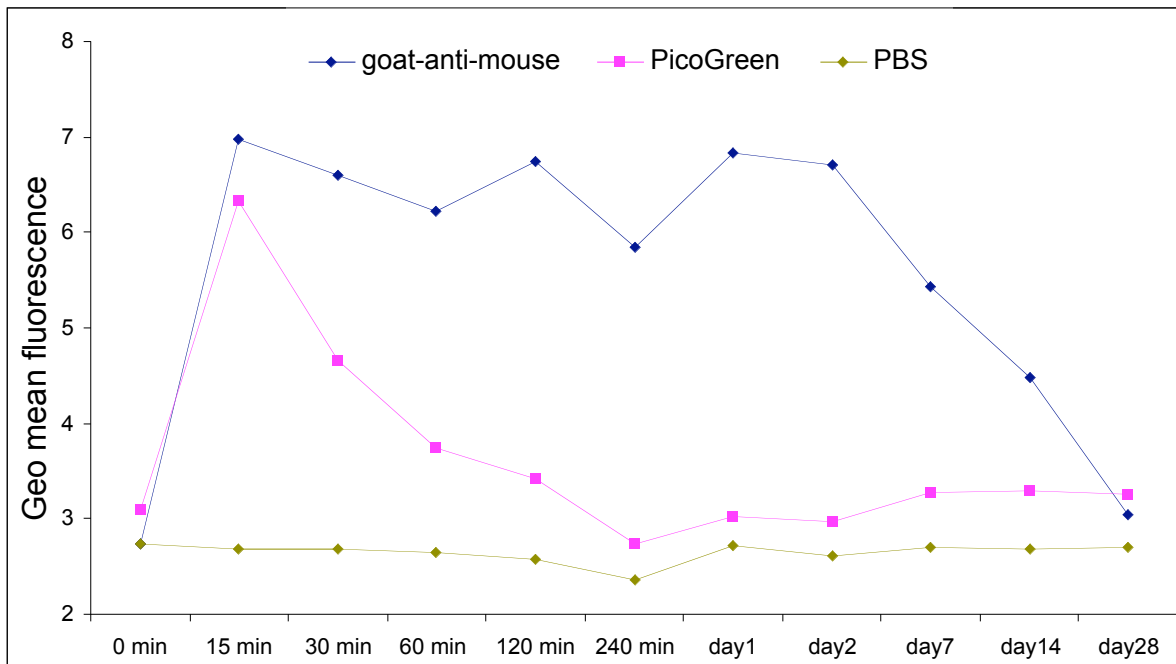


Abbildung 7a: Dargestellt ist die Bindung von ET1104 (nach 5 mg Injektion) *in vivo* an Erythrozyten im Vollblut eines Probanden. Die Bindung von ET1104 an den Erythrozyten 15 min nach Medikamentenapplikation wird durch die Zunahme der Fluoreszenzen von PicoGreen und Alexa[®]-goat-anti-mouse (GAM) nachgewiesen. Als Kontrolle dienen Zellen, welche mit PBS inkubiert wurden.

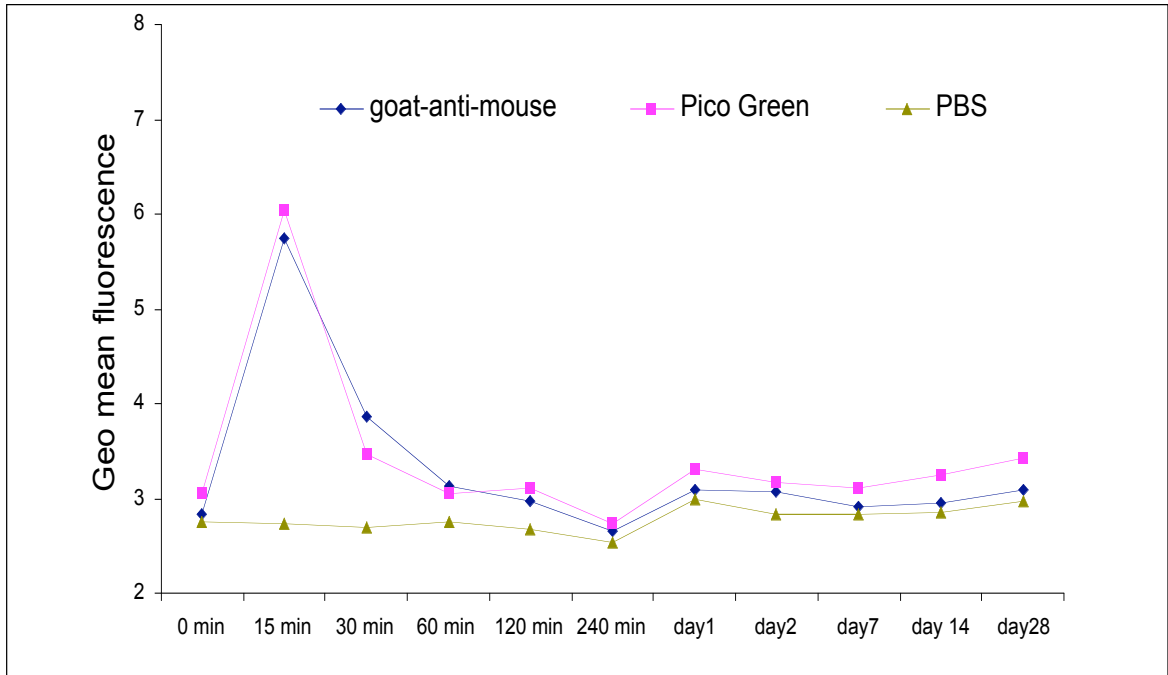
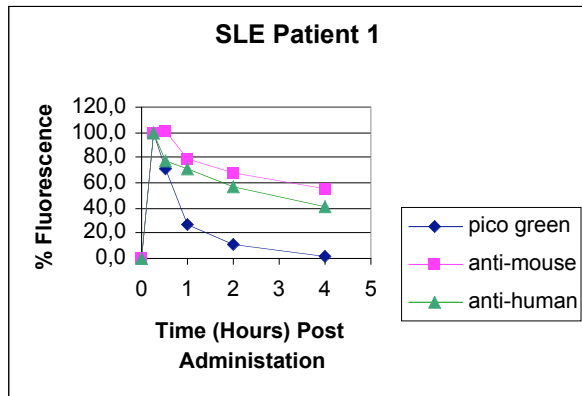
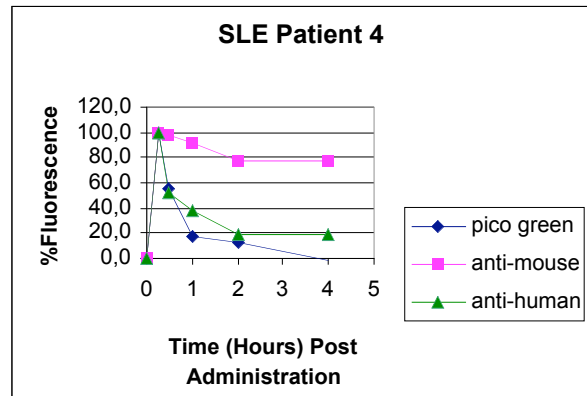


Abbildung 7b: Nachweis von freiem ET1104 im Plasma eines Probanden durch Inkubation des Plasmas mit Standarderythrozyten der Blutgruppe 0 und anschließender Färbung mit PicoGreen und Alexa[®]-goat-anti-mouse zum Nachweis von gebundenem ET1104. Das Beispiel zeigt freie Medikation nach 15 min bis 30 min im Plasma eines mit 5 mg ET1104 dosierten Probanden.

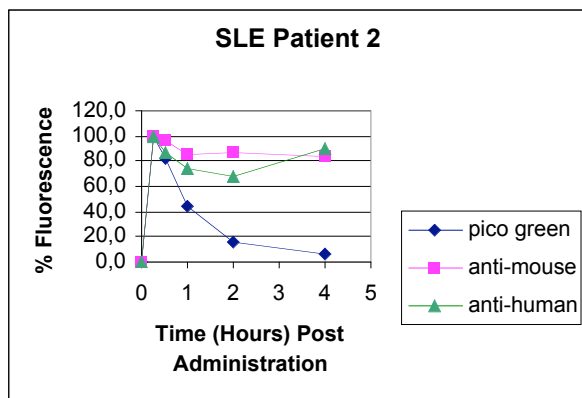
A



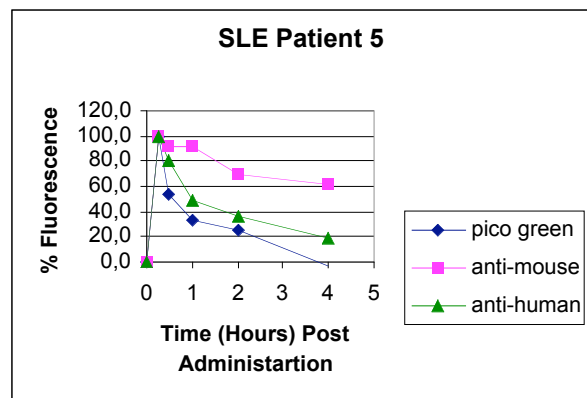
D



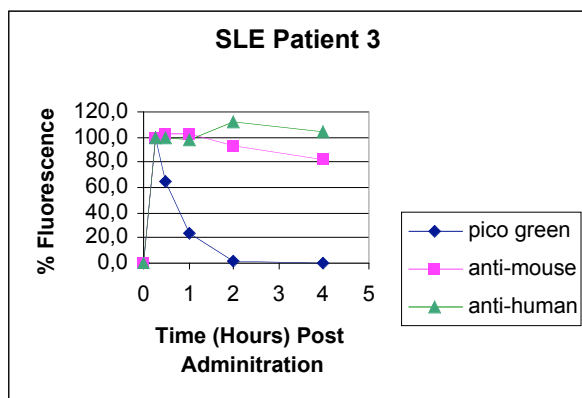
B



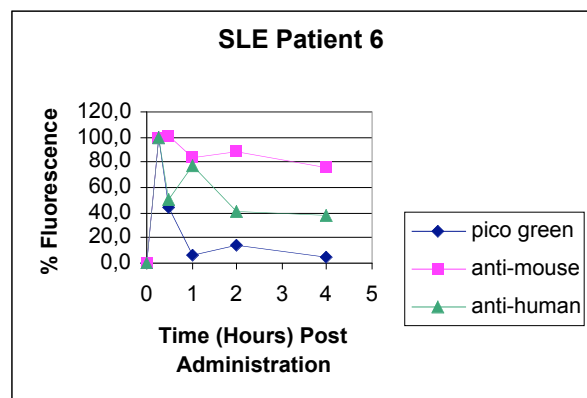
E



C



F



Abbildungen 8 a-f: Bindung von ETI104 *in vivo* an den Erythrozyten der SLE-Patienten in den ersten 4 std. Inkubation der Erythrozyten mit Alexa[®]-goat-anti-mouse (Markierung der Mauskomponente) und PicoGreen (Markierung des DNS-Anteils). Der Antikörper Alexa[®]-goat-anti-human dient zum Nachweis der gebundenen Anti-dsDNS-Antikörper. Alle Patienten erhielten 5 mg. Dargestellt ist die prozentuale Bindung, wobei 100% die maximal gemessene Fluoreszenz ist. Alle FACS[®]-Analysen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

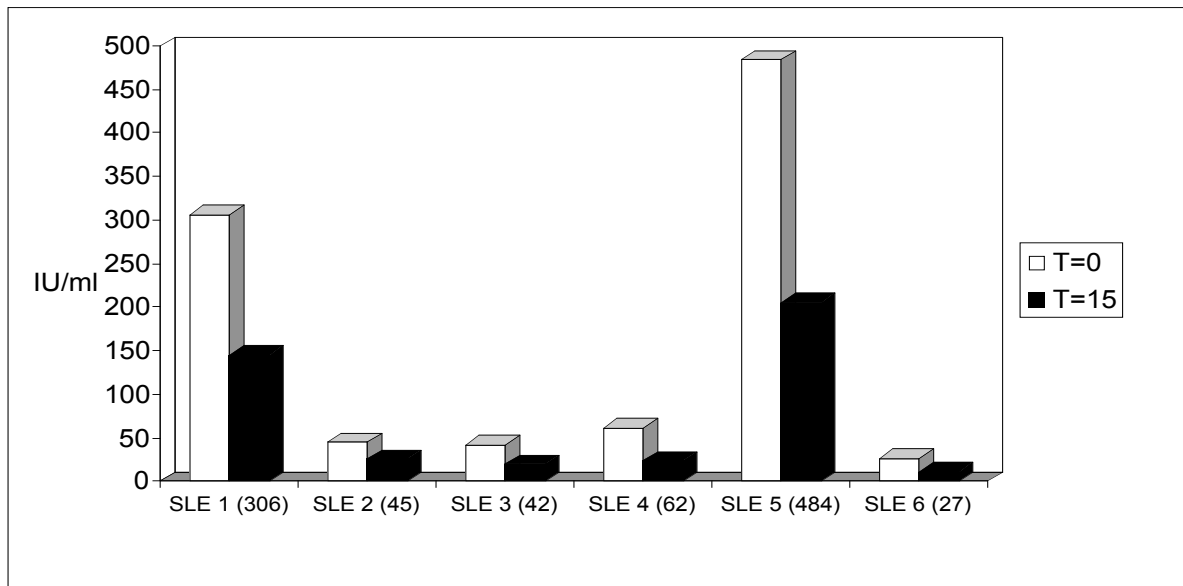


Abbildung 9: Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper (in IU/ml), bestimmt durch einen Radioimmunoassay (RIA) zum Zeitpunkt t0 und 15 min nach Applikation von ET1104. Alle sechs SLE-Patienten zeigten eine signifikante Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper von 43 – 62%. Die Ausgangswerte des RIAs stehen für die einzelnen Patienten in Klammern, die mittlere Reduktion lag bei 54%. Alle RIA-Messungen wurden vierfach bestimmt.

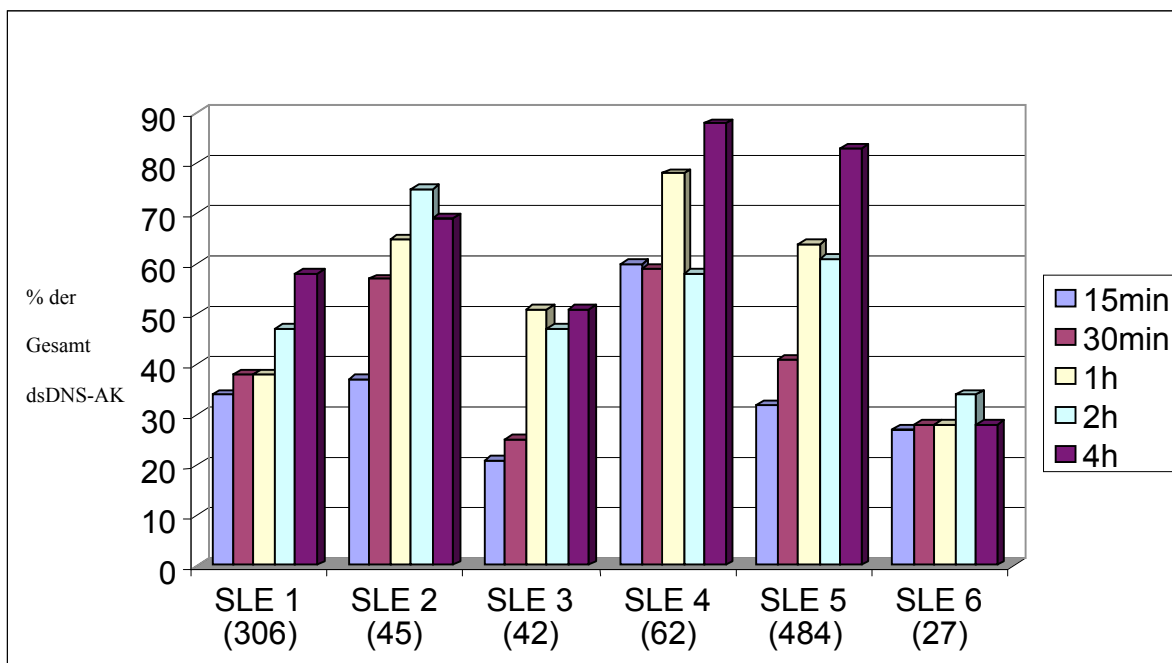


Abbildung 10a: Darstellung der prozentualen Reduktion der gesamten Anti-dsDNS-Antikörperwerte aller sechs Patienten (FACS-Analysen) gemessen zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 120 und 240 min nach Medikamentenapplikation. Bei fünf von sechs Patienten stiegen die Antikörpertiter nach 30 min wieder an. Nach 4 std war eine Reduktion der gesamten Anti-dsDNS-Antikörper von 11-71% zu sehen. Die Werte in Klammern geben die Ausgangsantikörpertiter im RIA wieder.

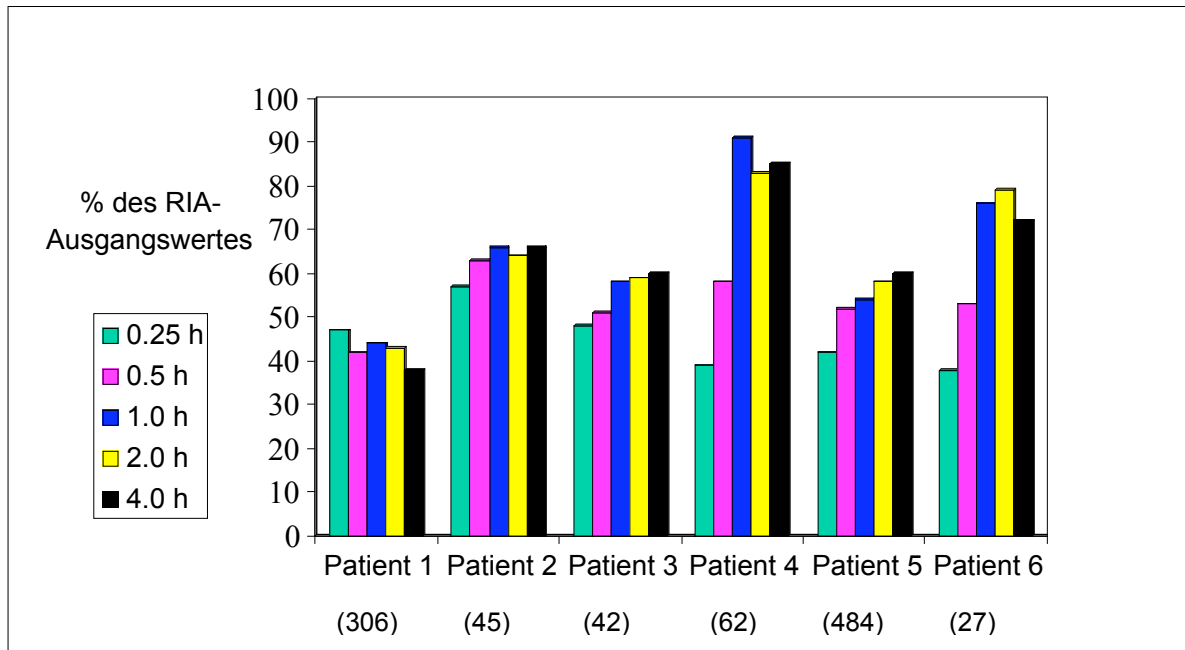


Abbildung 10b: Darstellung der Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper aller sechs SLE-Patienten im Verlauf (RIA), gemessen zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 120 und 240 min nach Medikamentenapplikation. Bei 5/6 Patienten stiegen die Titer bereits nach 30min wieder an. Nach 4std war eine Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper von 15-62% zu sehen. Die Werte in Klammern zeigen den initialen Antikörpertiter, gemessen im RIA.

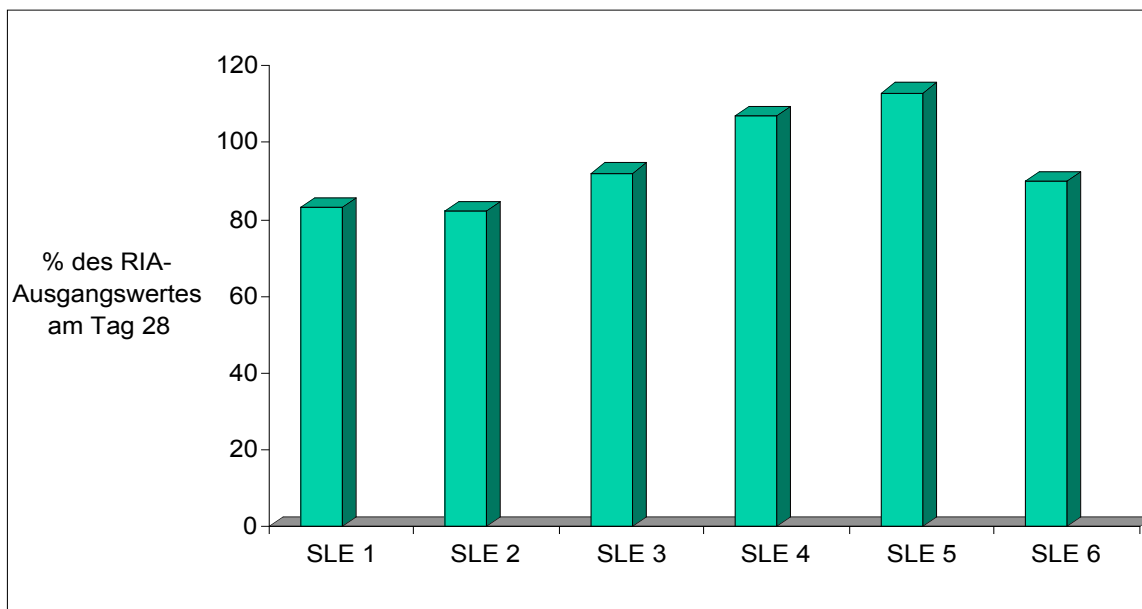


Abbildung 11: Darstellung der prozentualen Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper (RIA) am Tag 28 bezogen auf den Ausgangswert der SLE-Patienten 1-6. Die RIA-Werte der Patienten 1 und 2 sind am Tag 28 nach ET1104 Applikation um 18% reduziert; Patient 6 weist eine 10% Reduktion. Bei den Patienten 4 und 5 ist ein nicht signifikanter Anstieg der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper am Studienende zu verzeichnen (7 bzw. 13% des RIA-Ausgangswertes).

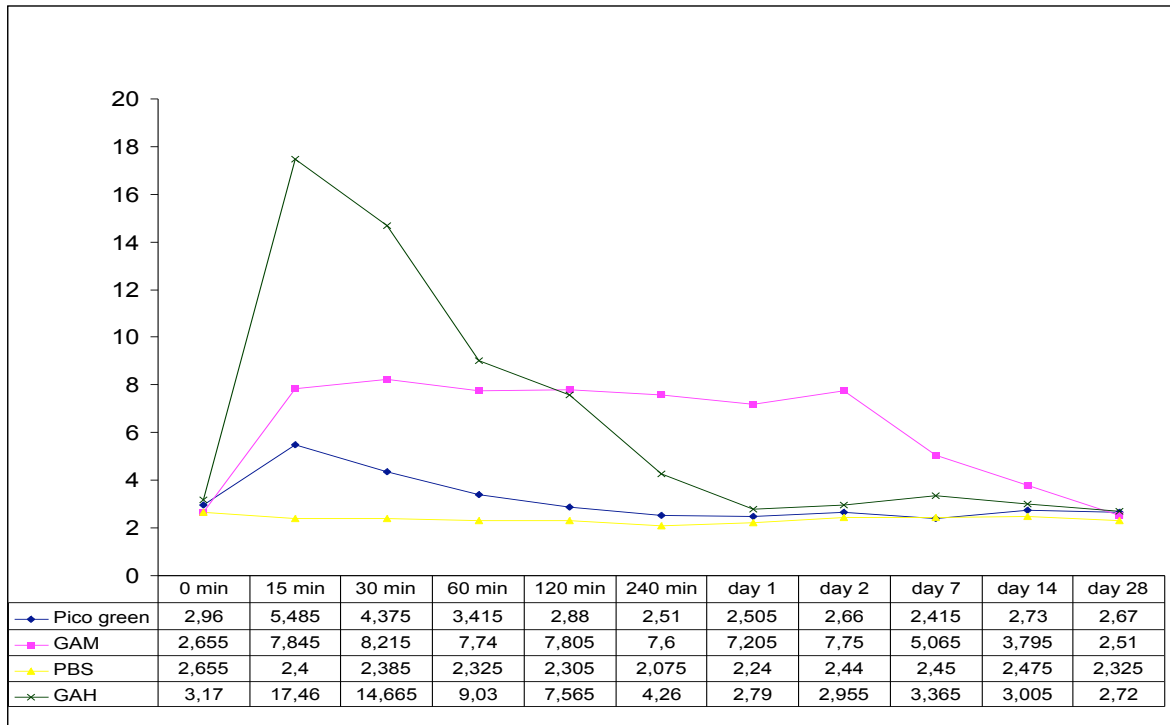


Abbildung 12: Funktionalität von ET1104: Das Vollblut dreier weiterer Probanden wird nach Gabe von ET1104 mit hochtitrigem Patientenplasma inkubiert und anschließend mit den Antikörpern Alexa⁴⁸⁸-goat-anti-human-IgG und -IgM (zum Nachweis von gebundenem Anti-dsDNS) sowie PicoGreen und Alexa⁴⁸⁸-goat-anti-mouse (zum Nachweis von ET1104) gefärbt.

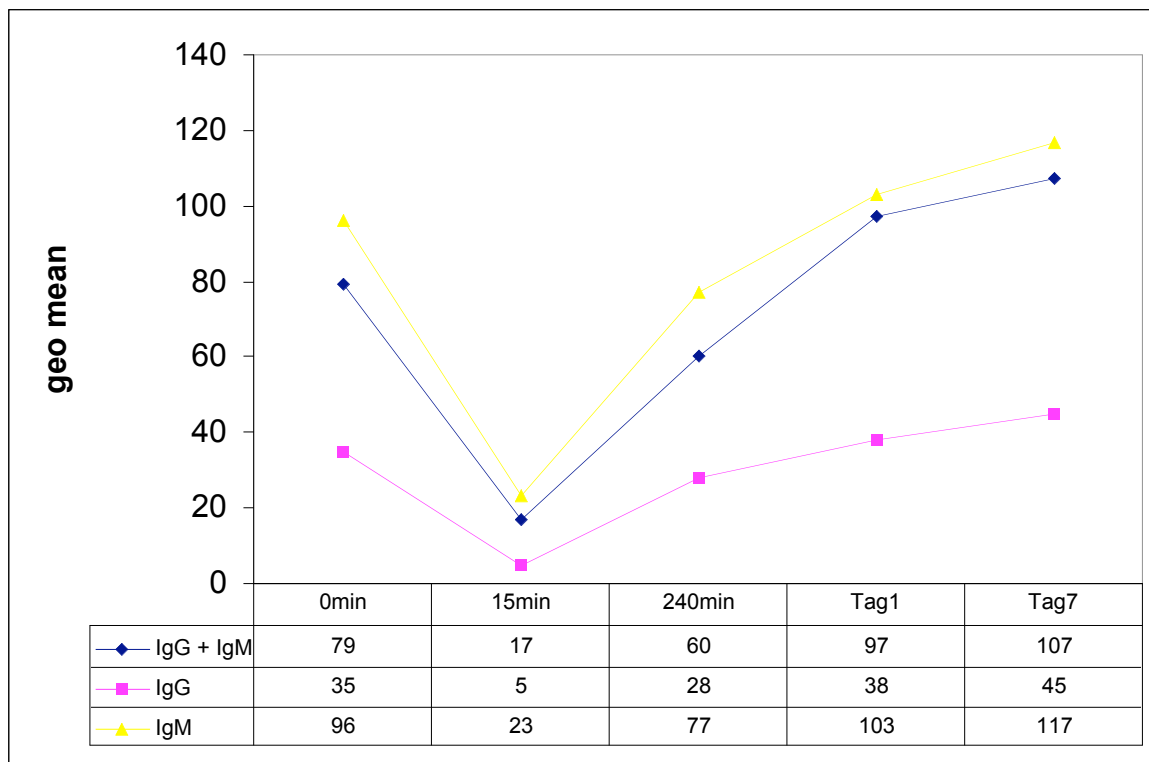


Abbildung 13: Plasma eines SLE Patienten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mit ET1104 gesättigten Spender-Erythrozyten inkubiert. Die Bindung von IgG- und IgM-Anti-dsDNS-Antikörpern aus dem Plasma wurde separat und zusammen im FACS gemessen. Der Wiederanstieg der Gesamt-dsDNS-Antikörpermenge zum Zeitpunkt t 4 std beruht auf einem Anstieg beider Subtypen IgG und IgM.

5 Diskussion

Primäres Ziel dieser Studie war die Elimination von Anti-dsDNS-Antikörpern aus der menschlichen Blutbahn. Damit sollte durch eine intravenöse Einmalapplikation von ETI104 erstmalig das Wirkprinzip der neuen Heteropolymer Technologie im Menschen bewiesen werden, das theoretisch in den folgenden Schritten abläuft:

1. Bindung des Immunkonjugats an den menschlichen Komplement-Rezeptor 1 (CR1) auf Erythrozyten.
2. Bindung des Pathogens (hier Anti-dsDNS-Antikörper) an das Immunkonjugat.
3. Konsekutive Senkung des Pathogens/Antikörper-Spiegels im Serum.
4. Nachfolgend wird der Immunkonjugat/Antikörperkomplex auf dem Erythrozyten in das retikulo-endotheliale System gebracht, um dort abgebaut zu werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir die Punkte 1-3 des Wirkmechanismus belegen: bei allen Probanden und Patienten konnten wir eine schnelle und effektive Bindung von ETI104 an CR1 auf Erythrozyten dokumentieren (Punkt 1), die weder CR1- noch dosisabhängig war. Dies führte bei den SLE-Patienten außerdem zu einer Bindung von Anti-dsDNS-Antikörpern an den DNS-Anteil von ETI104 (Punkt 2), was eine signifikante Reduktion sowohl des gesamten Anti-dsDNS-Antikörpertiters (bestimmt durch FACS[®]-Analysen), als auch der hochaffinen Antikörper (bestimmt durch einen Radioimmunoassay) im Patientenserum zur Folge hatte (Punkt 3). Damit konnten wir das Wirkprinzip der AHP-Technologie erstmalig im Menschen bestätigen.

Im Rahmen unserer *in vivo* Untersuchungen am Menschen war es uns nicht möglich zu zeigen, dass der Immunkomplex in die Leber transportiert wird und die Antikörper dort von der Oberfläche der Erythrozyten geklärt werden. Hierfür hätte man die Erythrozyten radioaktiv markieren müssen. Dieser Teil des Wirkprinzips wurde allerdings schon von Taylor et al in den Affen-Modellen belegt (Taylor et al, 2001).

Die schnelle Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörper im Serum nach 15 min war jedoch nur transient. Bei einigen Patienten war bereits während der ersten 4 std nach der Gabe von ETI104 ein leichter Wiederanstieg zu verzeichnen. Für diese Beobachtung kann man drei mögliche Erklärungen diskutieren:

- 1) Der Wiederanstieg der Anti-dsDNS-Antikörper beruht auf einer Neusynthese.
- 2) In extravaskulären Kompartimenten befindliche Anti-dsDNS-Antikörper diffundieren in das Blutsystem zurück.
- 3) Die kovalente Bindung zwischen dem dsDNS-Anteil von ET1104 und dem Anti-dsDNS-Antikörper ist möglicherweise instabil. Daraus resultiert eine Wiederfreisetzung des Anti-dsDNS-Antikörper vom DNS-Anteil noch vor Clearance durch die Leberpassage.

Gegen eine Neusynthese von Antikörpern durch B-Lymphozyten sprechen verschiedene Literaturdaten zur Antikörperproduktion durch B-Zellen. Diese korrelieren nicht mit den Ergebnissen unserer Studie. Verschiedene Experimente zur Aktivierung von B-Zellen zeigen eine Expression der „frühen“ Aktivationsgene *c-myc* und *egr-1* während der Antigen spezifischen T-Zell-/B-Zell-Interaktion erst 6-8 std nach Zugabe eines monovalenten Antigens (Harriman et al 1993). Diese Zeitangabe wird durch eine *in vivo*-Studie über Lymphozytenpopulationen in der Milz bestätigt, in der B-Gedächtnis-Zellen zur Neusynthese von IgM bei der Sekundärantwort ca. 4-6 Tage benötigen (Kelsoe 1993). Diese Daten stimmen mit den Angaben von Janeway et al überein (Janeway et al 1997). Eine Neusynthese von Anti-dsDNS-Antikörpern ist somit als Ursache für den Wiederanstieg des Titers nach bereits 30 min bei den Patienten 02 bis 06 nicht naheliegend.

Eine durchaus wünschenswerte Diffusion der Anti-dsDNS-Antikörper aus extravasalen Kompartimenten in das Blutsystem wird durch die Ergebnisse an den Patienten 01, 05 und 06 gestützt. Bei diesen drei Patienten geht die Reduktion der hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper (gemessen mittels RIA) nicht mit der Reduktion der Gesamtmenge der Anti-dsDNS-Antikörper (gemessen mittels FACS[®]) einher. Bei dem Patient 01 beobachtete man zwischen 15 min und 4 std nach Injektion eine weitere Reduktion der hochaffinen Antikörper, wobei der Titer der gesamten Anti-dsDNS-Antikörper über den gleichen Zeitraum anstieg. Bei Patient 05 blieb der Titer der hochaffinen Antikörper im Wesentlichen konstant, während die niedrigaffinen (Gesamt)-Antikörper bereits nach 15 min deutlich anstiegen. Patient 06 wiederum zeigte nach 4 std eine stärkere Reduktion der gesamten Anti-dsDNS-Antikörper als der hochaffinen Antikörper.

Diese unterschiedlichen Relationen in der Qualität des Antikörper-Anstiegs könnte bei den drei Patienten für eine Umverteilung aus dem Gewebe in das Blutsystem sprechen, da sich präferenziell die hochaffinen Autoantikörper im Gewebe anreichern, und die niedrigaffinen schneller in die Blutbahn rediffundieren würden. Allerdings zeigten verschiedene Studien zur Antikörperregulation am Tiermodell, dass sich nach intravenöser Applikation ca. 50% der IgG- und ca. 20% der IgM-Antikörper in extravasalen Raum anreichern (Bystryn et al 1970). Diese Daten sprechen eher gegen die Umverteilung der Antikörper aus dem interstitiellen Raum: man würde bei den Patienten einen präferierten IgG Anstieg im Plasma vermuten. Eigene Untersuchungen an drei SLE-Patienten zeigten, dass sich der IgG/IgM Ratio im Plasma bei dem Wiederanstieg nicht veränderte (siehe Abb. 13).

Des Weiteren wird in der Literatur ein Zeitraum von 2-5 Tagen für den Wiederanstieg von Immunglobulinen nach anderen Verfahren zur Senkung von Antikörpern angegeben (Bystryn et al 1970, Derksen 1984, Charlton 1985, Gaubitz et al 2003). Auch dies spricht gegen eine Umverteilung, da bei den Patienten schon 15 min nach i.v. Applikation ein Titeranstieg der Anti-dsDNS-Antikörper im Plasma zu sehen war.

Die Zeitspanne von 15 min ist demnach für eine Umverteilung erheblich zu kurz.

Für einen instabilen ETI104-Antikörper-Komplexes sprechen die zu verschiedenen Zeitpunkten nachlassenden Fluoreszenzen, mit denen die unterschiedlichen Regionen des Medikaments detektiert wurden.

Die Intensität des mit PicoGreen gefärbten DNS-Anteils des Medikaments nahm innerhalb der ersten 4 std nach Medikamentengabe sowohl bei Probanden als auch bei vier der sechs Patienten stark ab. Im Gegensatz hierzu blieb die mit Alexa488-goat-anti-mouse gefärbte konstante Region noch bis zu zwei Wochen nach der Injektion nachweisbar. Außerdem war eine Korrelation des PicoGreen Signals (DNS-Teil) zu der Fluoreszenz der mit Alexa488-goat-anti-human gefärbten Anti-dsDNS-Antikörper am Immunkonjugat zu beobachten. Dies war bei vier von sechs Patienten zu dokumentieren und spricht für eine Lösung des DNS-Anteils von ETI104 und zusätzlicher Freigabe der Anti-dsDNS-Antikörper. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine enzymatische Spaltung *in vivo* durch endogene Serum-DNAsen, die die Bindung zwischen einzelnen Nukleotiden aufspalten und somit zum Abbau von Nukleinsäuren imstande sind.

Des Weiteren konnten aus dem Serum von SLE-Patienten zwei verschiedene Typen von IgG Anti-dsDNS-Antikörpern mit DNS-hydrolytischer Aktivität nachgewiesen werden, die sich von der normaler Serum-DNAsen unterschied. Diese spezifischen DNAsen zeigten zudem andere Eigenschaften im pH-Optimum und Temperaturreisistenzen (Nevzorova, 2003), die zu einem vereinfachten Abbau von Nukleinsäuren am DNS-Teil des Medikaments führen könnte. Korrespondierend zu dieser Annahme eines *in vivo* aktiven Enzyms sind die *in vitro* Daten über AHP des Herstellers, die bisher keinen Hinweis auf eine Instabilität des Antikörper/Antigen-Konstruktes lieferten (Originaldaten des Herstellers nicht gezeigt).

Einschränkend zu dieser Erklärung bleibt festzustellen, dass es bei Patient 02 und 03 keine Korrelation der Fluoreszenzen von PicoGreen und goat-anti-human gab.

Ein weiteres Argument für die Instabilität des Konstruktes liefern die Zusatzuntersuchungen an den Probanden 101-103. Bei den Probanden 101 und 102 ist nach einem initialen Anstieg des PicoGreen Signals (Markierung des dsDNS-Teils) *in vivo* unmittelbar nach der Gabe von ETI104 bereits nach 120 min der Ausgangswert wieder erreicht. Bei Proband 103 schwächt die PicoGreen Fluoreszenz schon nach 30 min wieder stark auf den Ausgangswert ab. Parallel hierzu nimmt die Bindungskapazität *in vitro* von ETI104 auf den Erythrozyten ab. Dies zeigen die Versuche nach Inkubation der Probandenerythrozyten mit einem hochtitrigen Anti-dsDNS-Antikörperserum, wo sich eine Korrelation der goat-anti-human Fluoreszenz und des PicoGreen Signals zeigt (siehe Abbildung 12). Dies lässt ebenfalls auf eine Inaktivierung des Medikaments schließen, das nach Verlust des DNS-Teils (durch DNase im Plasma) nicht mehr in der Lage ist den Anti-dsDNS-Antikörper zu binden.

Zusammenfassend sprechen unsere Daten für eine Instabilität der kovalenten Bindung des Immunkonjugats, von dem nach 4 std nur noch die konstante Region am Komplement-1-Rezeptor bindet, das den DNS-Anteil verloren hat und somit auch den Anti-dsDNS-Antikörper aus der Bindung freigibt. Der freie Immunkomplex bestehend aus dem DNS-Teil des Medikaments und einem Anti-dsDNS-Antikörper könnte eine Komplementaktivierung induzieren. Diese Vermutung wird durch den Komplementabfall von C3 und C4 innerhalb der ersten 4 std nach Applikation von ETI104 bestätigt.

Trotz der Annahme eines instabilen Anti-dsDNS-Antikörper-ETI104-Komplexes mit initial schnellem Wiederanstieg der Antikörper-Titer im Serum, fand sich zum Studienende nach 28 Tagen bei drei von sechs Patienten eine signifikante Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörper (siehe Abb. 11). Einen signifikanten Anstieg über das Ausgangsniveau, eine Beobachtung wie sie nach Therapie mittels Immunadsorption z.B. gemacht wurde (Terman 1978, für Review siehe Dau 1995), fand sich bei keinem Patienten.

Eine Schlüsselrolle bei dem Wirkprinzip der Heteropolymer basierten Technologie und von ETI104 stellt die Dichte des Komplement-1-Rezeptors auf Erythrozyten dar, da hierüber die Bindung von ETI104 an die Erythrozyten vermittelt wird. Da SLE-Patienten einen niedrigeren CR1-Gehalt auf Erythrozyten haben als gesunde Probanden (400-500 fIU vs. 700 fIU; Jouvin et al 1986; Yen et al 1989) stellte sich die Frage, ob die untersuchte Technologie bei Patienten mit SLE effektiv funktionieren würde. Auch unser Patientenkollektiv wies gegenüber den gesunden Probanden signifikant erniedrigte CR1-Werte auf, die Variation des CR1-Gehalts war außerdem erheblich (27 bis 1381 fIU, Mittelwert 556 +/- 365 für gesunde Probanden und 153 +/- 133 für Patienten; $p < 0,05$). Ein erniedrigter CR1-Gehalt kompromittiert theoretisch die Möglichkeit ETI104 zu binden und Antikörper zu eliminieren. Unsere Daten belegen allerdings, dass die AHP-Technologie trotz eines reduzierten CR1-Gehalts bei Patienten anwendbar ist: trotz stark differenter CR1-Werte bei Patient 01 und 05 (372 vs. 27) zeigten beide eine ähnliche Bindungskapazität für ETI104 und waren beide in der Lage ähnlich hohe Antikörpertiter effektiv zu senken. Bei Patient 01 beobachtete man zum Zeitpunkt 15 min einen Rückgang auf 53% des Ausgangswertes (306 IU/ml), was bei einem vorausgesetzten Blutvolumen von 5 l einem errechneten Gesamtrückgang um 808.250 IU/5l entsprechen würde. Bei Patient 05 beobachtete man sogar eine Reduktion auf 58% des Ausgangswerts (484 IU/ml) und einer Gesamtreduktion (ebenfalls einem Blutvolumen von 5 l vorausgesetzt) um 1.383.600 IU/5l. Auch der Gesamt-Anti-dsDNS-Antikörpertiter wurde bei beiden Patienten in ähnlichem Ausmaß (66% bzw. 68%) gesenkt. Dieser Vergleich zeigt, dass trotz erniedrigtem CR1-Gehalt auf Erythrozyten bei SLE Patienten die Heteropolymer Technologie anwendbar wäre.

Neben der Reduktion von Anti-dsDNA-Antikörpern, sollte durch diese Studie die Verträglichkeit einer intravenösen Einmalapplikation an gesunden Probanden sowie Patienten mit SLE untersucht werden. Zusammenfassend konnten keine ernsthaften Medikamenten-Assoziierten Komplikationen festgestellt werden, welche der Definition eines so genannten „serious adverse event“ (SAE) entsprach.

Im Wesentlichen wurden drei Nebenwirkungen in dem 28tägigen Beobachtungszeitraum dokumentiert: Die erste war ein lokal begrenztes Hauterythem im Bereich des Pflasters an der Venenverweilkanüle bei drei der elf mit Verum dosierten Individuen, welche möglicherweise mit der Studienmedikation in Zusammenhang stand. Diese Reaktion verursachte keine Symptome und bildete sich ohne spezifische Therapie nach spätestens 48 std zurück. Von der Anwendung anderer Antikörper (z.B. Anti-TNF_α oder Anti-IL1_β bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis) ist bekannt, dass lokale Hautreaktionen an der Injektionsstelle zu den häufigsten Nebenwirkungen überhaupt gehören und je nach Substanz und Studie bis zu 30% angegeben werden. In einer Studie mit unterschiedlichen Medikamentendosierungen eines Anti-IL1_β, führten die an der Injektionsstelle auftretenden Hauterytheme (7% bei 1.0 mg/kg Dosierung und 10% bei 2.0 mg/kg Dosierung von Anakinra) sogar zu einem vorzeitigen Studienabbruch bei den höher dosierten Patientengruppen (Cohen et al, 2002). Eine erst kürzlich durchgeführte Studie berichtete über eine Erythema multiforme ähnliche Hautreaktion, die sich nach der sechsten Applikation des neuen TNF_α-Inhibitor Adalimumab nicht nur entlang der Injektionsstelle ausbreitete, sondern auch an der dorsalen und palmaren Handfläche. Das Absetzen des Medikaments führte zu einem schnellen Rückgang des Hauterythems (Beuthien, 2005).

Des Weiteren klagten drei der Probanden sowie zwei SLE-Patienten während der Studie über leichte Kopfschmerzen. Da allerdings nur zwei Ereignisse (Proband 02 und 07) während der ersten 24 std nach der Dosierung auftraten, wurde dies nicht mit der Medikamentengabe in Verbindung gebracht.

Ein nicht signifikanter Abfall des Gesamthämoglobins und der Komplementfaktoren C3 und C4 wurde 4 std nach der Applikation von ETI104 bei allen SLE-Patienten beobachtet. Der parallele Abfall beider Parameter könnte als Ausdruck einer durch Bindung des Anti-CR1-Antikörpers an den Erythrozyten vermittelten Hämolyse mit Komplementaktivierung interpretiert werden.

Dagegen spricht allerdings, dass es zu keiner Änderung der Hämolyseparameter (normale LDH- und Haptoglobin-Werte) kam.

Der transiente Hämoglobin-Abfall könnte unseres Erachtens vielmehr Ausdruck der Immunkomplex-Clearance in der Leber sein, da die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten während der Passage durch die Leber nicht in die Messung des Gesamthämoglobins eingehen. Zusätzliche Hinweise gibt es auch in früheren Studien an Primaten, wo ebenfalls ein vorübergehender Hämoglobin-Abfall beobachtet wurde (Taylor et al, 2001). Letztendlich ist jedoch eine klare Aussage über die Leberpassage nur mit radioaktiv markierten Erythrozyten zu machen.

Als Grund für den Hämoglobin-Abfall wäre außerdem ein transienter Verdünnungseffekt durch die Blutentnahmen (ca. 120 ml in den ersten 4 h) und/oder durch eine Flüssigkeitsaufnahme (Individuen waren nach Dosierung nicht mehr nüchtern) denkbar. Um diesen transienten Hämoglobin-Abfall in nachfolgenden Studien weitgehend ausschließen zu können, sollten die Studienteilnehmer innerhalb der ersten Stunden nach Medikamentenapplikation nüchtern bleiben.

Sowohl bei den Probanden, als auch bei den SLE-Patienten wurde die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen ETI104 (HAMA) beobachtet. Die Höhe und die Intensität der Antikörperantwort hing von der applizierten Menge von ETI104 ab, wobei die Werte in etwa denen aus Studien mit anderen nicht humanisierten Antikörpern entsprechen dürften. In einer kürzlich durchgeführten Phase-I/II-Studie, die Rituximab als eine zusätzliche Therapieoption bei SLE-Patienten zur Senkung der B-Zellaktivität untersuchte, war bei sechs von siebzehn Patienten eine spezifische Antikörperantwort von ≥ 100 ng/ml gegen das applizierte Medikament festzustellen (Looney et al, 2004). Ein genauer Vergleich der Werte ist allerdings nicht möglich, da es kein standardisiertes oder kommerzielles Verfahren zur Bestimmung von HAMA gibt und unser Test lediglich für den Nachweis von Autoantikörpern gegen ETI104 etabliert wurde.

Trotz der als gering eingeschätzten Antikörperantwort ist die Anwendung der aktuellen Version des Medikaments limitiert, da nach mehrmaliger Applikation eine stärkere Immunantwort auftreten könnte. Aus diesem Grunde wurde ein humanisierter CR1-Antikörper entwickelt (ETI201).

Ein so deimmunisierter Antikörper könnte ohne Bedenken mehrfach appliziert werden, um im Rahmen von Dosis-Findungsstudien die effektivste Dosierung mit der höchsten Antikörperbindungskapazität zu etablieren. Unsere Studie zeigte, dass eine höhere Dosierung von ETI104 zwar möglich ist, diese jedoch keine effektivere Anti-dsDNA-Antikörperreduktion erzielte (1 mg vs 5 mg).

Wie oben bei den Ausführungen über das Sicherheitsprofil beschrieben, beeinflusste die Einmal-Applikation von ETI104 die klinische Situation der Patienten nicht negativ. Ebenso wenig war ein klinischer Benefit zu erwarten bzw. antizipiert, da nur klinisch stabile, inaktive Patienten in die Studie eingeschlossen wurden. Da die Rolle der Anti-dsDNA-Antikörper bei der Entstehung des SLE kontrovers diskutiert wird, stellt sich generell die Frage, ob eine alleinige Senkung des Antikörpertiters bei Patienten mit einer aktiven Erkrankung, z.B. durch wiederholte Gabe von ETI104, eine klinische Verbesserung bei SLE-Patienten erbringen würde. Verschiedene Daten zeigen eine Korrelation zwischen der Höhe der Anti-dsDNA-Antikörpertiter und dem Auftreten von Nierenbeteiligung bei Patienten mit SLE (Alba et al, 2003). Demnach haben Patienten mit erhöhten Antikörpertitern ein größeres Risiko an einer Lupusnephritis zu erkranken. Untersuchungen, die verschiedene Antikörperisotypen differenzierten, stellten einen signifikanten Zusammenhang des IgG Isotyps und dem Auftreten von Lupusnephritis, sowie des IgM Isotyps und der kutanen Manifestationsform des Lupus dar (Forger et al, 2004). Eine weitere Studie zur Pathogenese des SLE zeigte, dass die Ablagerung von Immunkomplexen nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Lupusnephritis spielt. Durch Entnahme von Hautbiopsien bei 45 SLE-Patienten und anschließender Färbung von nukleosomalen Antigenen stellte man eine Immunkomplexablagerung entlang der epidermalen Basalmembran fest (Grootscholten et al, 2003). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eine Senkung der Anti-dsDNA-Antikörper eine sinnvolle Therapieoption darstellt, die nicht nur den Krankheitsprogress verhindert, sondern darüber hinaus auch die bestehenden Krankheitssymptome mindern könnte.

Eine Studie zu LJP394, ein Molekül, welches selektiv in Anti-dsDNS-Antikörper produzierenden B-Lymphozyten Toleranz induziert, zeigt einen direkten Zusammenhang von Anti-dsDNS-Antikörpertitern bei SLE-Patienten und dem Auftreten eines renalen Rezidives. Eine 50%ige Senkung der Anti-dsDNS-Antikörperspiegel bei Patienten mit SLE ging sowohl mit einem 52 bis 53%igen reduzierten Risiko für das Auftreten eines renalen Rezidives einher, als auch mit einem Anstieg des Komplementfaktors C3 (Linnik et al, 2005). Eine weitere erst kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt ebenfalls die Annahme, dass eine alleinige Antikörpertitersenkung in SLE-Patienten eine sinnvolle Therapieoption darstellt, da auch hier die Inzidenz für Nierenbeteiligung signifikant rückläufig war (Cardiel M.H. et al, 2005). Weitere Daten zeigen eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität (emotionale, soziale und körperliche Faktoren einbezogen) bei SLE-Patienten, die über einen Zeitraum von 76 Wochen mit 100 mg bzw. 50 mg LJP394 behandelt wurden gegenüber der Kontrollgruppe, die Placebo erhielt (Strand et al, 2003). Auch hier wurde bei dem mit LJP394 behandelten Patientenkollektiv ein selteneres Auftreten von Nierenbeteiligung festgestellt.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass mit dem neuen Wirkprinzip der Heteropolymer Technologie im Menschen effektiv Anti-dsDNS-Antikörper gesenkt werden können und das Medikament sicher eingesetzt werden kann. Auf der Basis unserer Daten scheint die Weiterentwicklung von ETI104 zu einem Medikament zur Behandlung des SLE möglich und sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Der Systemische Lupus Erythematoses ist eine Autoimmunerkrankung unklarer Ätiologie, die durch das Auftreten verschiedener Autoantikörper charakterisiert ist. Eine besondere Rolle bei der Pathogenese spielen hochaffine Anti-dsDNS-Antikörper, möglicherweise durch die Entstehung und Ablagerung von Immunkomplexen.

ETI104 ist ein kovalent gebundenes Heteropolymer bestehend aus einem monoklonalem Antikörper, der spezifisch an CR1 auf Erythrozyten bindet und einem DNS-Anteil, der die im Blut zirkulierenden Anti-dsDNS-Antikörper bindet.

In vorausgegangenen Tiermodellen wurde die Verträglichkeit von ETI104 gezeigt und infundierte Anti-dsDNS-Antikörper gesenkt.

Ziele

Ziel dieser Studie war es, die Verträglichkeit von ETI104 am Menschen zu untersuchen. Parallel sollte das Wirkprinzip der Heteropolymer Technologie im Menschen etabliert werden.

Methoden

Eine einmalige Dosis von 1 mg bzw. 5 mg ETI104 wurde zunächst sechs Probanden und dann sechs Patienten mit SLE (alle 5 mg) verabreicht.

Sowohl gebundenes ETI104 auf den Erythrozyten als auch freies ETI104 im Plasma wurden durch FACS[®]-Analysen nachgewiesen. Die Bindung der Anti-dsDNS-Antikörper an die Erythrozyten wurde mit spezifischem IgG- und IgM-Antikörpern erfaßt. Die hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper im Serum wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Ergebnisse

Weder Probanden noch Patienten zeigten schwerwiegende Medikamentenunverträglichkeit. Es fanden sich keine negativen Auswirkungen auf laborchemische Parameter, ETI104 verursachte keine signifikante Hämolyse, die Bestimmungen der Vitalparameter erbrachten keinerlei Sicherheitsbedenken. Insgesamt traten zehn nicht bedenkliche Nebenwirkungen auf, von denen sechs möglicherweise in Zusammenhang mit der Medikamentenapplikation standen.

Bei einigen Patienten war ein vorübergehender Abfall der Komplementfaktoren C3 und C4 zu verzeichnen, was sich klinisch nicht auswirkte. Über den gesamten Studienzeitraum zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des SLAM-Scores.

Bei allen Patienten konnte eine schnelle und effektive Bindung von ETI104 zum ersten Messzeitpunkt 15 min nach Applikation nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde eine schnelle Bindung von Anti-dsDNS-Antikörpern der Patienten an den Erythrozyten festgestellt. Eine Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörpertiter im Plasma wurde mit einem maximalen Abfall nach 15 min bei fünf Patienten und nach 4 std bei einem Patienten erreicht; die mittlere Antikörperreduktion nach 15 min lag bei 55% (43%-62%). Nach 24 std war bei allen Patienten ein Antikörperwiederanstieg zu verzeichnen. Am Tag 28 nach Medikamentengabe war bei drei Patienten eine signifikante Reduktion festzustellen.

Schlußfolgerung

In dieser Studie wurde erstmalig das neue Wirkprinzip der Heteropolymer- Technologie (HP) unter Beweis gestellt: ETI104 konnte ohne Sicherheitsbedenken eingesetzt werden (1), des weiteren konnte eine schnelle und effektive Bindung von ETI104 an den Erythrozyten gezeigt werden (2) und das Medikament reduziert nach Einmalgabe signifikant Anti-dsDNS-Antikörper bei SLE-Patienten. Dieser Abfall war allerdings nur transient.

Diese Studie stellt die Grundlage für die Weiterentwicklung der AHP-Technologie dar. Aktuell gibt es vielfältige *in vitro* Studien, die AHP z.B. bei viralen (z.B. Dengue Virus; Marburg Virus; Hahn, C. 2001; Nardin, A. 1998) und bakteriellen Infektionen (u. a. Anthrax; ETI205) untersuchen. Die Kopplung von AHP mit spezifischen Antikörpern z.B. gegen bakterielle Toxine, virale Antigene und Autoimmunantigene, könnte die schnellere Elimination dieser Pathogene oder spezifischer Toxine aus dem Blutkreislauf ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

Alarcón-Segovia, D.; Tumlin, J.A.; Furie, R.A., McKay, J.D.; Cardiel, M.H., Strand, V.; Bagin, R.G.; Linnik, MD; Hepburn, B.; *LJP394 for the prevention of renal flare in patients with systemic lupus erythematosus: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study*; Arthritis Rheum 2003; 48: 442-454

Alba, P.; Bento, L.; Cuadrado, M.J.; Karim, Y.; Tungekar, M.F.; Abbs, I.; Khamashta, M.A.; D`Cruz, D.; Hughes, G.R.; *Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis*; Ann Rheum Dis. 2003 Jun; 62 (6):556-60

Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R., Rosenblatt, J., Young, F., Looney, R.J.; *B Lymphocyte Depletion in the Treatment of Systemic Lupus (SLE): Phase I/II Trial of Rituximab (Rituxan) in SLE*; ACR; 2002; 717

Arnal, C.; Piette, J.C., Leone, J., Taillan, B., Hachulla, E., Roudot-Thorav Papo, T., Schaeffer, A., Bierling, P., Godeau, B.; *Treatment of severe immune thrombocytopenia associated systemic lupus erythematosus: 59 cases*; J. Rheumatol. 2002 Jan; 29 (1): 75-83

Austin III, H.A., Klippel, J.H., Ballou, J.E., le Riche, N.G., Steinberg, A.D., Plotz, P.H., Decker, J.L.; *Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs*; New Engl. J. Med. 314; 1986; 614-619

Bertoni, M., Brugnolo, F., Bertoni, E., Salvadori, M., Romagnani, S., Emmi, L.; *Long term efficacy of high-dose intravenous methylprednisolone pulses in active lupus nephritis. A 21-month prospective study*; Scand. J. Rheumatol. 23; 1994; 82-86

Beuthien W., Mellinghoff H.U., von Kempis, J.; *Skin reactions to adalimumab*; Arthritis Rheum. 2005 Apr; 52(4):1333-4; author reply 1334

Boumpas, D.T.; Fessler, B.J., Austin III, H.A., Balow, J. E., Klippel, M. D., Lockshin, M.D.; *Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrom, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and patogenesis*; Ann. intern. Med. 123; 1995; 42-53

Braun, N., Fritsche, A., Lottspeich, F., Dinicuolo, A., Guagnin, M., Erley, C., Risler, T.; *Immunadsorption über Protein A bei lebensbedrohlichem systemischem Lupus erythematoses*; Nieren- und Hochdruckkr. 23; 1994; 445; Abstract

Bystryn, J.C., Graf, M.W., Uhr, J.W.; *Regulation of antibody formation by serum antibody*; 1970

Cardiel, M.H.; *Abetismus sodium: a new therapy for delaying the time to, and reducing the incidence of, renal flare and/or major systemic lupus erythematosus flares in patients with systemic lupus erythematosus who have a history of renal disease*; Expert Opin Investig Drugs. 2005 Jan; 14(1):77-88

Cardiel, M.H., Tumlin, J.A., Furie, R.A., Wallace, D.J., Hura, C., Strand, V. et al; *Clinical efficacy results from a RCT of LJP394 in SLE patients with history or renal disease*; Arthritis Rheum. 48; 2003; p582

Carreno, L., Lopez-Longo, F.J., Gonzalez, C.M., Monteagudo, I.; *Treatment options for juvenile-onset systemic lupus erythematosus*; Paediatr. Drugs 2002; 4 (4): 241-56

Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M., Schlissel, M.; *Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity; Implilcations for coagolation events and antigenetic spread in systemic lupus erythematosus*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1996; 1624-1629

Charlton, B.; Schindhelm, K.; Smeby, L. C.; Farrell, P. C.; *Analysis of immunoglobulin G kinetics in the non-steady state*; J. Lab. Clin. Med.; 1985; Mar; 105 (3): 312-320

Cohen, P.L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T.D., Jenette, J.C., Roubey, R.A., Earp, H.S., Matsushima, G., Reap, E.A.; *Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase*; J. Exp. Med. 196; 2002; 135-140

Cohen, S.; Hurd, E.; Cush, J.; Schiff, M.; Weinblatt, M.E.; Moreland, L.W.; Kremer, J.; Bear, M.B.; Rich, W.J.; McCabe, D.; *Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*; Arthritis Rheum. 2002 Mar; 46(3): 614-24

Contreras, G., Pardo, V., Leclercq, B., Lenz, O., Tozman, E., O`Nan, P.; *Sequential therapies for proliferative lupus nephritis*; N. Engl. J. Med. 350 (10), 2004, 1044-1046

Craig, M.L., Reinagel, M.L., Martin, E.N., Schlimgen, R., Nardin, A., Taylor, R.P.; *Infusion of bispecific monoclonal antibody complexes into monkeys provides immunologic protection against later challenge with a model pathogen*; Clin. Immunol. 92; 1999; 170-180

Dau, P.C.; *Immunologic rebound*; J. Clin. Apheresis; 1995; 10 (4):210-217

Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachmann, B., Roy-Burmann P., Walker, A., Mack, T.M.; *a revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*; Arthritis Rheum. 35; 1992; 311-318

Denomme, G.A.; Mahmoudi, M.; Cairns, E.; Bell, D. A.; *Immunoglobulin V region sequences of two human antiplatelet monoclonal autoantibodies derived from B cells of normal origin*; J. Autoimmun. 7 (1994) 521-535

Derksen, R.H.W.M., Schuurmann, H.J., Gmelig Meyling, F.H.J., Struyvenberg, K.; *Rebound and overshoot after plasma exchange in humans*; J. Lab. Clin. Med.; 1984; 104 (1), 35-43

Forger, F.; Matthias, T.; Oppermann, M.; Becker, H.; Helmke, K.; *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis*; *Lupus*. 2004; 13 (1):36-44

Gaubitz, M.; Schneider, K.M.; *Immunoabsorption in Systemic Lupus Erythematosus: different techniques and their current role in medical therapy*; *Therapeutic Apheresis and Dialysis*; 2003; 7 (2): 183-188

Gladman, D. D., Urowitz, M. B.; *Systemic lupus erythematosus. Clinical Features*. 1994, Mosby, St. Louis

Goldblatt, F.; Isenberg, D.A.; *New therapies for systemic lupus erythematosus*; *Clinical and Experimental Imm.*; 2005; 140:205-212

Gordon, C. N., Maatthews, B.C., Schlesinger, A.N., Akbar, P.A., Bacon, P., Emery, M., Salmon, M.; *Active systemic lupus erythematosus is associated with the recruitment of naive/resting T cells*; *Brit. J. Rheumatol.* 35; 1996; 226-230

Gorla, R., Airo, P., Franceschini, F., Stefani, E., Braga, S., Tincani, A., Cattaneo, R. ; *Decreased number of peripheral blood CD4+ CD29+ lymphocytes and increased in vitro spontaneous production of anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus*; *J. Rheumatol.* 17; 1990; 1048-1053

Grootscholten, C.; van Bruggen, M.C.J.; van der Pijl, J.W.; de Jong, E.M.G.J.; Ligtenberg, G.; Derksen, R.H.W.M.; Berden, J.H.M.; for the Dutch Working Party on SLE; *Deposition of Nucleosomal Antigens (Histones and DNA) in the Epidermal Basement Membrane in Human Lupus Nephritis*; *Arthritis Rheum.* 48; 2003; 1355-1362

Hahn, C.; French, O.; Foley, P.; Martin, E.; Taylor, R.P.; *Bispecific monoclonal antibodies mediate Binding of Dengue Virus to erythrocytes in a monkey model of passive viremia*; *The Journal of Immunology* (2001), Vol. 166, pp. 1057-1065

Harriman, W., Völk, H., Defranoux, N., Wabl, M.; *Immunoglobulin class switch recombination*; Annu. Rev. Immunol.; 1993; 11:361-84;

Hermann, M., Voll, R.E., Zoller, O.M., Hagenhofer, M., Ponner, B.B., Kalden, J.R.; *Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus*; Arthritis Rheum. 41; 1998; 1241-1250

Herndon, T.M., Juang, Y.T., Solomou, E.E., Rothwell, S.W., Gourley, M.F., Tsokos, G.C.; *Direct transfer of p65 into T lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients leads to increased levels of interleukin 2 promoter activity*; Clin. Immunol. 103; 2002; 145-153

Hiepe, F., Burmester, G.R.; *Klinik und Diagnostik des systemischen Lupus erythematosus*; Dtsch. Med. Wschr. 121; 1996; 1095-1100

Hochberg, M.C., Boyd, R.E., Ahearn, J.M., Arnett, F.C., Bias, W.B., Provost, T.T., Stevens, M.B.; *Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets*; Medicine 64; 1985; 285-295

Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*; Arthritis Rheum. 40; 1997; 1725

Hochberg, M.C., *Systemic Lupus Erythematosus*; Rheum. Dis. Clin. N. Amer., 1990, 16, 617-639

Horwitz, D.A., Gray, J.D., Zheng, S.; *The potential of human regulatory T cells generated ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases*; Arthritis Res. 4; 2002; 241-246

Janeway, C.A., Travers, P.; *Immunologie 2. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 1997

Jones, J. V.; *Plasmapheresis in SLE*; Clin. rheum. Dis. 8; 1982; 243-260

Jouvin, M.H. Wilson, J.G., Bourgeois, P., Fearon, D.T. and Kazatchkine, M.D.; *Decreased expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus contrasts with its normal expression in other systemic diseases and does not correlate with the occurrence of severity of sle nephritis. Complemen*; 1986; 3: 88-96.

Kashgarian, M.; *Lupus nephritis: lessons from the path. lab.*; Kidney int. 45; 1994; 928-938

Kelsoe, G.; Zheng, B.; *Sites of B-cell activation in vivo*; Current Opinion in Immunology; 1993; 5:418-422

Kimball, J.A., Norman, D.J., Shield, C.F., Schroeder, T.J., Lisi, P., Garovoy, M., O'Conne, J.B., Stuart, F., McDiarmid, S.V., Wall, W.; *The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in so organ transplantation*; Transpl. Immunol.; 1995; 3:212-221

Koide, M., Shirahama, S., Tokura, Y., Takigawa, M., Hayakawa, M., Furukawa, F.; *Lupus erythematosus associated with C1 inhibitor deficiency*; J. Dermatol. 29; 2002; 503-507

Lahita, R.G.; *Systemic Lupus Erythematosus, third edition*; Academic Press, San Diego, London, 1999

Lange, S., Bender, R.; *Allgemeine Aspekte des Signifikanztests*; Dtsch. Med. Wschr.; 2001; 126:T42-T44

Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Lan, S. P., Rohde, R. D., Lachin, J. N. for the Lupus Nephritis Collaborative Study Group: *A controlled trial of the plasmapheresis therapy in severe lupus nephritis*; New Engl. J. Med. 326; 1992; 1374-1379

Linnik, M., Hu, J.Z.; Heilbrunn, K.R.; Strand, V.; Hurley, F.L.; Joh, T.; *Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus*; *Arthritis Rheum.*; 2005; Apr 7; 52(4): 1129-1137

Manger, B., Burmester, G.-R., Dannecker, G., Ganser, G., Iking-Konert, C., Krüger, K., Manger, K.E., Märker-Hermann, E., Nüßlein, H., Petersen, K.-U., Schneider, M., Sieper, J.; *Ciclosporin in der Rheumatologie*; Thieme, Stuttgart, 2004

Manger, K., Repp, R., Spriewald, B.M., Rascu, A., Geiger, A., Wassmuth, R., Westerdaal, N.A., Wentz, B., Manger, B., Kalden, J.R., van de Winkel, J.G.; *Fc-gamma receptor IIa polymorphism in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus; association with clinical symptoms*; *Arthritis Rheum.* 41; 1998; 1181-1190

McCarty, D.J., Manzi, S., Medsger, T.A.J., Ramsey-Goldman, R., LaPorte, R.E., Kwoh, C.K.; *incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences*; *Arthritis Rheum.* 38; 1995; 1260-1270

McNeeley, P.A.; Iverson, G.M.; Furie, R.A.; Cash, J.M.; Cronin, M.E.; Katz, R.S.; Weisman, M.H.; Aranow, C.; Linnik MD; *Pre-treatment affinity for LJP394 influences pharmacodynamic response in lupus patients*; *Lupus* 2001; 10: 526-532

Miehle, W., Fehr, K., Schattenkirchner M., Tillmann, K., *Rheumatologie in Praxis und Klinik.* 2000, Georg Thieme Verlag

Mills, J.A.; *Systemic lupus erythematosus*; *New Engl. J. Med.* 330; 1994; 1871-1879

Nardin, A., Schlimgen, R., Holers, V.M., Taylor, R.P.; *A prototyp pathogen bound ex vivo to human erythrocyte complement receptor 1 via bispecific monoclonal antibody complexes is cleared to the liver in a mouse model*; *Eur. J. Immunol.* 29; 1999; 1581-1586

Nardin, A.; Sutherland, W. M.; Hevey, M.; Schmaljohn, A.; Taylor, R. P.; *Quantitative studies of heteropolymer-mediated binding of inactivated Marburg Virus to the complement receptor on primate erythrocytes*; Journal of Immunological Methods (1998), Vol. 211, pp.21-31

Nevzorova, T.A., Temnikov, D.A., Vinter, V.G.; Special features of the DNA-hydrolysing activity of the antibodies in systemic lupus erythematosus; Biochemistry (Mosc.) 2003 Dec; 68(12): 1300-6

Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., Dorner, T.; *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*; J. Immunol. 165; 2000; 5970-5979

Olhoffer, I.H., Peng, S.J.; Craft, J.; *Revisiting autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus*; J. Rheum. 24; 1997; 297-302

Paul, E., Pozdnyakova, O.O., Mitchell, E., Carroll, M.C.; *Anti-DNA-autoreactivity in C4-deficient mice*; Eur. J. Immunol. 32; 2002; 2672-2679

Pisoni, C.N.; Karim, Y.; Cuadrado, M.J.; *Mycophenolat mofetil and systemic lupus erythematosus: an overview*; Lupus; 2005; 14 Suppl 1: 9-11

Putterman, C.; *New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus*; Autoimmun Rev., 3 (2), 2004, 7-11

Rekvig, O.P., Kalaaji, M., Nossent, H., *Anti-DNA antibody subpopulations and lupus nephritis*; Autoimmun Rev., 3 (2), 2004, 1-6

Ruiz-Irastorza, G.; Khamashta, M.A.; Castellino, G.; Hughes, G.R.; *Systemic lupus erythematosus*; Lancet; 2001; Mar 31; 357(9261):1027-32

Schifferli, J.A., Ng, Y.C., Paccaud, J.P., Walport, M.J.; *The role of hypocomplementemia and low erythrocyte complement receptor type 1 numbers in determining abnormal immune complex clearance in humans*; Clin. exp. Immunol. 75; 1989; 329-335

Schneider, M., Gaubitz, M., Perniok A.; *Immunoabsorption in systemic connective tissue diseases and primary vasculitis*; Ther. Apher. 1; 1997; 117-120

Sobel, E.S., Morel, L., Baert, R., Mohan, C., Schiffenbauer, J., Wakeland, E.K.; *Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: Evidence for functional expression of Sle3/5 non-T cells*; J. Immunol. 169; 2002; 4025-4032

Spertini, F., Leimgrube, A., Morel, B., Khazaeli, M.B., Yamamoto, K., Dayer, J.M., Weisbart, R.H. and Lee, M.L.; *Idiotypic vaccination with a murine anti-dsDNA antibody: phase I study in patients with nonactive systemic lupus erythematosus*; 1999; J. Rheum. 26, 2602-2608.

Strand, V.; Aranow, C.; Cardiel, M.H.; Alarcon-Segovia, D.; Furie, R.; Sherrer, Y.; Tumlin, J.; Wallace, D.J.; Crawford, B.; LJP394 Investigator Consortium; *Improvement in health-related quality of life in systemic lupus erythematosus patients enrolled in a randomized clinical trial comparing LJP394 treatment with placebo*; Lupus. 2003; 12(9):677-86

Sturfelt, G.; *The complement system in systemic lupus erythematosus*; Scand. J. Rheumatol. 31; 2002; 129-132

Tahir, H.; Isenberg, D.A.; *Novel therapies in lupus nephritis*; Lupus; 2005; 14(1): 77-82

Tam, L.S.; Li, E.K.; Wong, C.K.; Lam, C.W.; Szeto, C.C.; *Double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of luflunomide in systemic lupus erythematosus*; Lupus.; 2004; 13(8):601-4

Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., Winchester, R.J.; *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*; Arthritis Rheum. 25; 1982; 1271-1277

Taylor R; *Two week single dose toxicity study in non-human primates with AHP mMAb dsDNA*, May 2001, TherImmune Research Corporation.

Taylor RP, Sutherland WM, Reist CJ, Webb DJ, Right EL, Labuguen RH; *Use of heteropolymetric monoclonal antibodies to attach antigens to the C3B receptor of human erythrocytes: A potential therapeutic treatment*. Proc Natl Acad Sci, USA, 1991; 88: 3305-3309

The Canadian Hydroxychloroquine Study Group: *A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus*; New Engl. J. Med. 324; 1991; 150-154

van Es, J.H., Gmelig Meyling, F.H., van de Akker, W.R., Aanstoot, H., Derksen, R.H., Logtenberg, T.; *Somatic mutations in the variable regions of a human IgG anti-double-stranded DNA autoantibody suggest a role for antigen in the induction of systemic lupus erythematosus*; J. exp. Med. 173; 1991; 461-470

von Muhlen, C. A., Tan, E. M.; *Autoantibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus*; Semin; Arthr. Rheum. 24; 1995; 323-358

Wallace, D.J., Goldfinger, D., Pepkowitz, S.H., Fichman, M., Metzger, A.L., Schroeder, J.O., Euler, H.H.; *Randomized controlled trial of pulse/synchronization cyclophosphamide/apheresis for proliferative lupus nephritis*; Journal of Clinical Apheresis 13, 1998, 163-166

Wie, N., Klippel, J. H., Huston, D. P., Hall, R. P., Lawley, T.J., Ballow, J. E., Steinberg, A. D., Decker, J. L.; *Randomised trial of plasma exchange in mild systemic lupus erythematosus*; Lancet 1; 1983; 17-22

Wong, J.M.; Esdaile, J.M.; *Methotrexate in systemic lupus erythematosus*; *Lupus*; 2005;14(2):101-5

Yen, J.-H., Liu, H.-W., Lin, S.-F., Chen, J.-R., and Chen, T.P. *Erythrocyte complement receptor type 1 in patients with systemic lupus erythematosus*; *J Rheum* 1989; 16: 1320-1325.

Zeidler, H., Zacher, J., Hiepe, F.; *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie*. 2001, Springer - Verlag

Zhang, W., Frank, M.B., Reichlin M.; *Production and characterization of human monoclonal antiidiotype antibodies to anti-dsDNA-antibodies*; *Lupus* 11 (6); 2002; 362-369

8 Anhang

8.1 Tabelle 4: Abkürzungen

ACR	American College of Rheumatology
AE	Adverse Event = Nebenwirkung
AHP	Antigenes Heteropolymer
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-dsDNS-AK	Anti-dsDNS-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
B-Zellen	B-Lymphozyten
C3/C4	Komplementfaktor 3/4
cGMP	Current good manufacturing practices
CR1	Komplementrezeptor 1
DNS-AK	Desoxyribonukleinsäure-Antikörper
DsDNS	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
GAM	Alexa 488 goat anti mouse IgG
GT	Gamma-Glutamat-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
HAMA	Humane Anti-Maus-Antikörper
Hb	Hämoglobin
HP	Heteropolymer
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
LE	Lupus erythematodes
NaCl	Natriumchlorid = Kochsalzlösung

NHV	Normal healthy volunteer = Proband
PTC	Points to consider
RES	Retikulo-Endotheliales-System
RIA	Radioimmunoassay
PBS	Phosphate buffered saline
SAE	Serious adverse event
SD	Standardabweichung
SLAM	Systemic Lupus activity measurement
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zellen	T- Lymphozyten

8.2 Tabelle 5: Materialliste

Material	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
ETI104	1mg/ml	EluSys/New Jersey/USA	
Picogreen	1:200	Molecular probes; Leiden, Niederlande	P-7581
Alexa fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L)	1:200	Molecular probes: Leiden, Niederlande	A11029
Alexa fluor 488 goat anti human IgG (H+L)	1:200	Molecular probes Leiden, Niederlande	A11013
Alexa fluor 488 goat anti human IgM	1:200	Molecular probes Leiden, Niederlande	A21215
Alexa 7G9	1:179	EluSys therapeutics	
PBS–Dulbecco W/o Ca, Mg (phosphate buffered saline)		Biochrome KG; Berlin, Germany	L1825
BSA (Bovine serum albumin)		SIGMA Steinheim, Germany	A7906
Natrium acid		SIGMA Steinheim, Germany	S8032
Cytofix buffer		BD PharMingen® Heidelberg, Germany	554655
Alserver`s solution		SIGMA Taufkirchen, Germany	A3551
Polystyrene Round- bottom Tube 5ml		Falcon Heidelberg, Germany	2052

8.4 Tabelle 7: SLAM-SCORE

Name:

Datum:

(Felder ankreuzen, Punkte zusammenzählen, (grau unterlegte Felder nicht nutzen!, in diesem Fall z.B. nur 1 oder 3 möglich)

ARA	Allgemeinsymptome	0 (nein / normal)	1 (mild)	2 (mäßig)	3 (schwer)	
	Gewichtsverlust	nein	< 10 %		> 10 %	
	Müdigkeit	nein	ohne Aktivitätsverlust		funktionelle Limitierung	
	Fieber	nein	37.5 - 38.5 C		> 38.5 C	
	Haut					
	- Schleimhautulzera - Schmetterlingserythem - auf Lichtprovokation ausgelöste HV - periunguales Erythem	nein	ja			
	- Alopezie	nein	beim Kämmen	spontan		
	- erythematöse oder makulopapulöse HV - diskoider LE	nein	< 20 %	20-50 %	> 50 %	
	Vaskulitis (leukozytoklastische V., Urtikaria, Purpura, Livedo reticularis, Ulzera)	nein	< 20 %	20-50 %	> 50 %	
	Augen					
	„cytoid bodies“	nein	ja			
	Hämorrhagien	nein	ja			
	Episkleritis	nein	ja			
	Retikuloendotheliales S.					
	Lymphadenopathie	nein	klein	> 1 cm x 1,5 cm		
	Hepato/Splenomegalie	nein	bei Insp. tastbar	bei Exp. tastbar		
	<i>Pulmonal</i>					
	Pleuraerguß/ Pleurareiben	nein	Kurzatmigkeit oder Schmerzen bei Befragen kein Reiben	Kurzatmigkeit / Schmerzen bei Belastung ausk. Reiben	Kurzatmigkeit / Schmerzen in Ruhe ausk. feuchte RGs	
	Pneumonitis	nein	nur radiolog. Infiltrate	Kurzatmigkeit bei Belastung	Kurzatmigkeit in Ruhe	
	Kardiovaskulär					
	Raynaud-Phänomen	nein	ja			
	arterielle Hypertonie	nein	diastol. 90 - 105 mmHg	diastol. 105 - 115 mmHg	diastol. > 115 mmHg	
	Karditis	nein	EKG-Veränd./ Reiben / Erguß	Thoraxschmerzen oder Arrhythmien	Myocarditis mit hämod. Relevanz	
	Gastrointestinal					

Bauchschmerzen (Serositis, Pancreatitis, Darmischämie)	nein	Angabe von Schmerzen	„limitierende“ Schmerzen	Peritonitiszeichen oder Aszites	
--	------	----------------------	--------------------------	---------------------------------	--

	0	1	2	3	
Neurologisch					
Insult (incl. Mononeuritis multiplex, TIA, Rind)		eine einzelne TIA	multiple TIA /Rind/ Mononeuritis	Insult / Myelitis	
Epilepsie		1-2/Monat	> 2/Monat	Status epilepticus	
„Cortex-Dysfunktion“		Depression, Konzentrationsstörungen	schwere Depression, eingeschränkte kognitive Funktion	Psychose Demenz Koma	
Kopfschmerzen (incl. Migraine)		Symptome	Schränken Belastbarkeit ein	aseptische Meningitis	
Myalgien		subj. Beklagen	limitieren in Aktivität		
Gelenke					
Arthralgien / Arthritiden		Arthralgien	Synovialitis	limitierte Funktion	
andere SLE-Manifestationen					
Punkte gesamt:					

Labor

ARA	0	1	2	3	
HK	> 35	30 - 35	25 - 29,9	< 25	
Leukozyten	> 3.500	3.500 - 2.000	2.000 - 1.000	< 1.000	
Lymphozyten	1.500 - 4.000	1499 - 1000	999 - 500	< 499	
Thrombozyten	> 150.000	100 – 150.000	99 – 50.000	< 50.000	
BSG	< 25	25 - 50	51 - 75	> 75	
Kreatinin	0.5 - 1.3 mg/dl	1.4 - 2 mg/dl	2.1 - 4 mg/dl	> 4 mg/dl	
Urin-Sediment		< 5 Erys +	> 10 Erys ++	> 25 Erys +++	
Proteinurie		1 - 2 g/l	3 - 4 g/l	> 3.5 g/l	
Gesamt-Punktzahl					

8.7 Tabelle 10: Zusammenfassung der HAMA-Werte der Probanden und SLE-Patienten. Die als *positiv definierten Werte sind markiert. Die Probanden 01 und 05 sind nicht aufgeführt, da sie Placebo erhielten.

Dosis	Proband/Patient	Tag 0	Tag 14	Tag 28
1 mg	Proband 2	23	53	53
	Proband 3	24	28	31
	Proband 4	44	82	59
5 mg	Proband 6	24	104	112
	Proband 7	21	35	59
	Proband 8	20	28	52
	Proband 101	9	12	11
	Proband 103	11	12	52
	Proband 104	14	20	36
	SLE 1	14	26	80
	SLE 2	18	24	24
	SLE 3	11	104	77
	SLE 4	15	66	179 (40#)
	SLE 5	16	27	28
	SLE 6	16	180	200 (32#)

Probandendurchschnitt 21.1 ng/ml, SD +/- 10.3 ng/ml

SLE-Patientendurchschnitt 15.0 ng/ml, SD +/- 2.4 ng/ml

***Positive** HAMA-Werte sind definiert als Durchschnitt + 3 SD; für die Probanden = 52ng/ml und für die SLE-Patienten = 22ng/ml

8.8 Patienteneinverständniserklärung

(Zur Aufbewahrung mit der Krankenakte)

DOKUMENTATIONSBLATT über die Einverständniserklärung des Patienten

Name:			
Geburtsdatum:			
Anschrift:			
Pat.- Nummer:		Pat.- Initialen:	

Titel der Studie

Verringerung von Antikörpern gegen doppelsträngige DNA bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses durch eine einzelne, intravenöse Gabe eines neuen, auf einem monoklonalen Antikörper basierenden Medikaments

Ich bin durch meinen Arzt, über Wesen, Bedeutung und Tragweite der oben genannten klinischen Studie aufgeklärt worden. Der Ablauf der Prüfung und der Zweck der Untersuchung wurde mir erläutert. Über die theoretisch denkbaren unerwünschten Arzneimittelwirkungen bin ich aufgeklärt worden. Ich habe die vorliegende Information zur Studie gelesen und verstanden, und alle Fragen wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Mir wurde mitgeteilt, dass für diese Studie eine Versicherung mit den üblichen Versicherungsbedingungen abgeschlossen wurde. Eine Kopie des Versicherungsscheins und der Versicherungsbedingungen wurden mir ausgehändigt.

Ich erkläre hiermit, dass ich zur Teilnahme an dieser klinischen Studie, einschließlich der dafür notwendigen ärztlichen Untersuchungen bereit bin. Ferner erkläre ich meine Bereitschaft, mich an die ärztlichen Anordnungen für die Zeit vor, während und nach der Studie zu halten.

Hiermit gebe ich mein Einverständnis, dass meine im Rahmen der klinischen Studie erhobenen Daten anonymisiert, d.h. ohne Nennung meines Namens, aufgezeichnet und an den Auftraggeber bzw. das von ihm autorisierte Institut weitergeleitet werden. Dies dient einer späteren statistischen Auswertung.

Ich erkläre, dass ich mit der Weitergabe der im Rahmen der klinischen Prüfung aufgezeichneten anonymisierten Patientendaten zur Überprüfung an den Auftraggeber, an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde (das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)) einverstanden bin.

Ich wurde darüber informiert, dass meine personenbezogene Daten stets absolut vertraulich behandelt und nicht an die Öffentlichkeit gelangen werden.

Ich wurde darauf hingewiesen, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne nachteilige Folgen für meine weitere medizinische Versorgung.

Eine Kopie der Patienten-Information/Patienteneinverständniserklärung habe ich erhalten.

Unterschrift des Patienten

Datum

Unterschrift und Stempel des
aufklärenden Arztes

Datum

Für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Dr. med. Christof Iking-Konert

Ellen Bleck

Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Zusammenfassung

Der Systemische Lupus Erythematoses ist eine Autoimmunerkrankung unklarer Ätiologie, die durch das Auftreten verschiedener Autoantikörper charakterisiert ist. Eine besondere Rolle bei der Pathogenese spielen hochaffine Anti-dsDNS-Antikörper, möglicherweise durch die Entstehung und Ablagerung von Immunkomplexen.

ETI104 ist ein kovalent gebundenes Heteropolymer bestehend aus einem monoklonalem Antikörper, der spezifisch an CR1 auf Erythrozyten bindet und einem DNS-Anteil, der die im Blut zirkulierenden Anti-dsDNS-Antikörper bindet.

In vorausgegangenen Tiermodellen wurde die Verträglichkeit von ETI104 gezeigt und infundierte Anti-dsDNS-Antikörper gesenkt.

Ziele

Ziel dieser Studie war es, die Verträglichkeit von ETI104 am Menschen zu untersuchen. Parallel sollte das Wirkprinzip der Heteropolymer Technologie im Menschen etabliert werden.

Methoden

Eine einmalige Dosis von 1 mg bzw. 5 mg ETI104 wurde zunächst sechs Probanden und dann sechs Patienten mit SLE (alle 5 mg) verabreicht.

Sowohl gebundenes ETI104 auf den Erythrozyten als auch freies ETI104 im Plasma wurden durch FACS[®]-Analysen nachgewiesen. Die Bindung der Anti-dsDNS-Antikörper an die Erythrozyten wurde mit spezifischem IgG- und IgM-Antikörpern erfaßt. Die hochaffinen Anti-dsDNS-Antikörper im Serum wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Ergebnisse

Weder Probanden noch Patienten zeigten schwerwiegende Medikamentenunverträglichkeit. Es fanden sich keine negativen Auswirkungen auf laborchemische Parameter, ETI104 verursachte keine signifikante Hämolyse, die Bestimmungen der Vitalparameter erbrachten keinerlei Sicherheitsbedenken. Insgesamt traten zehn nicht bedenkliche Nebenwirkungen auf, von denen sechs möglicherweise in Zusammenhang mit der Medikamentenapplikation standen.

Bei einigen Patienten war ein vorübergehender Abfall der Komplementfaktoren C3 und C4 zu verzeichnen, was sich klinisch nicht auswirkte. Über den gesamten Studienzeitraum zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des SLAM-Scores.

Bei allen Patienten konnte eine schnelle und effektive Bindung von ETI104 zum ersten Messzeitpunkt 15 min nach Applikation nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde eine schnelle Bindung von Anti-dsDNS-Antikörpern der Patienten an den Erythrozyten festgestellt. Eine Reduktion der Anti-dsDNS-Antikörpertiter im Plasma wurde mit einem maximalen Abfall nach 15 min bei fünf Patienten und nach 4 std bei einem Patienten erreicht; die mittlere Antikörperreduktion nach 15 min lag bei 55% (range 43%-62%). Nach 24 std war bei allen Patienten ein Antikörperwiederanstieg zu verzeichnen. Am Tag 28 nach Medikamentengabe war bei drei Patienten eine signifikante Reduktion festzustellen.

Schlußfolgerung

In dieser Studie wurde erstmalig das neue Wirkprinzip der Heteropolymer- Technologie (HP) unter Beweis gestellt: ETI104 konnte ohne Sicherheitsbedenken eingesetzt werden (1), des weiteren konnte eine schnelle und effektive Bindung von ETI104 an den Erythrozyten gezeigt werden (2) und das Medikament reduziert nach Einmalgabe signifikant Anti-dsDNS-Antikörper bei SLE-Patienten. Dieser Abfall war allerdings nur transient.

Diese Studie stellt die Grundlage für die Weiterentwicklung der AHP-Technologie dar. Aktuell gibt es vielfältige *in vitro* Studien, die AHP z.B. bei viralen (z.B. Dengue Virus; Marburg Virus; Hahn, C. 2001; Nardin, A. 1998) und bakteriellen Infektionen (u. a. Anthrax; ETI205) untersuchen. Die Kopplung von AHP mit spezifischen Antikörpern z.B. gegen bakterielle Toxine, virale Antigene und Autoimmunantigene, könnte die schnellere Elimination dieser Pathogene oder spezifischer Toxine aus dem Blutkreislauf ermöglichen.