

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische  
Immunologie, Rheumatologie)

**Nachweis und Verlauf von Antikörpern gegen  
therapeutische monoklonale Antikörper (Human Anti-  
Human-Antikörper, HAHA) bei Patienten mit  
rheumatischen Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Reichert, geb. Bundina, Irina**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Holzer

Tag der Disputation: 03.08.2021

# Inhaltverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Allgemeines über Autoimmunerkrankungen.....	7
1.2 Immunologische Grundlagen von Autoimmunerkrankungen und deren Klinik.....	8
1.3 Rheumatoide Arthritis.....	8
1.4 Morbus Behcet.....	13
1.5 Granulomatose mit Polyangiitis.....	15
2 Bedeutung monoklonaler Antikörper für die Therapie rheumatischer Erkrankungen.....	18
2.1 Welche monoklonale Antikörper gibt es.....	18
2.2 Vom Maus-Antikörper bis zum humanisierten Antikörper.....	18
2.3 Wirkungsmechanismen von monoklonalen Antikörpern.....	19
2.4 Nebenwirkungen von monoklonalen Antikörpern.....	21
2.5 Bildung von HAMA/HAHA und deren Bedeutung.....	21
3 Fragestellung.....	23
4 Probanden, Material und Methoden .....	24
4.1 Probandenkollektiv.....	24
4.2 Chemikalien und Reagenzien.....	26

4.2.1 Antikörper und andere Chemikalien.....	26
4.2.2 Lösungen und Pufferansätze.....	26
4.2.3 Verbrauchsmaterialien.....	28
4.2.4 Geräte.....	29
4.3 Methoden.....	29
4.3.1 Prinzip des ELISA.....	29
4.3.2 Durchführung des ELISA.....	32
5 Ergebnisse.....	35
5.1 Reaktivität von Antikörpern gegen monoklonale Antikörper (Human-Anti-Monoclonal Antibodies, HAMA) in Seren von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen.....	35
5.2 Häufigkeit von HAMA in Seren von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen.....	42
5.3 Häufigkeit von HAMA von IgG und IgM Typ in Seren von Probanden vor und unter Therapie.....	45
5.4 Beeinflussung des Verlaufs der HAMA/HAHA vom IgG-und IgM Typ bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen durch die spezifischen Antikörpertherapien.....	49
5.5 Reaktivität der Antikörper.....	52
5.5.1 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG und IgM Typ bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen unter Antikörper-Monotherapie.....	53
5.5.2 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG und IgM Typ bei Probanden unter Kombinationstherapie mit Antikörpern zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	55

5.5.3 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ bei den Probanden unter immunsuppressiver Therapie zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	62
6 Diskussion.....	66
6.1 Vor- und Nachteile der ELISA zum Antikörpernachweis.....	66
6.2 Häufigkeit der HAMA/HAHA.....	67
6.3 Longitudinaler Verlauf der HAMA/HAHA.....	68
6.4 Bedeutung der möglichen Bildung von HAHA/HAMA im Verlauf auf die Erkrankung/Therapie.....	68
6.5 Formen von HAMA/HAHA.....	69
6.6 Kreuzreaktivität der Antikörper.....	70
7 Zusammenfassung.....	72
8 Literaturverzeichnis.....	74
9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	79
10 Danksagung.....	80

## Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
AK-Mo	Therapie mit monoklonalem Antikörper
CDC	Complement- Dependent-Cytotoxicity
CDR	Complementary Determing Region
ect.	Et cetera
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GP	Granulomatose mit Polyangiitis
HACA	Human Anti-Chimeric Antibody
HAGA	Human Anti-Globulin Antibody
HAHA	Human Anti-Human Antibody
HAMA	Human Anti-Mouse Antibody
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IS	Immunsuppressive Therapie
Mab	Monoclonal Antibody
M. Behcet	Morbus Behcet
MW	Mittelwert
PcP	Primär chronische Polyarthritits
SB	Standard Abweichung
Tab.	Tabelle
RA	Rheumatoide Arthritis

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines über Autoimmunerkrankung

Rheumatische Erkrankungen sind in der ärztlichen Praxis außerordentlich häufig und haben eine große klinische Relevanz, da sie die Lebensqualität stark beeinflussen können. Viele dieser Erkrankungen gehen mit Autoimmunreaktionen, d.h. autoreaktiven B- und T-Zellen einher, die teilweise hochspezifisch sind (z.B. Produktion von Autoantikörpern mit hoher Avidität und Affinität). Dabei könnte es zu Entzündungsreaktionen mit Schäden des körpereigenen Gewebes (an einem Organ oder den ganzen Körper ausgeprägt) kommen. Auch bei gesunden Individuen lassen sich allerdings autoreaktive Zellklone nachweisen, die jedoch nicht durch andere immunkompetente Zellen aktiviert werden und nicht sehr spezifisch reagieren [26; 47; 52]. Mehrere Faktoren zusätzlich zu einer genetischen Disposition, die für die Entstehung einer Autoimmunkrankheit von Nöten sind, wurden identifiziert. Zu ihnen gehören unter anderem Rauchen, Infektionskrankheiten und Schadstoffexposition [9; 27; 43; 2]. Hierbei scheinen oft mehrere Ereignisse (multiple steps) notwendig, bis es zum Ausbruch einer Erkrankung kommt. Es können verschiedene Reaktionsmuster der T-Zellen vorherrschen wie ein Th1- (überwiegend zelluläre Aktivierung, wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis) oder Th2-Muster (überwiegend humorale Aktivierung, wie z.B. beim systemischen Lupus erythematoses (SLE)). Zunehmend werden auch Th17-Zellen als wichtige Effektorzellen autoimmuner Prozesse diskutiert.

## 1.2 Immunologische Grundlagen von Autoimmunerkrankungen und deren Klinik

Physiologisch können autoreaktive Lymphozyten und Auto-Antikörper auftreten, jedoch wird eine Autoimmunerkrankung erst durch den Übergang zu einer pathologisch gestörten Selbsttoleranz ausgelöst [54]. Dieser Übergang vom physiologischen Auftreten autoreaktiver Zellklone zu einer pathologischen Autoimmunerkrankung wird durch Inhibitoren, T-Zell-Unempfindlichkeit,

Ignoranz oder aktiver Suppression gehemmt [64]. Eine pathologische Aktivierung autoreaktive T-Zellen kann durch mehrere Mechanismen ausgelöst werden:

- Kontrasuppressorzellen, eine spezielle T-Zell-Untergruppe, können die T-Suppressorzellen unterlaufen und somit T-Helferzellen aktivieren
- Autoantigen-beladene HLA-Proteine auf antigen-präsentierenden Zellen können autoreaktive T-Zellen aktivieren. Diese Beladung mit Autoantigenen kann beispielsweise durch eine virale Infektion getriggert werden, bei der unbeteiligte Zellen zusammen mit infizierten Zellen untergehen und deren Bestandteile in die Antigenpräsentation eingeschleust werden [55]
- Neoantigene, die durch Mutationen, chemische und posttranslationale Modifikationen sowie Konjugationen mit bakteriellen, viralen und oder körpereigenen Peptiden entstanden sind, können ebenfalls die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen herbeiführen [14]
- Eine Kreuzreaktion von bakteriellen oder anderen körperfremden Epitopen mit Auto-Epitopen, wird als molekulare Mimikry bezeichnet. Durch die molekulare Mimikry können T-Zellen aktiviert werden, die nicht nur fremd, sondern auch autoreaktiv sind [4; 44]
- Darüber hinaus ist eine virale Aktivierung von B-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen unter Umgehung der T-Helferzellen Aktivierung möglich.

### **1.3 Rheumatoide Arthritis (RA)**

Definition:

Die RA ist eine chronische entzündliche Systemerkrankung, die durch Synovialitis zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt.

Epidemiologie:

In den westlichen Industrieländern besteht eine hohe Prävalenz mit bis zu 1% der Bevölkerung und einer bevorzugten Geschlechtsverteilung zugunsten von Frauen (3:1). Die RA ist weltweit verbreitet, in allen Rassen und sozialen Schichten. Der Krankheitsgipfel liegt zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr und kann auch im Alter auftreten [42].

Ätiologie und Pathogenese:

Pathophysiologisch liegen ihr immunologisch aktive Prozesse in der Synovialmembran zugrunde, wie z.B. Autoimmunreaktionen gegen Immunglobulin G, aber auch gegen Kollagen und andere Autoantigene. Immungenetisch wurde eine Assoziation der RA mit Allelen der HLA-DR Subregion von Chromosom 6 festgestellt. Auch Infektionen werden für die Ätiologie der RA verantwortlich gemacht, wie z.B. mit Streptokokken, diphtheroiden Bazillen, Clostridien, diversen Mykoplasmen-Typen oder verschiedenen Viren [50].

Klinik:

Der Verlauf der RA ist häufig schubförmig. Man unterscheidet zwei Stadien:

**Prodromalstadium:** Allgemeines Krankheitsgefühl, Antriebslosigkeit, rasche Ermüdbarkeit, vermehrtes Schwitzen, Gewichtsabnahme, Nervosität, Reizbarkeit, selten subfebrile Temperaturen, transitorische Arthralgien etc.

Das **Frühstadium** wird durch Morgensteifigkeit und Synovitis charakterisiert. Die Morgensteifigkeit betrifft vor allem Hand- und Fingergelenke und kann über eine Stunde anhalten; oft tritt bereits frühzeitig eine deutliche Abnahme der Kraft in den Händen auf.

Bei der RA sind sowohl obere (Fingergelenke, Metacarpophalangealgelenke, proximale und distale Interphalangealgelenke, Tenosynovitiden der Extensorsehnen) als auch untere Extremitäten (Zehengrund- und Sprunggelenke, Kniegelenke) befallen. Außerdem kommen das Zervikal

Syndrom, eine Schädigung zentral motorischer und sensibler Bahnen, Rheumaknoten, die Pleuritis mit Erguss. Durch eine fibrosierende Arteriolitis oder eine monolymphozytäre Alveolitis kann eine diffuse interstitielle Lungenfibrose auftreten. Die Vaskulitis ist eine wichtige systemische Komplikation. Auch andere Organe (Herz, Muskulatur, Auge, Niere) können betroffen werden [50; 58].

Diagnose und Differentialdiagnosen:

Die Diagnose einer RA wird anhand der klinischen Symptomatik und immunologischen Befunde (Rheumafaktoren, Anti-CCP-Antikörper oder MCV-Antikörper) gestellt. Labortests und bildgebende Untersuchungen können zu der Diagnose beitragen. Das American College of Rheumatology hat Kriterien definiert, anhand derer die Diagnose "Rheumatoide Arthritis" gestellt werden kann [50, 56]:

<b>Geschwollen oder schmerzhaft</b>	<b>Serologie</b>	<b>akute Phase Parameter</b>	<b>Symptomdauer</b>	<b>Punkte</b>
≤1 (mittel)großes Gelenk	RF & ACPA negativ	CRP & BSG normal	<6 Wochen	0
2-10 (mittel)große Gelenke		CRP o. BSG erhöht	≥6 Wochen	1
1-3 kleine Gelenke	RF oder ACPA niedrig positiv			2
4-10 kleine Gelenke	RF oder ACPA hoch positiv			3
>10 Gelenke; ≥ 1 kleines Gelenk				5

Differentialdiagnosen: SLE, Sharp-Syndrom, Vaskulitiden, Hämochromatose, Spondylarthritiden, Rheumatisches Fieber, Lyme-Arthritis, Arthritiden, M. Behcet [50].

Therapie:

Die Behandlung ist im Frühstadium der Krankheit effizienter. Symptomen können durch nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente und vorübergehende Glukokortikoidbehandlung gelindert werden, aber das Risiko einer kontinuierlichen Glukokortikoidtherapie ist signifikant. Um strukturellen Schäden vorzubeugen, werden krankheitsmodifizierende Antirheumatika eingesetzt. Von diesen ist Methotrexat das wirksamste und es wird gut vertragen. In Fällen, die auf eine herkömmliche Behandlung nicht ansprechen, ist es möglich, die Aktivität von proinflammatorischen Zytokinen zu hemmen, die eine zentrale Rolle beim Pathomechanismus der rheumatoiden Arthritis spielen. Dafür werden Biologicals“: TNF-  $\alpha$ -Blocker (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab-Pegol und Golimumab), IL-6-Blocker eingesetzt. Bei einer auf ein Gelenk beschränkten Synovitis kann eine intraartikuläre Glukokortikoidinjektion verabreicht werden, in refraktären Fällen ist eine Synovektomie angezeigt. Die Zerstörung der Gelenke kann teilweise durch Physikalische Therapie (wie Kryo-, Hydro- und Bewegungstherapie), Orthesen und schließlich durch Operation korrigiert werden [35].

#### **1.4 Morbus Behcet**

Definition:

Beim Morbus Behcet liegt eine systemische Vaskulitis unbekannter Genese vor mit Krankheitssymptomen an Haut und Schleimhäuten, häufigen Augenveränderungen und Gelenkentzündungen. Zudem können zerebralnervöse Symptome, Thrombosen und gastrointestinale Affektionen auftreten [60].

Epidemiologie:

Diese Erkrankung kommt häufiger in Japan und in der Türkei als in Deutschland vor. Erstmanifestation im 20. bis -40. Lebensjahr. Das Risiko bleibt bei den in Deutschland lebenden Türken erhöht.

Ätiologie und Pathogenese:

Eine genetische Disposition für die Krankheit wird angenommen bei häufigem Vorkommen von HLA-B5, insbesondere HLA-B51. Außerdem ist HLA-A26 mit der Erkrankung assoziiert. Zusätzlich gibt es Assoziationen mit Mutationen im IL12/23-Rezeptor-Gen. Eine Beteiligung von autoinflammatorischer Komponente wurde diskutiert. Nachgewiesen wurde die Ablagerung von Immunglobulinen in den Gefäßwänden, ein relativer Anstieg von aktivierten T-Lymphozyten, eine starke Produktion von TNF und IL-1 und eine Aktivierung von neutrophilen Leukozyten. Auch virale und toxische Faktoren können in der Ätiologie eine Rolle spielen [60; 31].

Klinik:

Das klinische Bild erfasst orale Aphthen als das Hauptsymptom, gefolgt von Hautmanifestationen (Erythema nodosum, stammbetonte erythematöse Papeln und Pusteln), Geschwüren im Genitalbereich und Oligoarthritis großer Gelenke. Gastrointestinale Manifestationen (Erbrechen, Bauchschmerzen, Blähungen, Durchfall, Verstopfung), perforieren, arterielle, hauptsächlich pulmonale arterielle Aneurysmen, lebensbedrohliche Blutungen, ZNS-Manifestationen und Augenerkrankungen kommen beim schweren Verlauf vor [31].

Diagnose und Differentialdiagnosen:

Die Diagnose des Behcet-Syndroms ist in frühen und inkompletten Stadien oft schwierig. Sie wird vor allem aufgrund klinischer Befunde gestellt. Ausschluss

einer Virusinfektion, ophthalmologische Abklärung, Pathergie-Test und Nachweis von HLA-B51 sind dabei wichtig.

Differentialdiagnosen: Reaktive Arthriden, Colitis ulcerosa, das Stevens-Johnson-Syndrom, der Morbus Kawasaki, das Reiter-Syndrom [31].

Therapie:

Kortikosteroide, Colchizin, ggf. Immunsuppressiva (Azathioprin, Ciclosporin A, Cyclophosphamid) oder „Biologicals“ wie TNF-Blocker werden in der medikamentösen Therapie des Morbus Behcet eingesetzt, vor allem bei den schwere Augenbeteiligung Adalimumab gleichrangig mit Infliximab und Interferon-alpha empfohlen. Infliximab wird auch als Primärtherapie bei ZNS-Beteiligung empfohlen [30].

### **1.5 Granulomatose mit Polyangiitis (GP)**

Definition:

Die Granulomatose mit Polyangiitis, früher als Morbus Wegener bezeichnet, ist eine Erkrankung mit nekrotisierenden Granulomen des oberen und unteren Respirationstraktes, einer fokalen Glomerulonephritis und einer nekrotisierenden Vaskulitis. Dabei sind kleine und mittlere Gefäße betroffen [20].

Epidemiologie:

Die Inzidenz der GP ist steigend. Auffallend ist eine saisonale Schwankung der Manifestationsrate mit einem Maximum in Winter. Die GP ist eine seltene Vaskulitisform, die vor allem bei Erwachsenen mittleren Alters auftritt, leicht gehäuft bei Männern.

### Ätiologie und Pathogenese:

Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Es wird aber angenommen, dass die Ätiologie autoimmun ist und durch Umweltereignisse vor dem Hintergrund genetischer Anfälligkeit ausgelöst wird. So könnte sie evtl. durch Staphylokokken getriggert werden. Antikörper gegen neutrophile Granulozyten mit einem cytoplasmatischen Reaktionsmuster im Immunfluoreszenztest (cANCA), die mit Proteinase 3 reagieren, spielen eine zentrale Rolle. Unter der Einwirkung von Zytokinen ist die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen nach Induktion von Adhäsionsmolekülen erhöht. Außerdem kommt es zur Translokation von ANCA-Zielantigenen in die Membran von Neutrophilen (mit der Freisetzung von lysosomalen Enzymen und folgender lokalen Schädigung des Gefäßendothels), sowie zur Aktivierung von Monozyten und Endothelzellen [20].

### Klinik:

Das Syndrom umfasst die Trias einer nekrotisierenden granulomatösen Vaskulitis des oberen Respirationstraktes (Nase, Nasennebenhöhlen, Nasen-Rachen-Raum, aber auch der Ohren, des Kehlkopfes, der Trachea und der Bronchien) und der Lunge (Thoraxschmerzen, Dyspnoe, anämisierende alveoläre Hämorrhagie), sowie einer fokalen segmentalen Glomerulonephritis. Es sind auch limitierte Formen bekannt. Im generalisierten Stadium sind Fieber, Übelkeit, Gewichtsverlust, Arthralgien, Myalgien, chronische Rhinitis, renale Beteiligung oder andere organbedrohliche Manifestationen (Exophthalmus, Keratitis, venöse Abflussbehinderung oder lokalen nekrotisierende Entzündungen der Konjunktiven, ulzerative Skleraveränderungen) typisch [10].

### Diagnose und Differentialdiagnosen:

Für die Diagnose der GP sind die klinische Erscheinung, eine Biopsie aus Nasopharynx, Lunge, oder Niere, HNO-Untersuchung der Nasennebenhöhlen

mit Biopsien der Schleimhaut sowie Laboruntersuchungen (ANCA-Antikörper), und bildgebende Verfahren (CT, Röntgen) wichtig.

Differentialdiagnosen: Andere ANCA-positive Vaskulitiden, Lungenerkrankungen (Tuberkulose, Malignom, Sarkoidose).

Therapie:

Die Therapie ist Stadien- und Aktivitäts-orientiert. Die für die Erkrankung typische chronische Sinusitis kann mit Antibiotika behandelt werden. Glukokortikoide und Methotrexat sind im lokalisierten Stadium indiziert. In der Phase der Generalisation wird die Krankheit mit Kortikosteroiden mit Cyclophosphamid behandelt. Unten Verwendung von Cyclophosphamid oder „Biologicals“ (Rituximab) zur Erhaltung, können die Nebenwirkungen der Therapie stark reduziert werden [19; 33].

## **2 Bedeutung monoklonaler Antikörper für die Therapie rheumatischer Erkrankungen**

### **2.1 Welche monoklonalen Antikörper gibt es**

Heutzutage werden viele monoklonale Antikörper produziert. Es werden monoklonale Antikörper nach der Herstellungsmethode unterschieden:

- Murine Antikörper z.B. Moronomab-CD3
- Chimäre Antikörper z.B. Rituximab, Cetuximab
- Humanisierte Antikörper z.B. Alemtuzumab, Transtuzumab [2; 3]

Außerdem unterscheiden sich monoklonale Antikörper nach dem Wirkungsmechanismus (z.B. Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Anti-IL1-Antikörper usw.).

### **2.2 Von den Maus-Antikörpern bis zu humanisierten Antikörpern**

In 1975 wurde von Köhler und Milstein eine wissenschaftliche Arbeit über eine murine fusionierte Zelle, einem Hybridom, bestehend aus einer Antikörperproduzierenden B-Zelle (gewonnen aus einer Milz eines immunisierten Donors) und einer Myelomzelle, die monoklonale Antikörper mit einer festgelegten Spezifität sezernierte, beschrieben [29]. Bei Myelomzellen handelt es sich um maligne B-Plasmazellen, die weiterhin die Fähigkeit besitzen, Antikörper zu produzieren, aber durch die Entartung immortalisiert wurden [15]. Da die Proteinstruktur von murinen Antikörper sich von humanen Antikörpern unterscheidet, wurden diese nach Injektion in Menschen vom Immunsystem als körperfremd erkannt, was Immunreaktionen auslöste [43]. Die Bildung von Mensch-Anti-Maus-Antikörpern (human-anti-mouse-antibodies, HAMA) in Patienten, die mit murinen Antikörpern behandelt wurden, reduzierte die therapeutische Wirksamkeit immens [43]. Daher wurden neue Strategien zur Verringerung der Immunogenizität von monoklonalen Antikörpern entwickelt. Der primäre Ansatz war die Formation von chimären Antikörpern. Hier war der variable Teil murinen Ursprungs, der konstante Teil aber human. Bereits durch

diese Entwicklung traten Anti-Antikörper-Bildungen signifikant weniger auf. Die Bildung von HAMA ist jedoch nicht komplett ausgesetzt und bleibt weiterhin ein klinisches Problem, da sie die Therapie mit chimären monoklonalen Antikörpern limitiert. Um die Wahrscheinlichkeit von HAMA-Bildung weiter zu senken, wurden humanisierte Antikörper entwickelt [43]. Die Theorie besagte, dass wenn alle Aminosäuren im Antikörper, mit Ausnahme der der 'Complementary Determining Region' (CDR), die für die Epitopbindung verantwortlich ist, der Sequenz in humanen Antikörpern gleichen, die Immunogenität der Antikörper weiter deutlich gesenkt werden kann. Obwohl humanisierte Antikörper weniger HAMA induzieren zeigt sich in der Praxis, dass ihre Wirksamkeit weiterhin limitiert wird, diesmal durch die Bildung von Human-Anti-Human-Antikörpern (HAMA). Auch die in den letzten Jahren hergestellten, vollständigen humanen Antikörpern, zeigen die Induktion von HAMA in Patienten [24]. Trotz dieser Limitationen konnten und werden Erkrankungen wie Asthma, Autoimmunerkrankungen, Drogenabusus, Infektionen, Krebserkrankungen, Sepsis und weitere erfolgreich mit diversen monoklonalen Antikörpern behandelt [3; 22; 43].

### **2.3 Wirkungsmechanismen von monoklonalen Antikörpern**

Die von monoklonalen Antikörpern ausgelösten therapeutische Effekte sind vielfältig. Einerseits können sie direkt über ihre Bindung am Antigen wirken, indirekt können durch Rekrutierung anderer Effektoren weitere Mechanismen ausgelöst werden. Zu den direkten Effekten gehören beispielsweise die Induktion von Apoptose oder die Inhibition von Zellproliferation über direkte Rezeptorbindung [15]. Zu den indirekten Effekten gehört die Antikörper-mediierten Wirkungen des Immunsystems, zum einen die zytotoxische Effekte via Interaktionen mit dem Komplementsystem (complement-dependent cytotoxicity (CDC)), zum anderen die Rekrutierung von Effektorzellen (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)), wie T-Lymphozyten, Monozyten usw.

Die indirekte Effekte werden über die am Fc-Teil des Antikörper-befindlichen Kohlenhydrate aktiviert, für die Auslösung dieser Effekte im Menschen ist der humane IgG1-Fc-Teil am effektivsten [15; 43].

Es werden unterschieden:

Monoklonale AK als Inhibitoren von Zytokinen:

- Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper (Infliximab, Adalimumab, usw.) hemmen die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, die Aktivierung verschiedener Zellen (Makrophagen, synovialer Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten) und unterdrücken in Endothelzellen die Proliferation sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen [25]
- Anti-IL1-Antikörper (wie Anakinra, Kineret), die wie Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper auch die Induktion der verschiedenen Signalkaskaden unterdrücken
- Anti-IL6-Antikörper (wie Tocilizumab), die die Aktivierung von T- und B-Zellen sowie Osteoklasten hemmen, mit einer weiteren Rekrutierung von immunkompetenten Zellen in der entzündeten Synovialmembran
- Anti-BlyS-Antikörper (wie Belimumab), die die Aktivierung von Makrophagen und anderen Zellen der myeloiden Zellreihe blockieren.

B-Zellen als Ziel monoklonaler Antikörper:

- Anti-CD20-Antikörper (wie Rituximab), die als B-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül CD20 die Plasmazelldifferenzierung hemmen könnten
- Anti-CD22-Antikörper (wie Epratuzumab), die nur eine mässige B-Zell-Depletion induzieren, aber erfolgreich die B-Zell-Aktivierung hemmen.

T-Zellen als Ziel monoklonaler Antikörper:

- Anti-CD4-Antikörper, die wegen der schweren Nebenwirkungen keine Bedeutung in der Therapie von rheumatischen Erkrankungen haben
- Anti-CD28-Antikörper, die wie auch die Anti-CD4-Antikörper wegen der schweren Nebenwirkung keinen Eingang ins therapeutische Instrumentarium gefunden haben [66].

## **2.4 Nebenwirkungen der monoklonalen Antikörper**

Zu der häufigsten Nebenwirkung der monoklonalen Antikörper zählen allergische Reaktionen unterschiedlicher Schweregrade von Hautausschlag, Übelkeit, leichter Luftnot, Ödem, Fieber, Kopfschmerzen bis zum anaphylaktischen Schock. Jedoch sind auch schwerwiegende Nebenwirkungen möglich. Im Falle von dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, welcher in der Therapie von HER2-positivem Brust- und Magenkrebs eingesetzt wird, sind diese kardiale Nebenwirkungen wie Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Perikarditis und Herzrhythmusstörungen. Andere Antikörpertherapien bergen Risiken wie eine erhöhte Infektionsanfälligkeit, die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung oder eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, ein Malignom zu entwickeln [3; 22]. Bei einigen Antikörpern wie Rituximab könnte es zu Leukencephalopathie oder sekundärem Antikörpermangelsyndrom kommen [65].

## **2.5 Bildung von Antikörpern gegen diese AK (HAMA/HAHA) und deren Rolle**

Die Bildung von HAMA (Human-Anti-Mouse-Antibodies) beruht auf einer Antwort des menschlichen Immunsystems, die die Maus-Antikörper als fremd erkennt. Die HAMA-Antwort korreliert positiv zu der Therapiedauer, daher bewirkt eine längere Therapiedauer eine zunehmende Neutralisierung der murinen Antikörper. Dies wiederum lässt die Therapie an Wirkung verlieren. Wissenschaftliche Fortschritte, die neue Erkenntnisse in der Antikörperdiversität und rekombinanten DNS-Biotechnologie erbrachten, ermöglichten die Entwicklung von Antikörpern, die schrittweise den humanen mehr ähnelten. Von chimären über humanisierten zu vollständig humanen Antikörper reichte die Entwicklung und mit jedem Schritt konnte die Immunogenität verringert und somit die Induktion von Anti-Immunglobulin-Antikörpern herabgesetzt werden. Dies steigert die mögliche Therapiedauer mit Antikörpern gegen eine Vielzahl von Erkrankungen, wie sie weiter oben/unten aufgelistet wurden [3; 43]. Obwohl die Induktion von HAMA gesenkt werden konnte, zeigte sich bei den

humanisierten Antikörpern nun das Auftreten von Human-Anti-Human-Antikörpern (HAHA). Das menschliche Immunsystem kann gegen vollständig menschliche Immunglobuline Antikörper bilden. Evolutionär gesehen entstanden Antikörper, um fremde Proteine zu markieren und somit die Immunantwort zu erhöhen indem andere Immunsystemkomponente mit dem Fc-Teil der Antikörper interagieren. Dies kann via eines Fc-Rezeptors auf Zellen des Immunsystems oder durch Aktivierung des Komplementsystems geschehen. Durch diese Mechanismen wird die Immunogenität von monoklonalen Antikörpern verstärkt, sie sind aber auch die Mechanismen, die die therapeutischen Effekte bringen, beispielsweise die Zerstörung von Zielzellen [2; 3; 43].

### 3 Fragestellung

In der Literatur wird immer wieder darüber berichtet, dass bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen unter Therapie mit monoklonalen Antikörpern Humane Anti-Maus Antikörper [HAMA] oder Humane Anti-Human-Antikörper [HAHA]) induziert werden können. Dadurch kann es zur Neutralisierung der therapeutischen Antikörper mit Wirkungsverlust oder sogar Nebenwirkungsreaktionen durch die Bildung von Immunkomplexen kommen. Es ist aber auch bekannt, dass solche HAMA/HAHA schon als natürlich vorkommende Antikörper bei gesunden Probanden auftreten, d.h. ohne Exposition von Individuen mit therapeutischen Antikörpern [12].

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, anhand von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen aus der Rheumaambulanz der Medizinischen Klinik II zu überprüfen, wie häufig solche HAMA/HAHA vor bzw. während der Gabe von therapeutischen Antikörpern sowie auch von Immunsuppressiva sind und ob sie spezifisch gegen bestimmte Antikörper gerichtet oder kreuzreaktiv sind.

## 4 Probanden, Material und Methoden

### 4.1 Probandenkollektiv

Untersucht wurden Patienten aus der Rheumaambulanz der Medizinischen Klinik II in Tübingen (Leitung Prof. Dr. Jörg Henes)

Das Kollektiv bestand aus 270 Patienten im Alter zwischen 27 und 87 Jahren: 146 Patienten mit M. Behcet (Durchschnittsalter 43,8 Jahre), 106 Patienten mit rheumatoider Arthritis (Durchschnittsalter 64,4 Jahre), 18 Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (Durchschnittsalter 69,5 Jahre) (Tab. 4.1.1). Außerdem wurden 25 gesunde Probanden als Kontrolle getestet.

Die Diagnosen waren entsprechend nationaler und internationaler Kriterien durch Herrn Prof. Dr. J. Henes gestellt worden.

Tabelle 4.1.1 Probandenkollektiv

Diagnose	Anzahl Probanden getestet.	Geschlecht		Alter	
		W	M	Mittelwert	Bereich.
M. Behcet	146	57	89	43,8	21-73
RA	106	74	32	64,4	22-87
GP	18	3	15	69,5	34-83

M. Behcet: Morbus Behcet; RA: Rheumatoide Arthritis; GP: Granulomatose mit Polyangiitis

Bereits zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen wurde ein Teil der Patienten mit Immunsuppressiva (IS), monoklonalen Antikörpern oder einer Kombination aus beiden behandelt (Tab. 4.1.2.a).

Tabelle 4.1.2.a: Überblick über die Therapie bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen

Diagnose	Gesamt getestet	Therapie (Anzahl Patienten)		
		mit Therapie*)	Keine Therapie	Keine Angaben
M. Behcet	146	72	65	9
RA	106	69	21	16
GP	18	10	7	1

M. Behcet: Morbus Behcet; RA: Rheumatoide Arthritis; GP: Granulomatose mit Polyangiitis

\*) Immunsuppressiva, monoklonale Antikörper oder Kombination aus Immunsuppressiva plus monoklonalem Antikörper

Im weiteren Verlauf wurden 17 der 18 Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, 98 der 146 Patienten mit M. Behcet und 78 der 106 Patienten mit rheumatoider Arthritis behandelt. 14 Probanden mit Granulomatose mit Polyangiitis, 12 M. Behcet-Probanden und 11 Probanden mit rheumatoider Arthritis erhielten eine Kombinationstherapie (monoklonaler Antikörper (AK)+ Immunsuppressive (IS)-Therapie). Vier Probanden mit M. Behcet und 10 Probanden mit RA (Rheumatoider Arthritis) bekamen nur monoklonale AK-Therapie, wie z.B. Rituximab, Adalimumab, Alemtuzumab, Etanercept und andere. Drei Patienten mit GP (Granulomatose mit Polyangiitis), 82 Patienten mit M. Behcet- und 57 RA-Patienten hatten nur IS-Therapie, wie z. B. Cyclophosphomid, Leflunomid und andere (Tab. 4.1.2.b).

Tabelle 4.1.2.b: Überblick über die Therapie bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen

Diagnose	Patienten mit Therapie	Gesamt getestet	Therapieformen (Anzahl Patienten)		
			AK+IS	AK-Mo.	IS
M. Behcet	98	98	12	4	82
RA	78	78	11	10	57
GP	17	17	14	0	3

M. Behcet: Morbus Behcet; RA: Rheumatoide Arthritis; GP: Granulomatose mit Polyangiitis

Insgesamt standen von diesen Patienten 305 Seren zur Verfügung, d.h. bei einem Teil der Patienten konnten Verlaufskontrollen unter Therapie durchgeführt werden.

Seren der Patienten waren für diagnostische Zwecke oder im Rahmen von Studien entnommen worden. Entsprechende Voten des lokalen Ethikkomitees lagen vor.

In der Kontrollgruppe befanden sich Seren von 25 gesunden Personen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet, Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin, Tübingen).

Alle Seren wurden bei -20°C gelagert.

## **4.2 Materialien**

### **4.2.1 Antikörper und andere Chemikalien**

- Monoklonaler Anti-Maus-Antikörper (ChromPure Mouse IgG und IgM); Jackson Immuno Resea; West Baltimore Pike; USA
  - Monoklonaler Antikörper gegen Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (Adalimumab in aufbereiteter Form); AbbVie; Wiesbaden; Deutschland
  - Monoklonaler Antikörper gegen B-Zellen CD20 Oberflächenmolekül (Rituximab, MAb Thera®); Roche; Grenzach; Deutschland
  - Monoklonaler Antikörper gegen FLT3 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. G. Jung, Institut für Immunologie, Universität Tübingen)
  - Bispezifischer monoklonaler Antikörper gegen CD19 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. G. Jung, Institut für Immunologie, Universität Tübingen)
  - Peroxidase-conjugated anti-human IgM (1:300), Fc $\mu$  Fragment Specific; Peroxidase-konjugiert (Jackson ImmunoResearch)
  - Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody (1:200), Fc $\gamma$  Fragment Specific; (Jackson ImmunoResearch)
  - Triton; X-100 SERVA; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Deutschland
  - 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck KGaA; Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
  - O-Phenylenediamin (Peroxidase Substrate); SIGMA-ALDRICH®; Steinheim; Deutschland
- NaCL, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Citronensäure- Monohydrat, Natriumcitrat- Dihydrat, BSA (Bovine Serum Albumin),

### **4.2.2 Lösungen und Pufferansätze**

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer); 0,1 M; pH 7,4
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6, 81 g;  $M=136,09\text{g/mol}$ ; VWR Prolabo® CHEMICALS; Leuven; Belgium
- $\text{NaCl}$  - 43, 83 g;  $M=12,6\text{g/mol}$ ; VWR Prolabo® CHEMICALS; Leuven; Belgium
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 44, 49 g;  $M=141,96\text{g/mol}$ ; Bio Froxx GmbH; Einhausen; Deutschland
- Bicarbonatpuffer-Puffer; 0,2 M; pH-9, 6
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 33, 9 g;  $M=105,99\text{ g/mol}$ ; MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt; Deutschland
- $\text{NaHCO}_3$  –57,12 g;  $M=84,01\text{ g/mol}$ ; MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt; Deutschland
- Citratpuffer; 0,2 M; pH-5,0
- Citronensäure- Monohydrat – 25, 20 g;  $M=210,14\text{ g/mol}$ ; EMSURE®; VWR International; Wien; Österreich
- Natriumcitrat- Dihydrat – 82, 36 g;  $M=294,10\text{ g/mol}$ ; MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt; Deutschland
- Waschpuffer 1
- 3,5 l PBS-Puffer
- 17,5 g BSA (Bovine Serum Albumin) 0,005%; PAN BIOTECH; Aidenbach; Deutschland
- Waschpuffer 2

- 5l PBS-Puffer
- 25 g BSA
- 10 ml Triton
  
- Substrat Lösung
- -66 µl 30% Hydrogen Peroxide
- 100 mg O-Phenylenediamine
- 200 ml Citratpuffer, pH 5,0
  
- Serumverdünnungspuffer
- 1,5L PBS-Puffer
- 1-2 große Spatel BSA (Bovines Serum Albumin)
- 1,2 ml Triton X 100

#### **4.2.3 Verbrauchsmaterialien**

ELISA-Platten; Maxi-Sorb 96 Well; Nunc; Nunc&Co; Wiesbaden; Deutschland

Deep-Wellen-Platten; SARSTEDT

Einmalküvette

Eppendorf-Tubes

Eppendorf Hütchen ohne/ mit Decke (200 ml)

Eppendorf Reference

Misch- und Messkolben (50-500 ml); Hirschmann Techcolor Germany 100-1000ml

Pipettier Reservoir

Pipetten Spitzen; BIOHINT, EPPENDORF, SARSTEDT

Reagenz Gläser

Röhrchen Ständer

Trichter

#### **4.2.4 Geräte**

ELISA-Reader; TECAN, PC LG FLATRON

Einzelschritte Pipette (10-1000 ml);

12-Kanal-Pipetten (25-250 ml); BIOHT

8-Kanal-Pipette (25-250 ml); BIOHT

Feinwaage; Kern ALT 220-5DAM

Elektrowaage; Sartorius

Tischwaage

Magnet Schüttler; Häberle IKA C-MAG MS7, Heidolph MR Hei-Standard

PH-Messer; pHenomenal

### **4.3 Methoden**

#### **Herstellung der Antigene**

##### **4.3.1. Herstellung der Fab2-Fragmente**

Manchmal ist es nützlich, die Aktivität eines Teils eines Immunglobulins zu untersuchen oder zu nutzen, ohne von anderen Teilen des Moleküls gestört zu werden. Es ist möglich, das Immunglobulinmolekül selektiv in Fragmente zu spalten, die diskrete Eigenschaften aufweisen. Die Antikörperfragmentierung wird unter Verwendung von Reduktionsmitteln und Proteasen erreicht, die bestimmte Teile der Immunglobulinproteinstruktur verdauen oder spalten. Obwohl eine Fragmentierung aller Immunglobulinklassen möglich ist, sind nur Verfahren zur Fragmentierung von Maus-, Kaninchen- und humanem IgG und IgM gut charakterisiert worden.

## Herstellung der Fab2-Fragmente aus IgG

Die Grundstruktur ist bei allen Antikörpern identisch. Zwei identische schwere Ketten sind mit zwei identischen leichten Ketten vom  $\kappa$  oder  $\lambda$ -Typ durch kovalente Disulfidbrücken verbunden. Der Leichtkettentyp unterscheiden sich in ihrer Gelenkregion und werden abhängig von Organismus und Immunglobulin-Subklasse eingebaut. Die schweren Ketten sind in ihren ersten beiden konstanten Domänen miteinander verbunden und bilden hier den Fc-Teil (Fragment constant; konstantes Fragment). Eine weitere konstante und eine variable Domäne sind jeweils mit einer leichten Kette verbunden, die ebenfalls aus einer konstanten und einer variablen Domäne bestehen, somit wird insgesamt die Ypsilon-förmige Struktur gebildet. Die verbundenen Domänen der schweren und kurzen Ketten bilden die zwei Fab-Teile (Fragment antigen-binding; antigen-bindendes Fragment), die enzymatisch mittels Papain im darunterliegenden Bereich abgespalten werden können [15]. Papain spaltet Fc oberhalb der Disulfidbrücken beider schwerer Ketten zueinander. Man erhält zwei Fab-Fragmente und ein vollständiges Fragment Fc [26]. Papain kann jedoch auch zur Erzeugung von Fab2 -Fragmenten verwendet werden. Um Fab2 -Fragmente herzustellen, wird das Papain zuerst mit 10 mM Cystein aktiviert. Das überschüssige Cystein wird dann durch Gelfiltration entfernt. Wenn während der Papainverdauung kein Cystein vorhanden ist, können Fab2 -Fragmente erzeugt werden. Pepsin ist eine unspezifische Endopeptidase, die nur bei saurem pH aktiv ist. Bei neutralem oder alkalischem pH wird es irreversibel denaturiert. Pepsin im Gegensatz zu Papain spaltet unterhalb der Disulfidbrücken. Dabei bleibt die Gelenkregion zwischen beiden Fab-Fragmenten (Fab2 -Fragment) erhalten. Zusätzlich entstehen zahlreiche kleine Peptide des Fc-Teils. Das resultierende Fab2 -Fragment besteht aus zwei mit Disulfid verbundenen Fab-Einheiten. Das Fc-Fragment wird stark abgebaut und seine kleinen Fragmente können durch Dialyse, Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie von Fab2 getrennt werden. (Abb. 4.3.1).

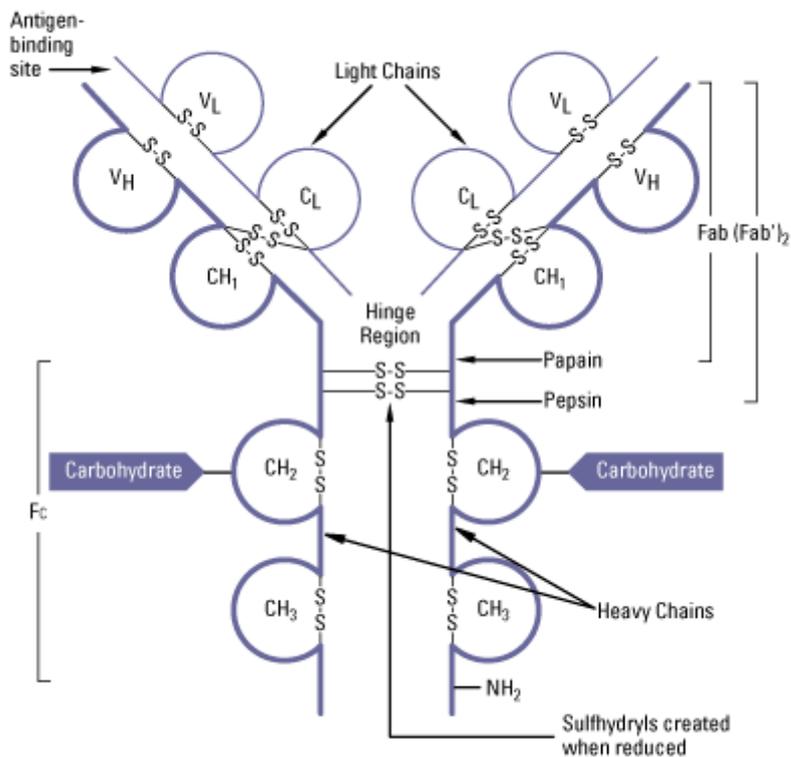


Abbildung 4.3.1 Antikörper-IgG-Struktur und Spaltstellen für die Fragmentierung

### 4.3.2 Nachweis von HAMA/HAHA mittels ELISA

Das Prinzip des ‚Enzyme Linked Immunosorbent Assay‘ (ELISA) ist die chemische Kopplung eines Enzymes mit einem Antikörper oder Antigen. Bei den meisten heute durchgeführten ELISAs wird ein Antigen an eine Festphase gebunden, mit Patientenserum inkubiert und die Anlagerung eines markierten Anti-Human-Antikörpers getestet. Die Antikörper-Bindung wird dann mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, dargestellt. Schließlich wird die Extinktion mit einem Photometer (ELISA READER) bestimmt.

### Durchführung des ELISA

#### Tag 1:

- Herstellen der Antigenverdünnung: Testantigene (1:100 Maus-Fab2-Fragment; 1:100 FLT3-Fab2-Fragment; 1:100 Adalimumab-Fab2-Fragment; 1:100 Rituximab-Fab2-Fragment und 1:100 CD19- Fab2-

Fragment) mit 25ml Bicarbonatpuffer-Puffer verdünnen. Dann Beschichten der ELISA-Platten mit 100ul Antigensuspension pro Well, Inkubation der Platten für ca. 16 h bei 4°C. Die optimalen Konzentrationen der Fab2-Fragmente für die Beschichtung der ELISA-Platten sowie die optimale Serumverdünnung waren in Vorversuchen freundlicherweise von Frau Sandra Plankenhorn, Immunpathologisches Labor, evaluiert worden [18]

- Herstellen der Serumverdünnung: Endverdünnung 1:5000 mit Serumverdünnungspuffer
- Ansetzen von Waschpuffer 1
- Über Nacht im Kühlschrank aufbewahren; soll kühl verwendet werden.

#### **Tag 2:**

- Nunc-Platten in Waschpuffer 1 waschen und mindestens 15 Minuten inkubieren lassen. Danach Platten gründlich auf Zellstoff ausklopfen und die Serumendverdünnung hinein pipettieren (je 100 µl Serumendverdünnung in die Platte). Dann Serumendverdünnung 90 Minuten bei Raumtemperatur in den Platten inkubieren lassen.
- Waschen der Platten (3mal) in Waschpuffer 2
- Die als sekundäre Antikörper verwendeten Peroxidase-konjugierten anti-human-Antikörper wurden in Waschpuffer 2 verdünnt: Anti-IgG-AK 1:3000, anti-IgM-AK 1:2000. Zugabe zu den Platten (100 µl/well) für 60 min bei Raumtemperatur. Nunc-Platten in Waschpuffer 2 waschen und mindestens 15 Minuten inkubieren lassen
- Nunc-Platten gut ausklopfen und 150 µl Substrat/Well hinein pipettieren. Die ablaufende Reaktion wird durch einen gelben Farbumschlag in den positiven Wells sichtbar

Sind die bekannten und angestrebten Kontrollwerte erreicht, wird die Reaktion mit 50µl Schwefelsäure (25%) /Well abgestoppt. Positive und negative

Kontrollen wurden zur Gewährung der Vergleichbarkeit eingesetzt. Die Absorptionswerte (AO) der Kontrollen wurden in Vorversuchen festgelegt [28].

- Auswerten der Platten mit dem Programm Magellan am ELISA-Reader (Messwellenlänge: 450 nm; Referenzwellenlänge: 620 nm). Die Werte der Probanden werden auf die Kontrollseren bezogen

Zur Definition des Normbereiches wurden Seren von 25 gesunden Blutspendern getestet. Mittelwerte der Absorptionen plus zwei- bzw. dreifache Standardabweichung gelten als schwach positiv bzw. positiv.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Reaktivität von Antikörpern gegen monoklonale Antikörper (Human-Anti-Mouse-Antibodies, (HAMA); Human-Anti-Human-Antibodies (HAHA)) in Seren von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen

Wie in Tabelle 5.1.a und b dargestellt, zeigten Seren von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (GP) und M. Behcet eine signifikant höhere IgG-Reaktivität gegen den Anti-Maus-IgG-Antikörper (AK) sowie gegen den Anti-FLT3-Antikörper (AK) als gesunde Probanden. Wie aus Abbildungen 5.1.1-5.1.5 ersichtlich ist, wurde in der Patientengruppe mit GP im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant erhöhte Rituximab- und Adalimumab-IgG Reaktivität festgestellt. In der Patientengruppe mit RA war die IgG-Reaktivität gegen CD19-Antikörper signifikant gegenüber den anderen Testgruppen erhöht. Mit Ausnahme von Adalimumab zeigte sich gegen alle getesteten Antikörper eine nicht-signifikante/signifikante erhöhte IgG-Reaktivität in RA Patienten im Vergleich zu anderen Probanden. Im Gegensatz war die IgM-Reaktivität in RA Patienten signifikant verringert, in den anderen Patientengruppen nicht verändert, wenn verglichen mit den gesunden Probanden (Tab. 5.1.c; Abb. 5.1.6.-5.1.10).

Tabelle 5.1.a: IgG-Reaktivität von Seren von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen gegen verschiedene monoklonale Antikörper\*)

		IgG-Antikörper gegen (Absorptionswerte x 1000)				
		Antimaus-AK	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-AK	Anti-CD19-AK
M. Behcet	MW	804,95	520,31	495,08	619,28	516,94
n=146	SD	296,63	246,72	278,48	240,95	270,13
RA	MW	328,06	549	623,18	474,2	721,16
n=106	SD	203,99	305,04	316,23	293,66	338
GP	MW	984,46	619,4	657,8	642,66	556,46
n=18	SD	210,52	525,25	263,03	212,58	276,75
Gesunde	MW	598,66	383,91	438,16	410,91	480,41
n=25	SD	335,19	308,19	311,28	261,86	372,35

\*) Seren zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen

MW-Mittelwert SD=Standardabweichung

Tabelle 5.1.b: Statistische Signifikanzen (p-Werte) der IgG-Reaktivität von Probanden (Tab. 5.1.a)

<b>IgG-Reaktivität gegen Anti-Maus-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,039	0,000	0,023
RA	0,000	0,000	-	0,013
GP	0,039	-	0,000	0,001
Gesunde	0,023	0,001	0,013	-
<b>IgG-Reaktivität gegen Rituximab</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,129	0,920	0,060
RA	0,920	0,143	-	0,060
GP	0,129	-	0,143	0,037
Gesunde	0,060	0,037	0,060	-
<b>IgG-Reaktivität gegen Adalimumab</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,026	0,009	0,401
RA	0,009	0,412	-	0,064
GP	0,026	-	0,412	0,041
Gesunde	0,401	0,041	0,064	-
<b>IgG-Reaktivität gegen Anti-FLT3-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,377	0,000	0,014
RA	0,000	0,007	-	0,560
GP	0,377	-	0,007	0,037
Gesunde	0,014	0,037	0,560	-
<b>IgG-Reaktivität gegen-Anti-CD19-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	0,268	-	0,234	0,297
RA	0,000	0,234	-	0,032
GP	-	0,268	0,000	0,509
Gesunde	0,509	0,297	0,032	-

Tabelle 5.1.c: IgM-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen gegen verschiedene monoklonale Antikörper\*)

		<b>IgM-Antikörper gegen (Absorptionswerte x 1000)</b>				
		Antimaus-AK	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-AK	Anti-CD19-AK
<b>M. Behcet</b>	MW	627,49	589,3	609,92	644,58	609,16
n=146	SD	331,73	304,24	319,16	320,18	303,45

<b>RA</b>	MW	438,74	428,28	418,74	408,5	421,35
n=106	SD	253,5	249	266,93	228,94	254,7
<b>GP</b>	MW	617,13	645,33	566,06	635,6	535,4
n=18	SD	344,76	374,49	408,42	380,24	350,81
<b>Gesunde</b>	MW	735,16	637,83	536,83	610,08	591,75
n=25	SD	262,48	242,68	215,88	248,72	266,75

\*) Seren zum Zeitpunkt den ersten serologischen Untersuchungen

Tabelle 5.1.d: Statistische Signifikanzen (p-Werte) der IgM-Reaktivität (Tab. 5.1.c)

<b>IgM-Reaktivität gegen Anti-Maus-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,901	0,000	0,147
RA	0,000	0,031	-	0,001
GP	0,901	-	0,031	0,373
Gesunde	0,147	0,373	0,001	-
<b>IgM-Reaktivität gegen Rituximab</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,768	0,000	0,438
RA	0,000	0,024	-	0,009
GP	0,768	-	0,024	0,905
Gesunde	0,438	0,905	0,009	-
<b>IgM-Reaktivität gegen Adalimumab</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,496	0,000	0,518
RA	0,000	0,259	-	0,033
GP	0,496	-	0,259	0,981
Gesunde	0,518	0,981	0,033	-
<b>IgM-Reaktivität gegen Anti-FLT3-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,772	0,000	0,749
RA	0,000	0,028	-	0,005
GP	0,772	-	0,028	0,943
Gesunde	0,749	0,943	0,005	-
<b>IgM-Reaktivität gegen Anti-CD19-Antikörper</b>				
	M. Behcet	GP	RA	Gesunde
M. Behcet	-	0,317	0,000	0,850
RA	0,000	0,350	-	0,025
GP	0,317	-	0,350	0,548
Gesunde	0,850	0,548	0,025	-

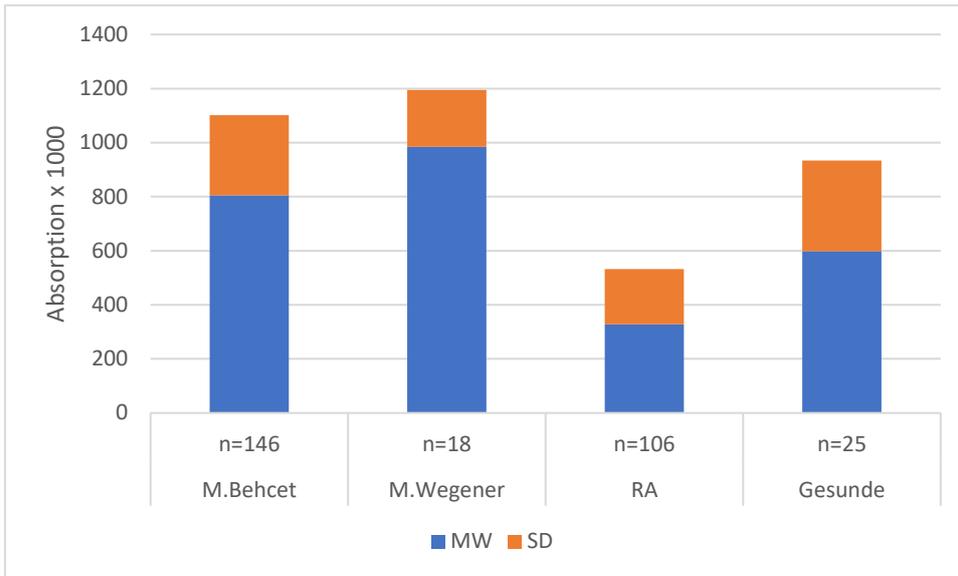


Abb. 5.1.1 **IgG**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-Maus-Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.b).

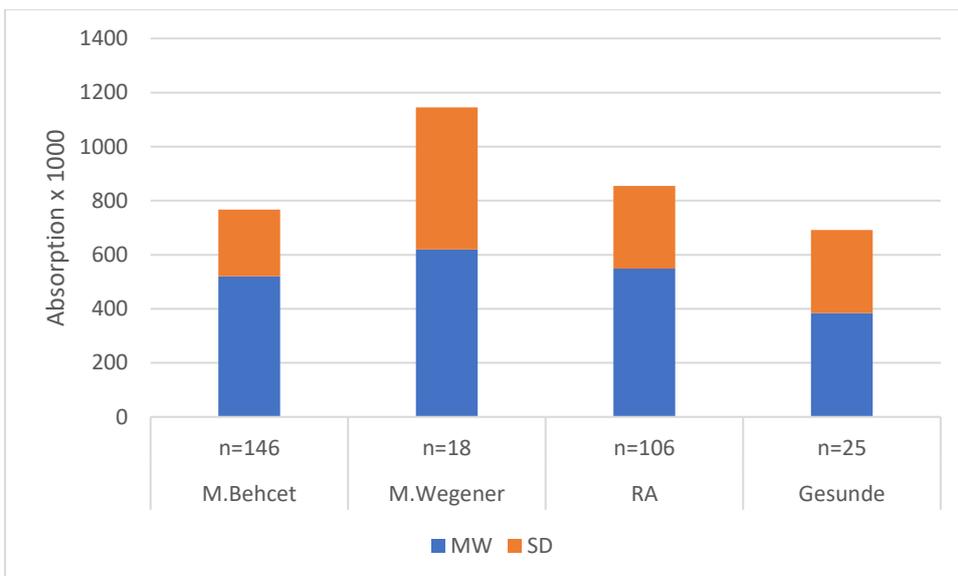


Abb. 5.1.2 **IgG**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Rituximab** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.b)

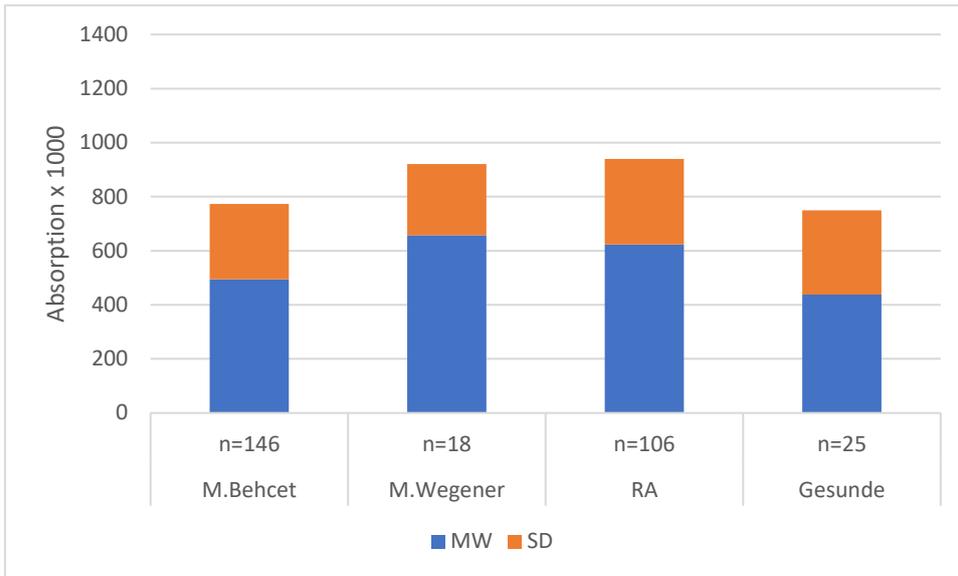


Abb. 5.1.3 **IgG**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Adalimumab** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.b)

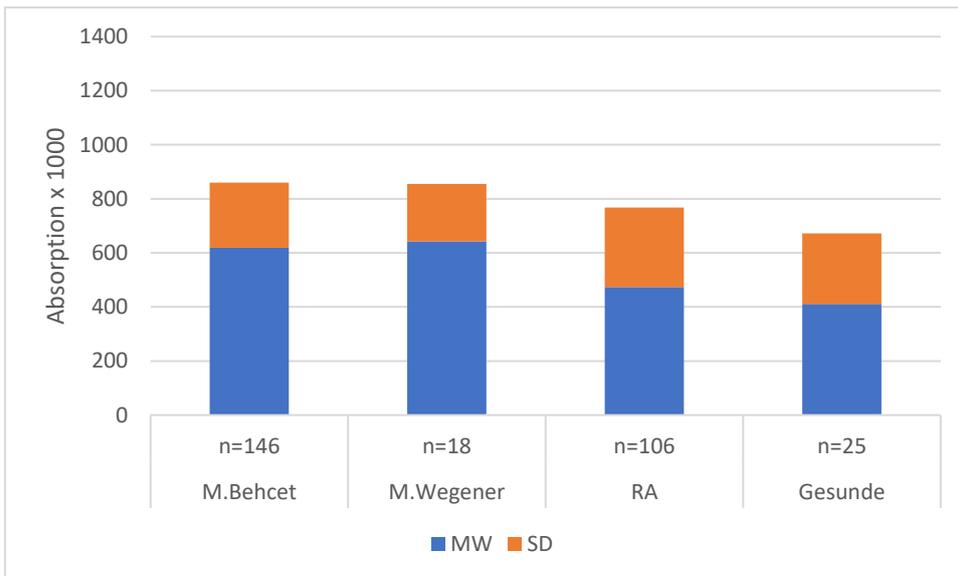


Abb. 5.1.4 **IgG**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-FLT3-Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.b).

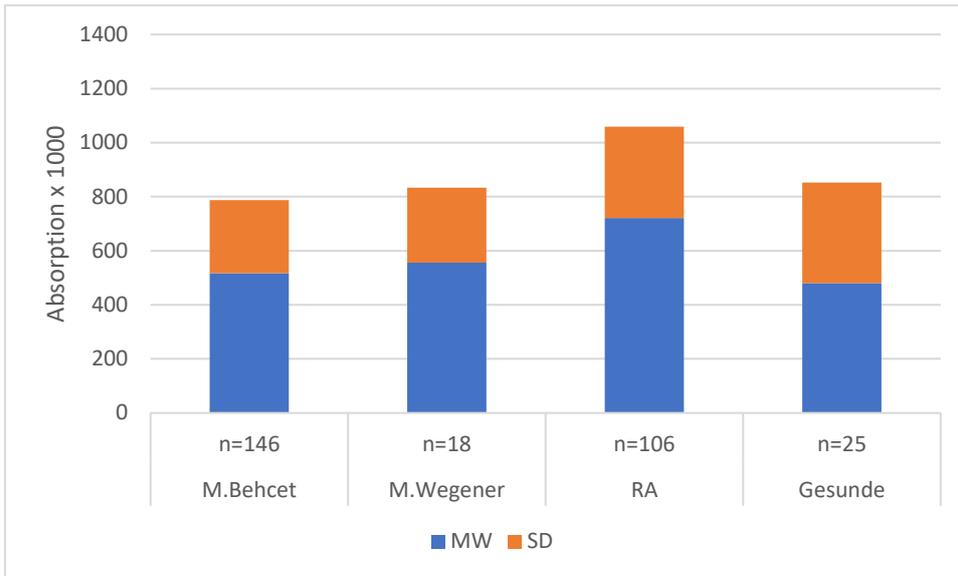


Abb. 5.1.5 **IgG**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-CD19-Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.b).

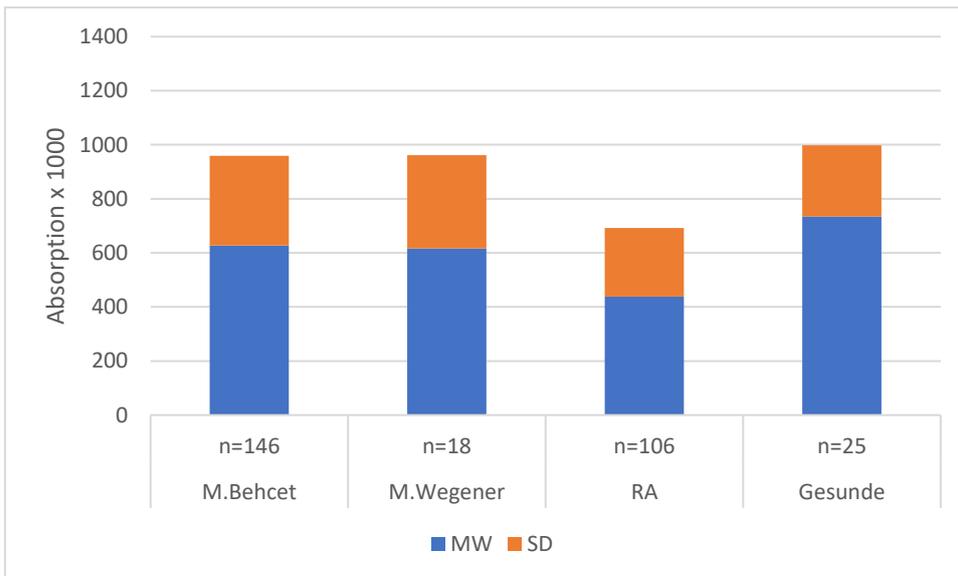


Abb. 5.1.6 **IgM**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-Maus Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.d).

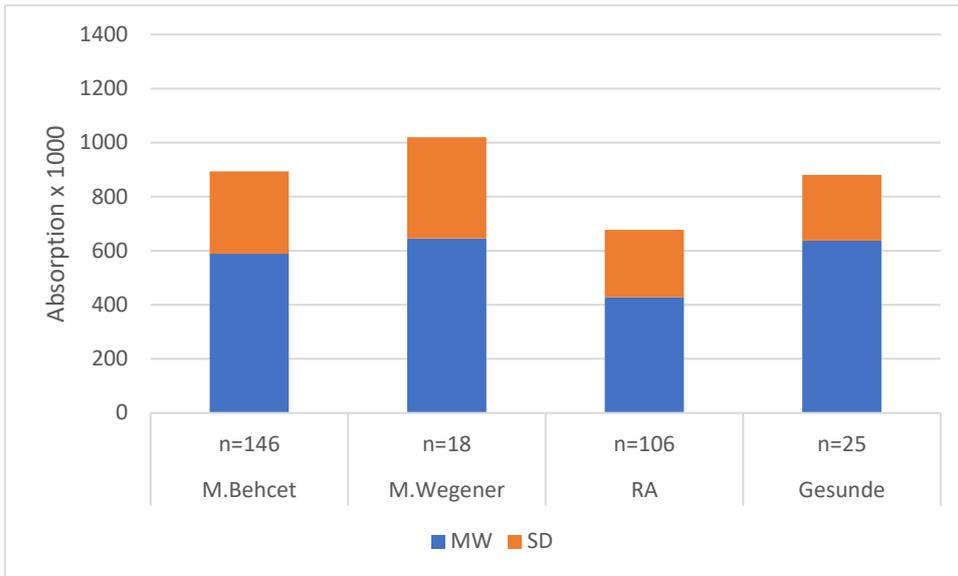


Abb. 5.1.7 **IgM**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Rituximab** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.d).

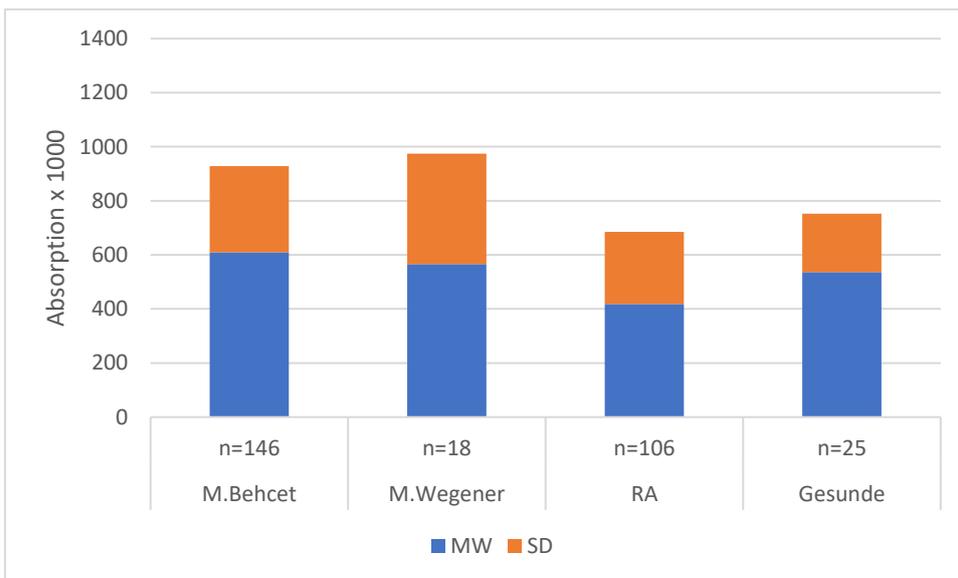


Abb. 5.1.8 **IgM**-Reaktivität von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Adalimumab** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.d).

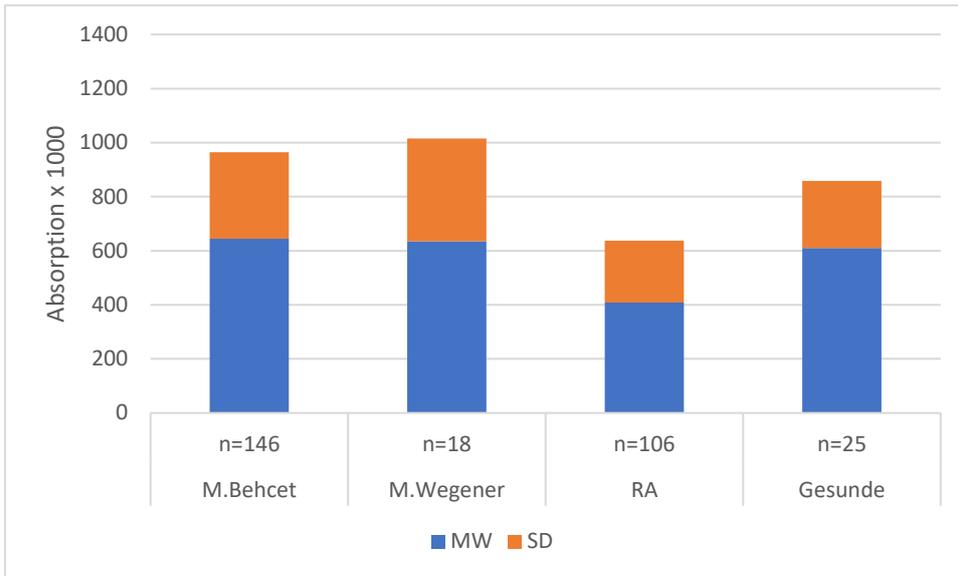


Abb. 5.1.9 **IgM-Reaktivität** von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-FLT3-Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.d).

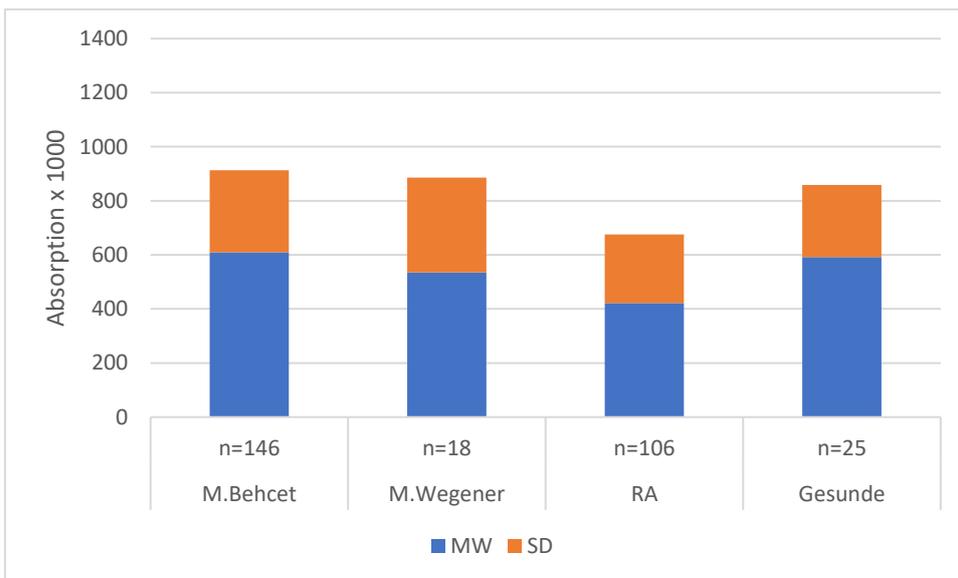


Abb. 5.1.10 **IgM-Reaktivität** von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen mit **Anti-CD19-Antikörpern** (Serumproben zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen; Signifikanzen s. Tab. 5.1.d).

## 5.2 Häufigkeit von Antikörpern gegen monoklonale Antikörper (Human-Anti-Mouse-Antibodies, (HAMA); Human-Anti-Human-Antibodies (HAHA)) in Seren von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen zum Zeitpunkt der ersten serologischen Untersuchungen

Wie in Tabelle 5.2.1 dargestellt, wurden selbst bei den nicht-therapierten Patienten mit M. Behcet und GP – nicht jedoch bei den RA-Patienten - Antikörper gegen den Maus-Antikörper in einem hohen Prozentsatz (bis zu 100%) gefunden. Auch AK gegen die monoklonalen Human-AK waren am häufigsten bei untherapierten Patienten mit GP zu beobachten. Therapierte Patienten mit GP hatten seltener - insbesondere IgM-AK – als untherapierte Patienten, therapierte Patienten mit M. Behcet hatten dagegen eher häufiger HAMA als untherapierte Patienten, während bei den RA-Patienten kein wesentlicher Unterschied zwischen therapierten und untherapierten Patienten zu erkennen war.

Tabelle 5.2.1: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG und IgM-Typ bei den Probanden zum Zeitpunkt der **ersten** serologischen Untersuchungen

	Anzahl getestete Probanden	% Antikörper positiv gegen									
		Anti-Maus-Ak		Rituximab		Adalimumab		Anti-FLT3-Ak		Anti-CD19-Ak	
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
<b>M. Behcet</b>											
Gesamt	146										
mit Th.	72	68	29	69	22	39	32	54	28	42	35
keine Th.	65	77	21	38	29	18	31	40	23	31	29
keine Ang.	9	0	44	78	33	11	33	33	44	44	0
<b>RA</b>											
Gesamt	106										
mit Th.	69	4	4	35	7	19	6	12	6	38	4
keine Th.	21	5	14	38	9	19	14	14	9	38	14
keine Ang.	16	19	0	44	0	31	12	19	0	44	0
<b>GP</b>											
Gesamt	18										
mit Th.	10	80	10	80	10	60	10	70	10	40	10
keine Th.	7	10	43	57	57	57	71	71	57	43	43
keine Ang.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<b>Gesunde</b>											
Gesamt	25	20	24	20	20	16	8	20	12	16	12

Diese Analysen wurden zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt, als mehr Patienten unter Therapie standen. Auch hier zeigt sich, dass Seren von M. Behcet-Patienten ohne Therapie eher seltener AK aufweisen als Seren von Patienten mit Therapie, während Patienten mit RA ohne Therapie häufiger HAMA/HAHA hatten als Patienten mit Therapie (Tab. 5.2.2).

Tabelle 5.2.2: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG und IgM-Typ bei den Probanden zum Zeitpunkt der **zweiten** serologischen Untersuchungen

	Anzahl getestete Probanden	% Antikörper positiv gegen									
		Anti-Maus-Ak		Rituximab		Adalimumab		Anti-FLT3-Ak		Anti-CD19-Ak	
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
<b>M. Behcet</b>											
Gesamt	146										
mit Th.	98	79	24	62	22	35	31	53	24	41	36
keine Th.	39	56	28	36	33	15	33	33	28	26	23
keine Ang.	9	0	44	78	33	11	33	33	44	44	0
<b>RA</b>											
Gesamt	106										
mit Th.	78	5	4	35	6	18	5	11	5	37	5
keine Th.	12	0	25	42	17	25	25	17	17	42	17
keine Ang.	16	19	0	44	0	31	12	19	0	44	0
<b>GP</b>											
Gesamt	18										
mit Th.	17	88	23	71	29	59	35	71	29	41	23
keine Th.	0										
keine Ang.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 5.3 Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG und IgM Typ in Seren von Probanden vor und unter Therapie

Vergleicht man die Häufigkeit der HAMA/HAHA bei Patienten, die im weiteren Verlauf therapiert wurden (Kapitel 4, Tab. 4.1.2), vor und unter Therapie und unabhängig von der Therapieform, findet sich bei allen drei Erkrankungsgruppen – M. Behcet, RA, GP - keine signifikante Beeinflussung der IgG-AK Häufigkeit durch die Therapie (Tab. 5.3.1); die Häufigkeit der IgM-AK nahm insbesondere bei den Patienten mit GP leicht ab (Tab. 5.3.2). Die Unterschiede waren aber für alle Gruppen nicht signifikant.

Tabelle 5.3.1: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen vor und unter Therapie unabhängig von der Therapieform

	Anzahl getestete Patienten	% Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>M. Behcet</b>						
vor Th.	98	67	61	34	52	41
unter Th.	98	66	52	33	52	38
<b>RA</b>						
vor Th.	78	9	35	18	11	37
unter Th.	78	1	29	20	10	33
<b>GP</b>						
vor Th.	17	88	74	52	71	49
unter Th.	17	76	65	41	59	33

Tabelle 5.3.2: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgM Typ in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen vor und unter Therapie unabhängig von der Therapieform

	Anzahl getestete Patienten	% Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>M. Behcet</b>						
vor Th.	98	23	20	29	23	35
unter Th.	98	29	24	33	25	26
<b>RA</b>						

vor Th.	78	4	6	5	5	5
unter Th.	78	3	9	1	5	5
<b>GP</b>						
vor Th.	17	23	29	35	29	23
unter Th.	17	12	12	12	6	12

In einem weiteren Schritt wurde das Verhalten der HAMA/HAHA unter den verschiedenen Therapieformen betrachtet. Aber auch diese differenzierte Analyse ergibt, dass weder Therapie mit einem monoklonalen Antikörper allein noch in Kombination mit Immunsuppressiva oder immunsuppressive Therapie alleine den Nachweis von HAMA/HAHA bei allen drei Patientengruppen wesentlich beeinflusst. Lediglich bei Patienten mit M. Behcet nahm unter Kombinationstherapie IS+ monoklonaler AK die Häufigkeit der IgG-AK unter Rituximab ab, der Unterschied gegenüber vor der Therapie war mit  $p=0.09$  aber nicht statistisch signifikant (Tab. 5.3.3-5.3.4). Hervorzuheben ist, dass insbesondere unter Therapie mit monoklonalen Antikörpern die HAMA/HAHA bei keiner der Erkrankungen zunahm.

Tabelle 5.3.3: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgG** Typ bei 98 Patienten mit M. Behcet vor und unter Therapie in Abhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+ IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgG-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	82	60	48	30	45	33
unter Therapie	82	58	43	29	46	32
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

Tabelle 5.3.4: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgM** Typ bei 98 Patienten mit M. Behcet vor und unter Therapie in Abhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+ IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgM-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	82	19	18	23	20	26
unter Therapie	82	24	22	28	23	22
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Tabelle 5.3.5: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgG** Typ bei 78 Patienten mit RA vor und unter Therapie in Abhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgG-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	57	1	19	10	5	22
unter Therapie	57	1	18	12	6	20
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>Vor Therapie</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Tabelle 5.3.6: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgM** Typ bei 78 Patienten mit RA vor und unter Therapie in Abhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgM-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

<b>unter Therapie</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	57	2	3	4	3	3
unter Therapie	57	1	5	1	3	2
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

Tabelle 5.3.7: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgG** Typ bei 17 Patienten mit GP vor unter Therapie in Anhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgG-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>6</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>5</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	3	2	2	2	2	1
unter Therapie	3	2	2	2	2	1
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>0</b>					
<b>unter Therapie</b>	<b>0</b>					

Tabelle 5.3.8: Häufigkeit der HAMA/HAHA vom **IgM** Typ bei 17 Patienten mit GP vor und unter Therapie in Anhängigkeit von der Therapieform (mit *monoklonalem AK, IS oder monoklonalem AK+IS*)

	Anzahl getestete Patienten	Anzahl IgM-Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>Monoklonaler AK+IS</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>unter Therapie</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Immunsuppressiva						
vor Therapie	3	0	1	1	1	0
unter Therapie	3	0	0	0	0	0
<b>Monoklonaler AK</b>						
<b>vor Therapie</b>	<b>0</b>					
<b>unter Therapie</b>	<b>0</b>					

#### 5.4 Beeinflussung des Verlaufs der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM Typ bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen durch die spezifischen Antikörpertherapien

Betrachtet man die unterschiedlichen Therapieformen wird ersichtlich, dass unabhängig von der Patientengruppe die Häufigkeit des Auftretens von Anti-Rituximab-IgG-AK unter Therapie mit Rituximab abnimmt (statistisch nicht signifikant am ehesten bei niedrigen Patientenzahlen). Hingegen nimmt bei allen drei Patientengruppen das Auftreten von Anti-Adalimumab-Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ unter Adalimumabtherapie eher zu. Therapie mit anderen Antikörpern führte zu unterschiedlichem Verhalten der Antikörperverläufe (Tab. 5.4.1-5.4.2) Lediglich die Therapie mit Canakimumab führte bei Patienten mit M. Behcet zu einer Reduktion der AK gegen Rituximab.

Tabelle 5.4.1: Verlauf der HAMA/HAHA vom **IgG** Typ unter verschiedenen Antikörpertherapien bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen

Antikörpertherapie	Patienten mit Gaben gesamt	Anzahl Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>M. Behcet</b>						
<b>Rituximab</b>	1					
Vor Therapie		1	1	0	0	0
1 Gabe		1	0	0	0	0
letzte Gabe		1	0	0	0	0
<b>Adalimumab</b>	3					
Vor Therapie		1	1	1	1	1
1 Gabe		1	2	2	3	2
letzte Gabe		1	2	2	3	2
<b>Alentuzumab</b>	0					
<b>Infliximab</b>	4					
Vor Therapie		2	1	0	1	1
1 Gabe		2	3	0	0	1
letzte Gabe		2	3	0	0	1
<b>Etanercept</b>	0					
<b>Anakinra</b>	1					
Vor Therapie		1	1	1	1	1
1 Gabe		1	1	0	1	1
letzte Gabe		1	1	0	1	1
<b>Tocilizumab</b>	0					

<b>Canakimumab</b>	5					
Vor Therapie		2	5	1	2	2
1 Gabe		2	2	1	1	1
Letzte Gabe		2	2	1	1	1
<b>Certolizumab</b>	0					
<b>RA</b>						
<b>Rituximab</b>	5					
Vor Therapie		1	2	0	1	1
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>Adalimumab</b>	6					
Vor Therapie		0	2	2	0	2
1 Gabe		0	3	2	1	3
letzte Gabe		0	3	2	1	3
<b>Alentuzumab</b>	0					
<b>Infliximab</b>	0					
<b>Etanercept</b>	6					
Vor Therapie		0	3	2	3	3
1 Gabe		0	3	3	2	3
letzte Gabe		0	3	3	2	3
<b>Anakinra</b>	0					
<b>Tocilizumab</b>	0					
<b>Canakimumab</b>	0					
<b>Certolizumab</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>GP</b>						
<b>Rituximab</b>	10					
Vor Therapie		9	7	5	5	4
1 Gabe		7	7	5	3	3
letzte Gabe		6	5	4	5	2
<b>Adalimumab</b>	3					
Vor Therapie		2	1	1	2	1
1 Gabe		2	1	1	2	2
letzte Gabe		2	1	1	1	1
<b>Alentuzumab</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>Infliximab</b>	2					
Vor Therapie		2	1	1	1	1
1 Gabe		1	1	1	1	1
letzte Gabe		1	1	1	1	1
<b>Etanercept</b>	1					
Vor Therapie		1	1	1	1	1

1 Gabe		1	1	1	1	1
letzte Gabe		1	1	1	1	1
<b>Anakinra</b>	0					
<b>Tocilizumab</b>	0					
<b>Canakimumab</b>	0					
<b>Certolizumab</b>	0					

Tabelle 5.4.2: Verlauf der HAMA/HAHA vom **IgM** Typ unter verschiedenen Antikörpertherapien bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen

Antikörpertherapie	Patienten mit Gaben gesamt	Anzahl Antikörper positiv gegen				
		Anti-Maus-Ak	Rituximab	Adalimumab	Anti-FLT3-Ak	Anti-CD19-Ak
<b>M. Behcet</b>						
<b>Rituximab</b>	1					
Vor Therapie		1	0	1	1	1
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>Adalimumab</b>	3					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		2	2	3	2	0
letzte Gabe		2	2	3	2	0
<b>Alentuzumab</b>	0					
<b>Infliximab</b>	4					
Vor Therapie		2	1	2	1	3
1 Gabe		3	0	0	1	3
letzte Gabe		3	0	0	1	3
<b>Etanercept</b>	0					
<b>Anakinra</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	1
1 Gabe		1	0	1	1	0
letzte Gabe		1	0	1	1	0
<b>Tocilizumab</b>	0					
<b>Canakimumab</b>	5					
Vor Therapie		1	1	2	1	2
1 Gabe		2	1	1	1	1
letzte Gabe		2	1	1	1	1
<b>Certolizumab</b>	0					
<b>RA</b>						
<b>Rituximab</b>	5					
Vor Therapie		1	2	0	1	0
1 Gabe		0	0	0	0	1
letzte Gabe		0	0	0	0	1
<b>Adalimumab</b>	6					
Vor Therapie		0	0	0	0	0

1 Gabe		3	2	1	3	0
letzte Gabe		3	2	1	3	0
<b>Alentuzumab</b>	0					
<b>Infliximab</b>	0					
<b>Etanercept</b>	6					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		3	3	2	3	2
letzte Gabe		3	3	2	3	2
<b>Anakinra</b>	0					
<b>Tocilizumab</b>	0					
<b>Canakimumab</b>	0					
<b>Certolizumab</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>GP</b>						
<b>Rituximab</b>	10					
Vor Therapie		2	2	3	2	2
1 Gabe		7	5	3	3	0
letzte Gabe		5	4	5	2	0
<b>Adalimumab</b>	3					
Vor Therapie		1	1	1	1	1
1 Gabe		1	1	2	2	1
letzte Gabe		1	1	1	1	1
<b>Alentuzumab</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		0	0	0	0	0
letzte Gabe		0	0	0	0	0
<b>Infliximab</b>	2					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		1	1	1	1	0
letzte Gabe		1	1	1	1	0
<b>Etanercept</b>	1					
Vor Therapie		0	0	0	0	0
1 Gabe		1	1	1	1	0
letzte Gabe		1	1	1	1	0
<b>Anakinra</b>	0					
<b>Tocilizumab</b>	0					
<b>Canakimumab</b>	0					
<b>Certolizumab</b>	0					

## 5.5 Reaktivität der Antikörper

In diesem Kapitel wurde die IgG und IgM Antikörper Reaktivität gegenüber Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern bei den Patienten vor und unter monoklonaler AK-Therapie sowohl in Form einer Mono- als auch einer Kombinationstherapie (monoklonale AK+IS-Therapie) bestimmt.

### 5.5.1 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG und IgM Typ bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen unter Antikörper-Monotherapie

Es lässt sich feststellen, dass die HAMA/HAHA-Reaktivität sowohl vom IgG Typ als auch von IgM Typ (MW von Anti-Maus-Antikörper, Antikörper gegen Rituximab, Adalimumab, FLT3 und CD19) bei den RA Patienten unter Rituximab-Monotherapie gesunken ist (Abb. 5.5.1.a-5.5.1.b).

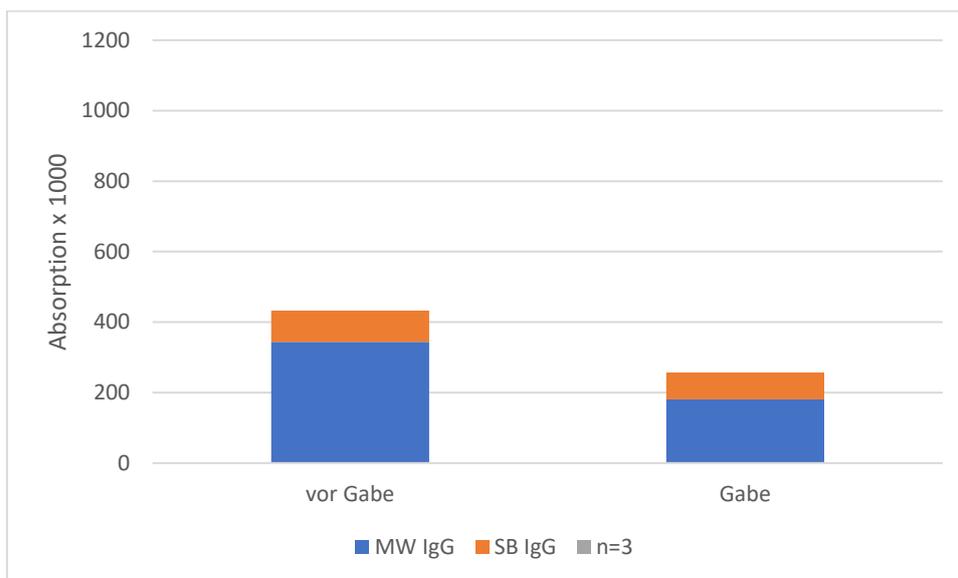


Abbildung 5.5.1.a: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG Typ (MW) unter Rituximab-Monotherapie bei den RA Patienten\*)

\*) MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern

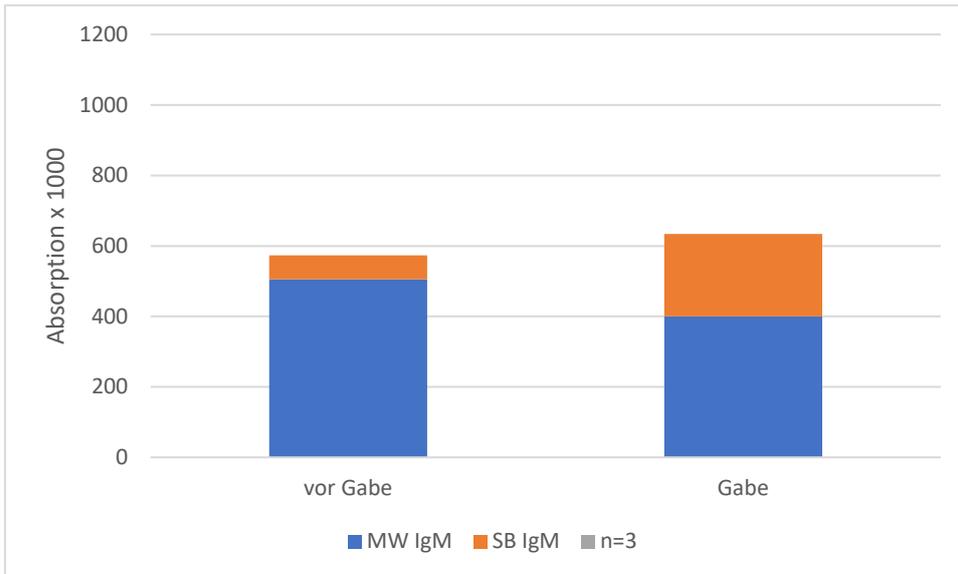


Abbildung 5.5.1.b: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM Typ (MW) unter Rituximab-Monotherapie bei den RA Patienten\*)

\*) MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern

Einen anderen Verlauf zeigte die Antikörper-Reaktivität bei den M. Behcet Patienten unter Canakimumab-Monotherapie: Direkt nach der Antikörpergabe fiel zuerst die HAMA/HAHA-Reaktivität vom IgG Typ ab, stieg dann wieder an und blieb im weiteren Verlauf fast unverändert. HAMA/HAHA vom IgM Typ fielen nach der Antikörpergabe und 3 Monaten danach ab und stiegen dann wieder an (Abb.5.5.1c-5.5.1.d).

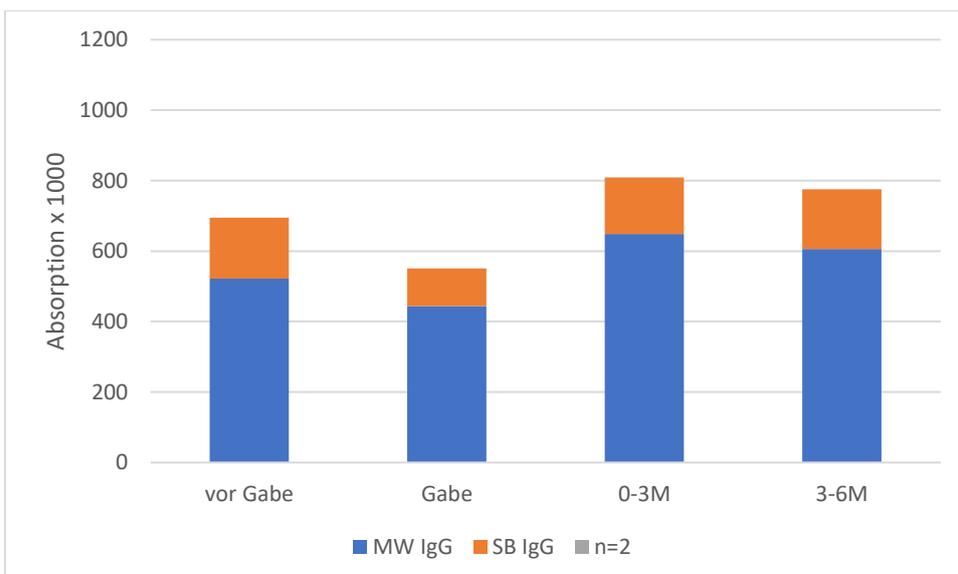


Abbildung 5.5.1.c: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG Typ (MW) unter Canakimumab-Monotherapie bei den M. Behcet Patienten\*)

\*) MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern

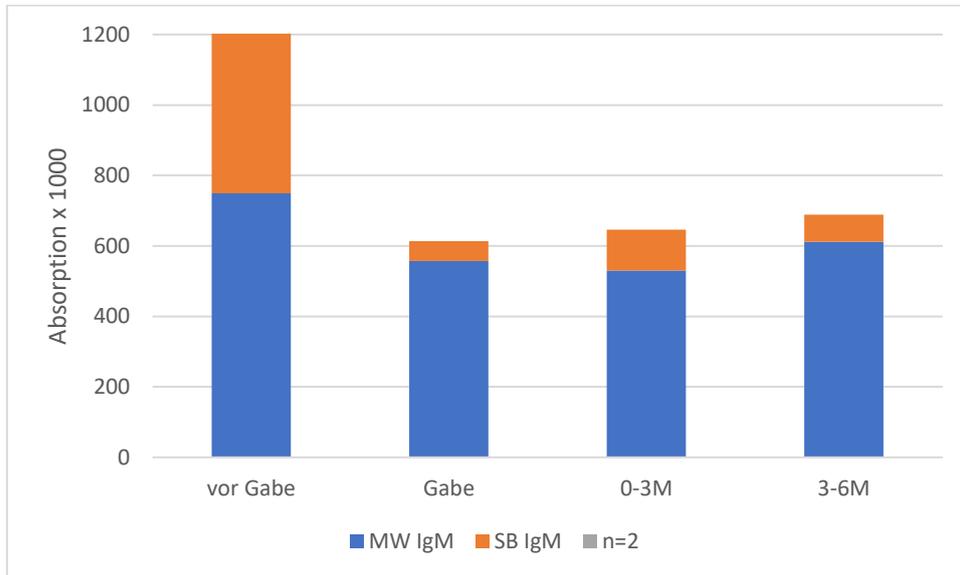


Abbildung 5.5.1.d: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM Typ (MW) unter Canakimumab-Monotherapie bei den M. Behcet Patienten\*)

\*) MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern

### 5.5.2 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG und IgM Typ bei Probanden unter Kombinationstherapie mit Antikörpern zu den verschiedenen Zeitpunkten

Bei den RA Patienten, die eine Kombinationstherapie mit Etanercept erhielten, wiesen die HAMA/HAHA IgG Typ einen ähnlichen zeitlichen Verlauf auf wie die IgM Antikörper, d.h. sie stiegen im weiteren Verlauf im Zeitfenster bis zu 12 Monaten an und nahmen danach wieder ab (Abb. 5.5.2.a-5.5.2.b).

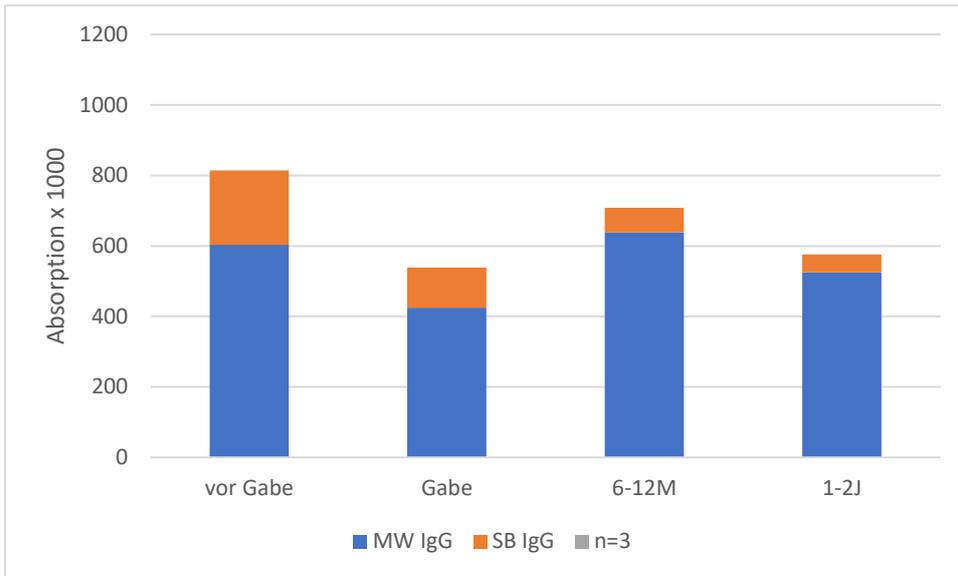


Abbildung 5.5.2.a: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG Typ bei den RA Patienten unter Kombinationstherapie mit Etanercept

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

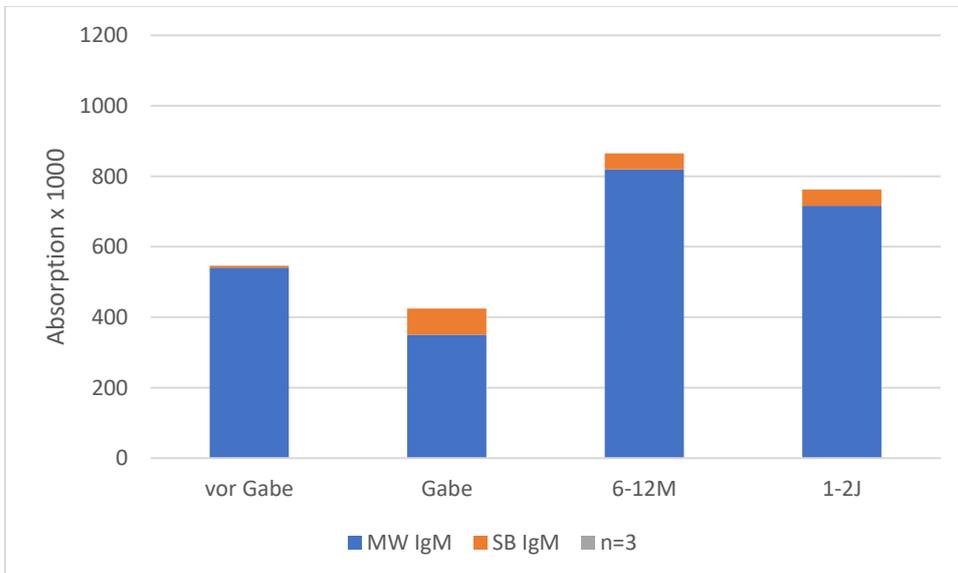


Abbildung 5.5.2.b: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM Typ bei den RA Patienten unter Kombinationstherapie mit Etanercept

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

GP Patienten zeigten stärkere Unterschiede im zeitlichen Verlauf zwischen der HAMA/HAHA von IgG- und IgM-Typ: nach der Rituximab Gabe sowie im weiteren Verlauf bis zu 2 Jahre blieben HAMA/HAHA vom IgG Typ fast

unverändert, fielen dann nach 2 Jahren ab, stiegen weiter progredient an und erreichten den Wert „vor Gabe“. Der zeitlichere Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM-Typ zeigte kleine Änderungen in Zeitfenster bis zu 4 Jahre, was sich aber danach mit einem starken Anstieg änderte. Nach einem Jahr fiel die HAMA/HAHA vom IgM-Typ wieder ab und, überholte die Höhe des Wertes „vor Gabe“ (Abb.5.5.2.c-5.5.2.d).

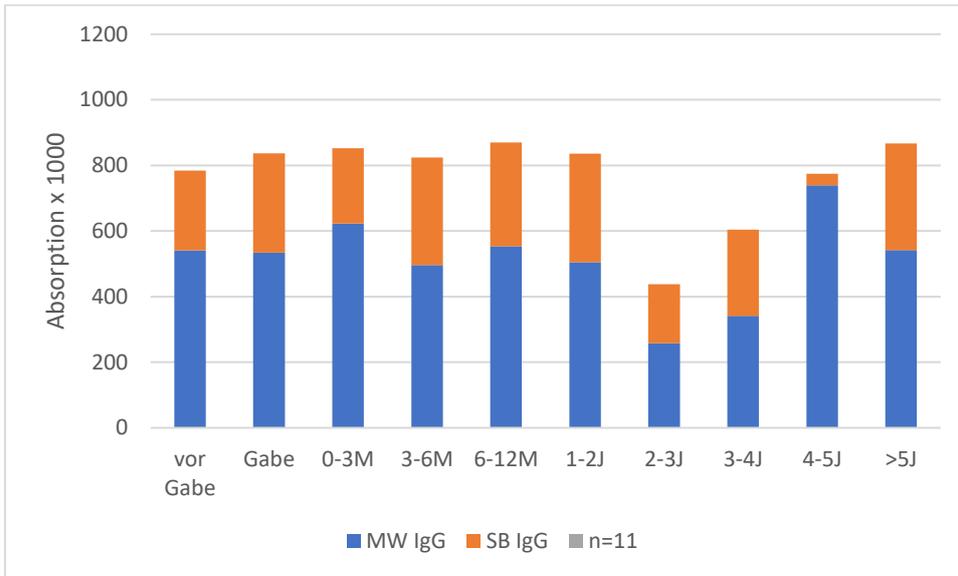


Abbildung 5.5.2.c: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG Typ bei den GP Patienten unter Kombinationstherapie mit Rituximab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

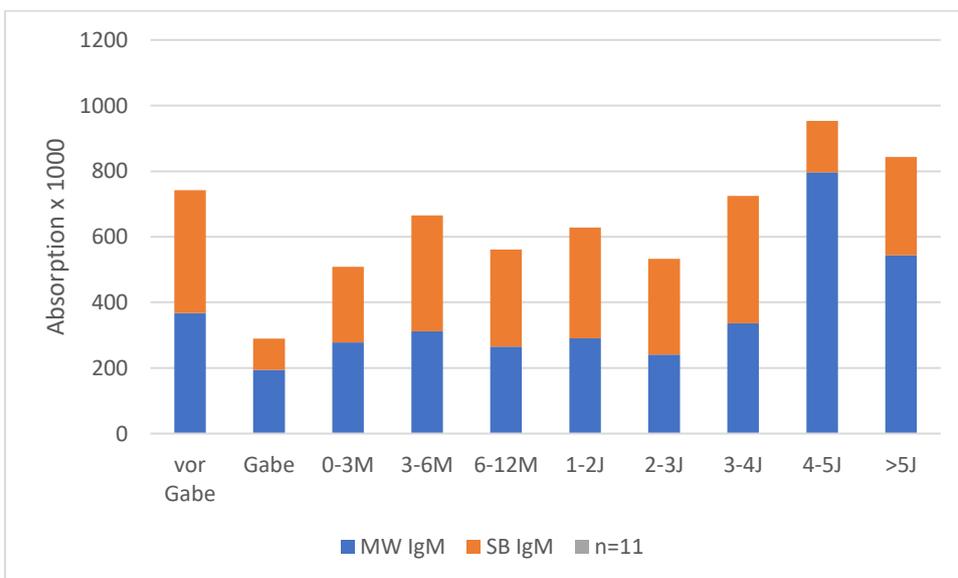


Abbildung 5.5.2.d: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM Typ bei den GP Patienten unter Kombinationstherapie mit Rituximab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

Kombinationstherapie mit Adalimumab bei den Patienten mit GP führte zu einem anderen zeitlichen Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ. So stiegen die HAMA/HAHA sowohl vom IgG- Typ als auch vom IgM-Typ direkt nach der Adalimumab Gabe an. Der weitere Verlauf zeigte sich sehr unterschiedlich: so stiegen die HAMA/HAHA vom IgG-Typ bis zu 3 Monate nach der Gabe weiter an und fielen nach weiteren 3 Monaten stark ab. Nach 1 Jahr wurde ein Anstieg der HAMA/HAHA vom IgG-Typ gemessen. Der weitere Verlauf zeigte sich mit einem Anstieg sowie mit einem Abfall und erreichte nach 5 Jahren einen Wert, der kleiner als der Wert „vor Gabe“ gemessen wurde. Die HAMA/HAHA vom IgM-Typ änderten sich im weiteren Verlauf mit mehreren Anstiegen und Abfällen und erreichte nach 5 Jahren den Wert, der kleiner als „vor Gabe“ Wert festgestellt wurde. Die Änderung von HAMA/HAHA vom IgG-Typ zeigte sich im Gegensatz zum IgM-Typ im Verlauf stärker ausgeprägt (Abb. 5.5.2.e-5.5.2.f).

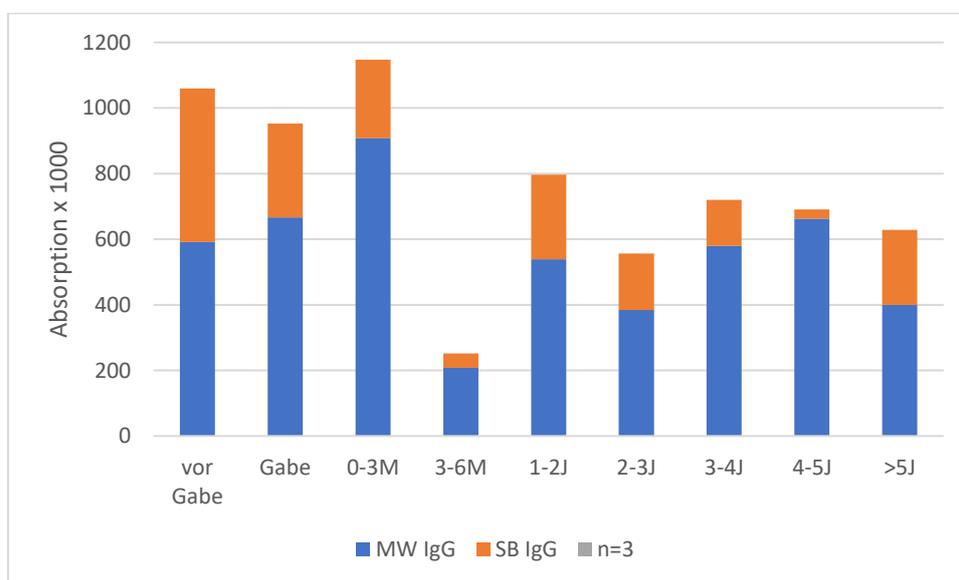


Abbildung 5.5.2.e: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA von IgG Typ bei den GP Patienten unter Kombinationstherapie mit Adalimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

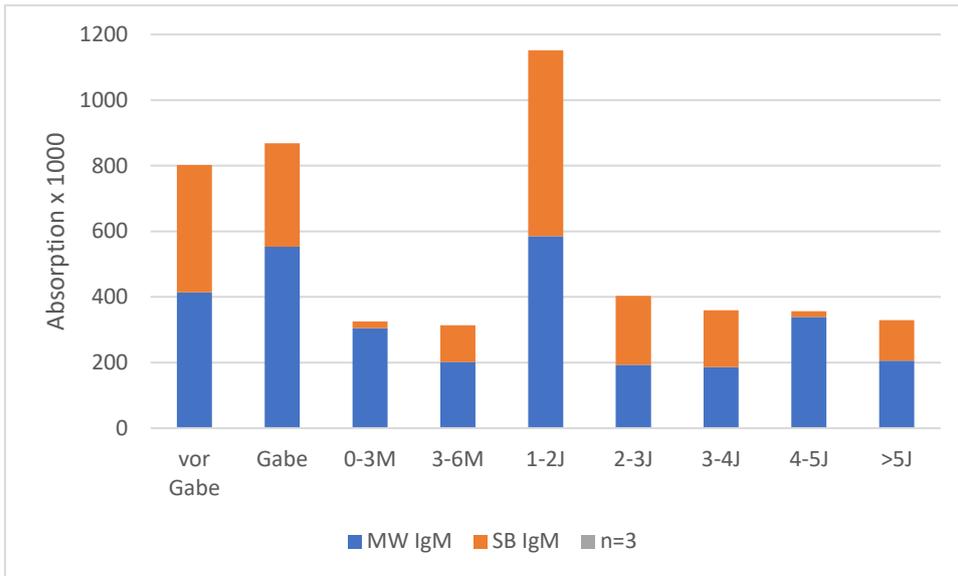


Abbildung 5.5.2.f: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA von IgM Typ bei den GP Patienten unter Kombinationstherapie mit Adalimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

Unter Kombinationstherapie mit Canakimumab zeigten Patienten mit M. Behcet einen Unterschied des Verlaufes zwischen HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ. Sowohl direkt nach der Canakimumab Gabe als auch im weiteren Verlauf wurde eine Abnahme der HAMA/HAHA vom IgG-Typ beobachtet. Die HAMA/HAHA vom IgM-Typ nahmen nach der Antikörpergabe ab, stiegen danach an und erreichten den Wert „vor Gabe“ (Abb. 5.5.2.g-5.5.2.h).

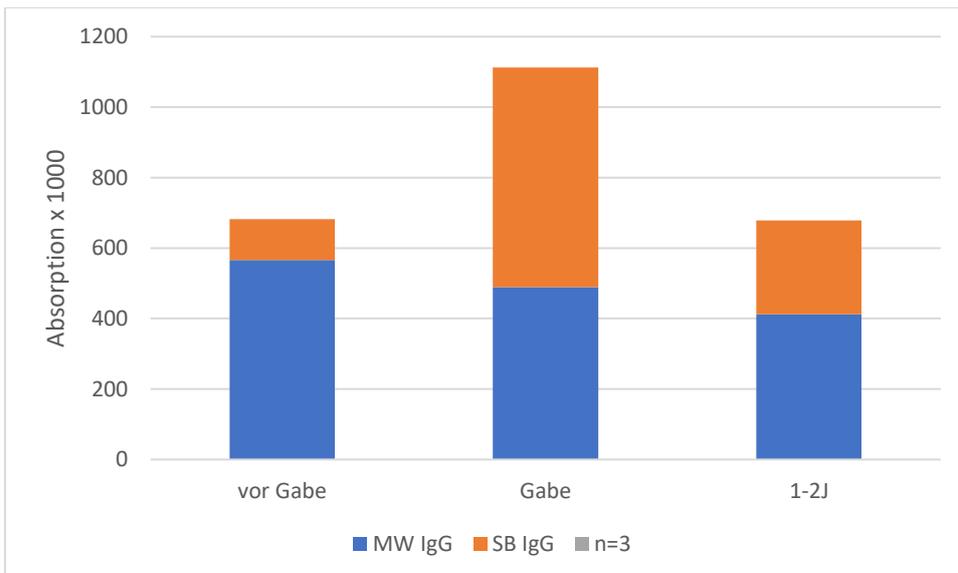


Abbildung 5.5.2.g: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG-Typ bei den M. Behcet Patienten unter Kombinationstherapie mit Canakimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

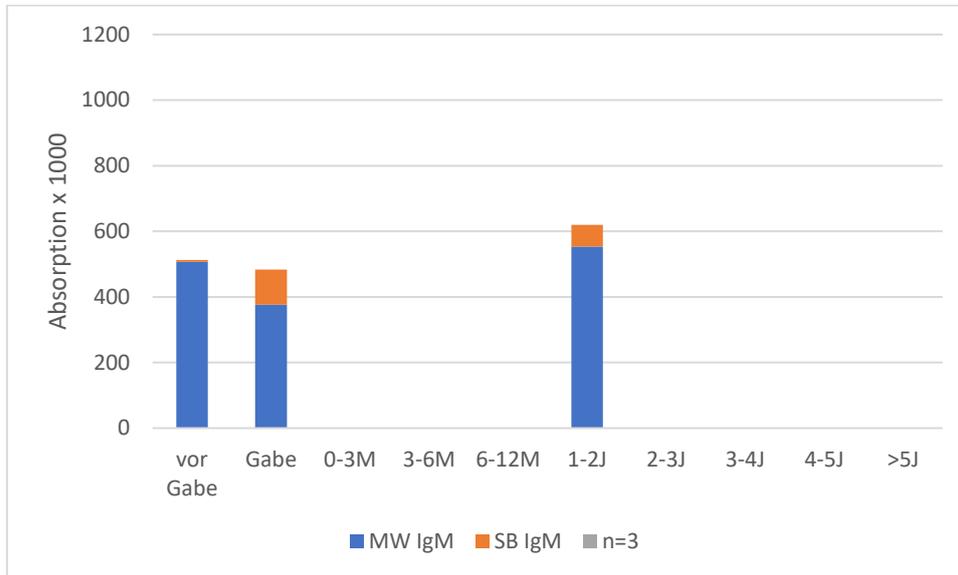


Abbildung 5.5.2.h: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA von IgM Typ bei den M. Behcet Patienten unter Kombinationstherapie mit Canakimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

Unter Kombinationstherapie mit Adalimumab zeigten Patienten mit RA einen Unterschied des Verlaufes zwischen HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ. Direkt nach der Adalimumab Gabe sowie auch im weiteren Verlauf wurde ein signifikanter Anstieg der HAMA/HAHA vom IgG-Typ beobachtet. Die HAMA/HAHA vom IgM-Typ blieben nach der Antikörpergabe fast unverändert (Abb. 5.5.2.i-5.5.2.j).

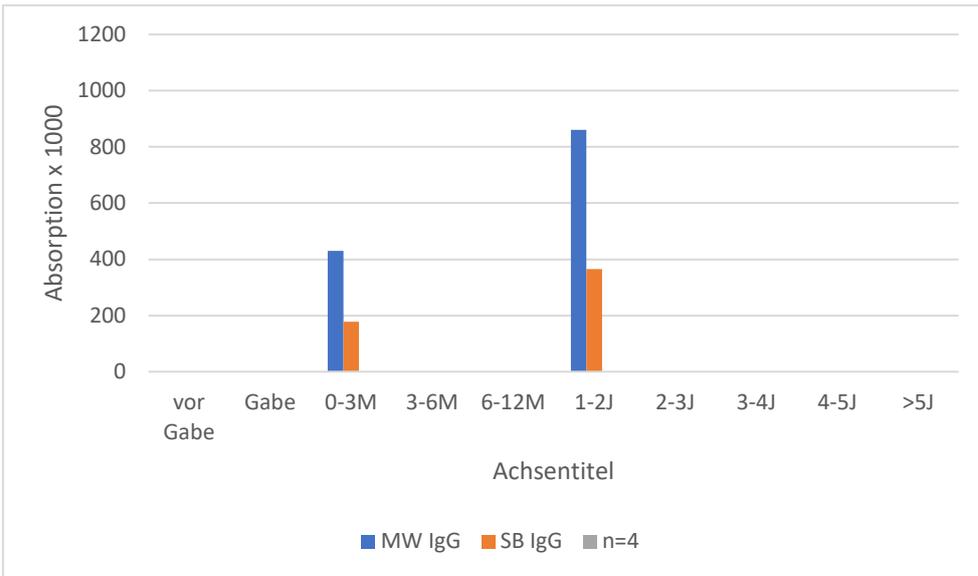


Abbildung 5.5.2.i: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA von IgG Typ bei den RA Patienten unter Kombinationstherapie mit Adalimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

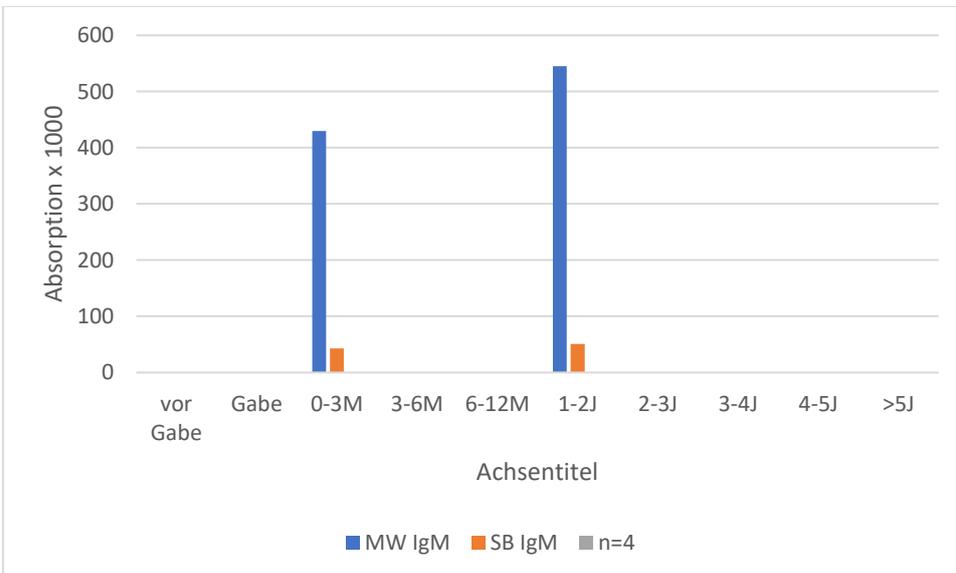


Abbildung 5.5.2.j: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA von IgM Typ bei den RA Patienten unter Kombinationstherapie mit Adalimumab

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

### 5.5.3 Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ bei den Probanden unter immunsuppressiver Therapie zu den verschiedenen Zeitpunkten

57 der 106 Patienten mit RA erhielten immunsuppressive Therapie. Unter immunsuppressiver Therapie fanden sich keine signifikanten Veränderungen der Antikörperreaktivitäten bis auf einen leichten Abfall der IgG-Reaktivität nach Beginn der Therapie (Abb. 5.5.3.a-5.5.3.b).



Abbildung 5.5.3.a: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG-Typ bei den RA Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

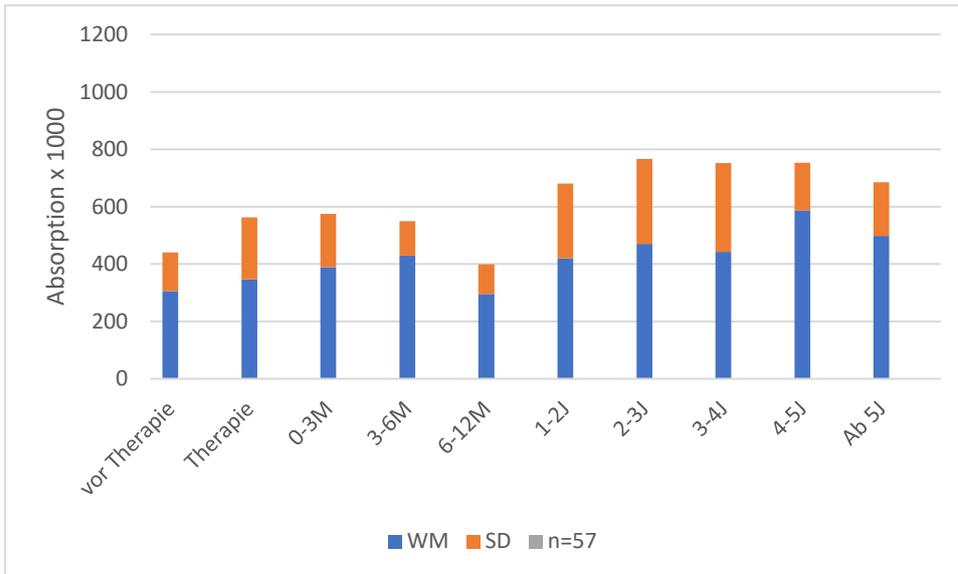


Abbildung 5.5.3.b: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM-Typ bei den RA Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

82 der 146 Patienten mit M. Behcet wurden mit immunsuppressiver Therapie behandelt. Dabei ließ sich feststellen, dass die HAMA/HAHA-Reaktivität vom IgG-Typ und IgM-Typ im Verlauf signifikant abnahm, was auch vom IgM-Typ im Verlauf kaum änderte (Abb. 5.5.3.c-5.5.3.d).

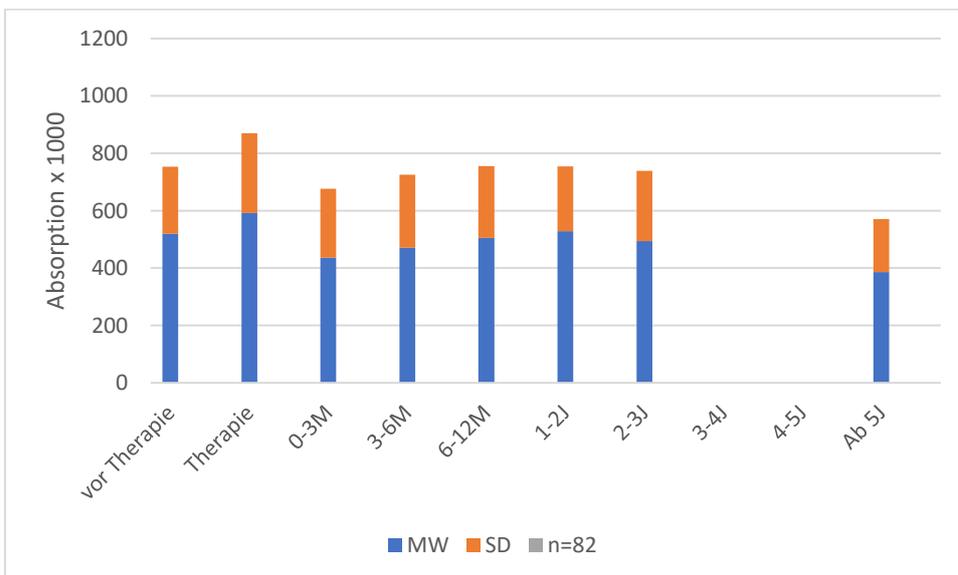


Abbildung 5.5.3.c: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG-Typ bei den M. Behcet Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

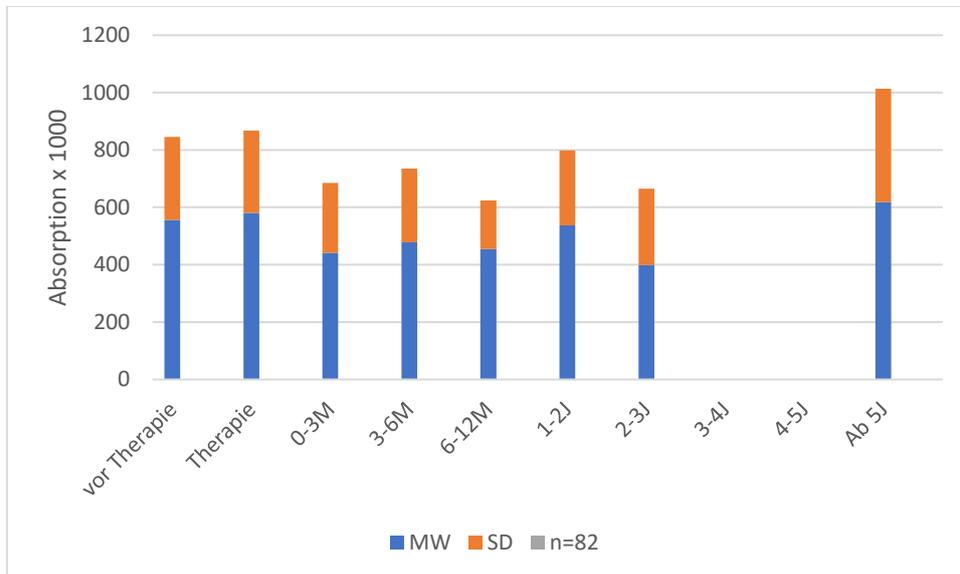


Abbildung 5.5.3.d: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM-Typ bei den M. Behçet Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

Der zeitliche Verlauf der HAMA/HAHA-Reaktivität vom IgG- und IgM-Typ bei den 3 der 18 Patienten mit GP, die immunsuppressive Therapie erhielten, änderte sich mit einer Abnahme nach der Therapieinduktion und blieb im Verlauf v.a. die HAMA/HAHA-Reaktivität vom IgM-Typ fast unverändert (Abb. 5.5.3.e-5.5.3.f).

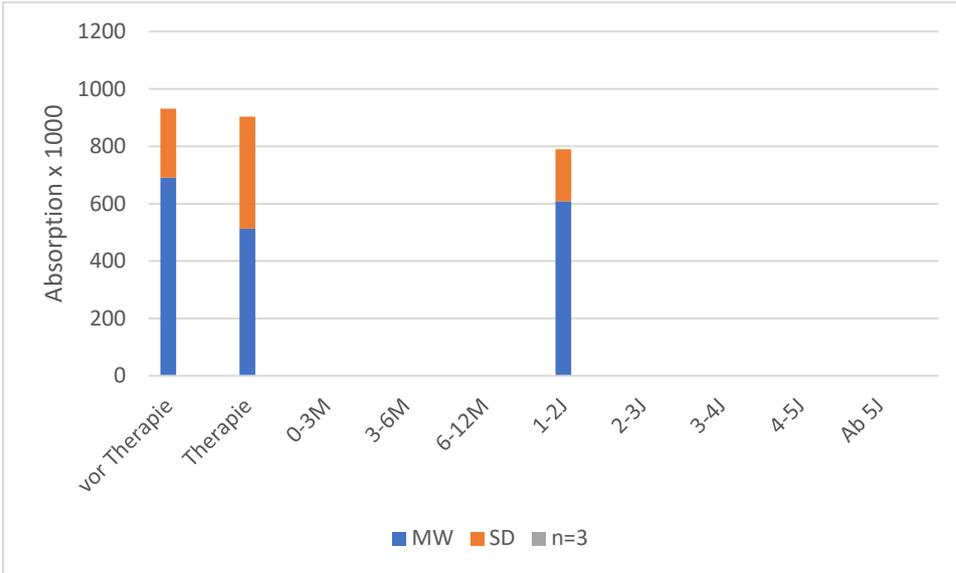


Abbildung 5.5.3.e: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgG-Typ bei den GP Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

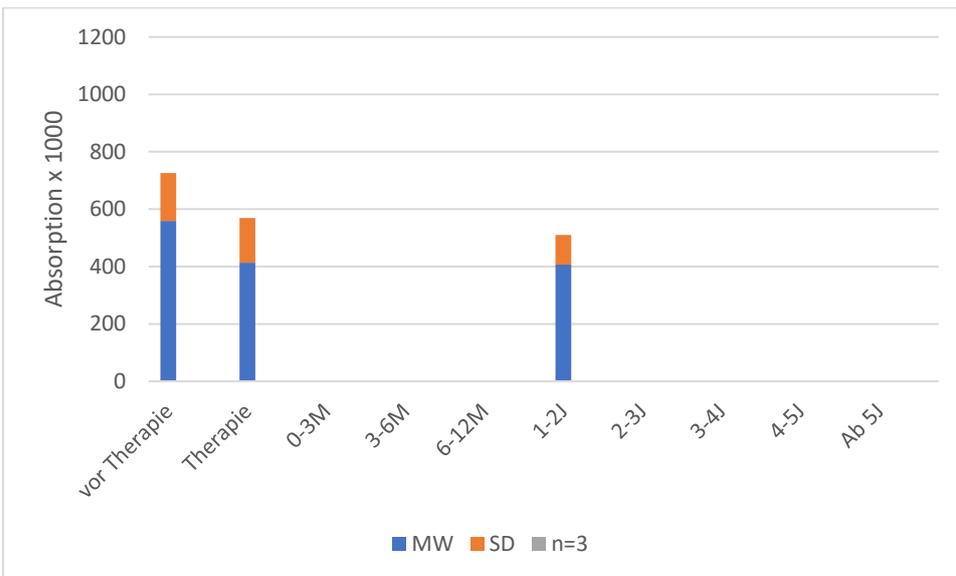


Abbildung 5.5.3.f: Zeitlicher Verlauf der HAMA/HAHA vom IgM-Typ bei den GP Patienten unter immunsuppressiver Therapie

(MW aus der Reaktivität von Antikörpern gegen Anti-Maus-Antikörpern, Rituximab, Adalimumab, Anti-FLT3- und Anti-CD19-Antikörpern)

## 6 Diskussion

### 6.1 Vor- und Nachteile der ELISA-Methode zum Antikörpernachweis

Zur Stufendiagnostik zum Autoantikörpernachweis werden heute bevorzugt ein initialer Screeningtest durch Immunfluoreszenz an Gewebsschnitten oder Zellkulturen durchgeführt, danach erfolgt die Bestätigung, Differenzierung und Quantifizierung mittels ELISA oder Immunoblots.

In meiner Arbeit wurde die ELISA Methode für den Antikörpernachweis verwendet. Die Vorteile dieser Methode sind hohe Sensitivität und Spezifität, gute Standardisierbarkeit, Nachweis einzelner Antikörperspezifitäten sowie die Möglichkeit einer exakten Quantifizierung [45].

Auch der Immunoblot-Methode wird eine gute Sensitivität und Spezifität zugeschrieben. Mit dieser Methode ist auch eine Differenzierung verschiedener Antigen determinanten möglich, aber im Gegensatz zu ELISA ist keine Quantifizierung möglich (ev. semiquantitativ).

ELISA und Immunoblot haben gemeinsam, dass sie auch als Screening-Methoden verwendet werden können. Bei beiden Methoden können falsch positive und falsch negative Ergebnisse auftreten, die eine exakte Aussage beeinflussen könnten.

Eine weitere Methode ist der Immunfluoreszenztest, der als Screening-Methode eingesetzt wird. Diese Methode hat eine gute Sensitivität und Spezifität, ist aber mit einer hohen Subjektivität behaftet, da eine Interpretation stark vom Untersucher abhängig ist [45].

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis von HAMA/HAHA Fab2-Fragmente im ELISA als Antigene verwendet. Sofern Antikörper in den Patientenseren vorhanden sind, binden diese an diese Fragmente und können dann mit Peroxidase-konjugierten Anti-Human Fc-Antikörpern sichtbar gemacht werden. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperreaktionen in therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern ist es daher wichtig, lediglich die abgespaltenen Fab-Fragmente, jedoch nicht den Fc-Teil des Antikörpers, zu verwenden [45].

## 6.2 Häufigkeit der HAMA/HAHA

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 146 Patienten mit M. Behcet, 106 Patienten mit RA, 18 Patienten mit GP sowie von 25 gesunden Probanden auf Antikörper gegen Anti-Maus-Antikörper, Rituximab, Adalimumab, FLT3 und CD19 im ELISA getestet; von diesen waren bis zu 88% positiv. Aktuell gibt es einige Arbeiten bzw. Studien die auch HAHA/HAMA nachweisen. Die meisten davon untersuchen die Häufigkeit von Anti-Adalimumab-Antikörper ohne zwischen IgG- und IgM-Antikörpern zu differenzieren. So wurden in einer europäischen retrospektiven Multikohort-Analyse [47] Seren von 366 Patienten mit RA unter Adalimumab- oder Infliximab-Therapie im ELISA untersucht; die Patienten wurden zusätzlich immunsuppressiv behandelt (Methotrexat). Die Ergebnisse zeigten, dass 46 (19%) der 240 mit Adalimumab behandelten Patienten und 37 (29%) von 126 mit Infliximab behandelten Patienten Anti-Adalimumab-Antikörper hatten. Im Vergleich dazu hatten in meiner Arbeit 3 (27%) von 11 Patienten bereits vor Therapie Anti-Adalimumab-Antikörper (Tab. 5.3.5). In einer anderen Studie, die 50 Patienten mit RA unter Adalimumab-Therapie unter Verwendung von drei unterschiedlichen Methoden (Überbrückungs-ELISA, Reporter-Gen-Assay [RGA] und Oberflächenplasmonresonanz [SPR]) untersucht hat, wurde festgestellt, dass 5 (10%) der 50 Patienten im ELISA, 4 (8%) mittels RGA und 6 (12%) mittels SPR Anti-Adalimumab-Antikörper positiv waren [49]. Ein weiteres Beispiel zeigt eine multinationale Querschnittsstudie, die Antidrug-Antikörper bei 119 RA-Patienten bestimmt hat, die mit Adalimumab, Etanercept oder Infliximab behandelt worden waren. Es stellte sich heraus, dass keiner der mit Etanercept behandelten Patienten Antikörper entwickelt hat, im Vergleich zu 19 (32%) der 52 mit Adalimumab und 4 (30%) der 13 mit Infliximab behandelten Patienten [38]. In einer Review-Arbeit von Strand et al. [61] wurde eine systematische Überprüfung durchgeführt, um die Immunogenität biologischer Wirkstoffe bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis-Arthritis, juveniler idiopathischer Arthritis, ankylosierender Spondylitis, Spondyloarthritis, Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu analysieren. Es wurde festgestellt, dass die Häufigkeit der Antidrug -Antikörper stark variierte in

Abhängigkeit von den Biologika und den Erkrankungen. Am häufigsten traten Antikörper gegen Infliximab (0-83%), Adalimumab (0-54%) und Infliximab Biosimilar CT-P13 (21-52%) auf, am seltensten Antikörper gegen Secukinumab (0-1%), Ustekinumab (1-11%), Etanercept (0-13%) und Golimumab (0-19%).

### **6.3 Longitudinaler Verlauf der HAMA/HAHA**

Es existieren nur wenige longitudinale Studien, die den Verlauf von HAHA/HAMA unter biologischer Therapie oder auch ohne spezifische Therapie untersucht haben. Eine retrospektive Europäische Studie [49] mit 366 Patienten mit RA, die alle mit immunsuppressiver Therapie (Methotrexat) und zusätzlich mit Adalimumab oder Infliximab für 18 Monaten behandelt worden waren, zeigte, dass die kumulative Häufigkeit von HAHA im Laufe der Zeit zunimmt. In den Adalimumab- bzw. Infliximab-Gruppen betrug die Inzidenz nach 3 Monaten 15,4% (5,2-20,2) bzw. 0% (0-5,9), nach 6 Monaten 17,6% (11,4-26,4) bzw. 0% (0-25,9), nach 12 Monaten 17,7% (12,6-37,5) bzw. 34,1% (11,4-46,3), 50,0% (25,9-87,5) bzw. 37,5% (25,9-77,4) und nach 18 Monaten 50,0% (25,9-87,5) bzw. 66,7% (37,7 -100). Zum Vergleich zeigte sich in meiner Arbeit ein HAMA/HAHA Anstieg nach 1-2 Jahren bei RA Probanden mit Adalimumab-Therapie auf 100% (IgG) bzw. auf 26,8% (IgM) unter Therapie. Auch bei RA Patienten, die eine Etanercept-Therapie bekommen haben, wurde ein HAMA/HAHA Anstieg festgestellt. So stiegen die HAMA vom IgG Typ auf 5,9% und vom IgM Typ auf 51,6% nach 6-12 Monaten. Im weiteren Verlauf nahm die Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG Typ auf 17,7% und von IgM Typ auf 12,6% ab.

### **6.4 Bedeutung der möglichen Bildung von HAHA/HAMA im Verlauf auf die Erkrankung/Therapie**

In meiner Arbeit sowie in mehreren anderen Studien ließ sich eine Bildung von HAHA/HAMA unter Antikörpertherapie nachweisen. Es ist aber noch weitgehend unklar, welche klinische Bedeutung diese Antikörper haben. Mirick

et al. [39] überprüften die Antworten von humanen Anti-Globulin-Antikörpern (HAGA; HAMA; HACA; HAHA) auf monoklonale Antikörper (Mab) bei Patienten mit B-Zell-Lymphom, Brustkrebs und akuter myeloischer Leukämie. Es wurde gezeigt, dass sich allergische Reaktionen aufgrund von humanen Antikörperreaktionen nach der Behandlung mit Mabs entwickeln könnten. Darunter wurden Strategien entwickelt, um Mabs zu "humanisieren" und die Immunfunktion der Patienten mit Medikamenten vorübergehend zu blockieren, um die Serokonversionsraten mit beträchtlichem Erfolg zu senken. Auf der anderen Seite wurde bei einigen Patienten, die nach Behandlung HAGA entwickelten, ein Überlebensvorteil beobachtet. Eine andere Review-Arbeit von Strand et al. [61] stellte fest, dass die Bildung von HAGA bei Patienten, die mit Immuntherapie mit biologischen und /oder biosimilären Substanzen behandelt worden waren, das Risiko eines Reaktionsverlusts erhöhen kann. Ein weiteres Beispiel, dass die HAHA/HAMA einen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg haben könnten, zeigte eine Studie von Maid et al. [38] bei RA-Patienten unter Immuntherapie: Patienten, die Antidrug-Antikörper-negativ waren, sprachen besser auf die Therapie an als Antidrug-Antikörper-positive Patienten. Dies wurde auch bestätigt in einer Studie von Ritter et al. [52] bei Patienten mit Kolonkarzinom, die mit dem monoklonalen Antikörper (Mab) A33 behandelt wurden. Durch die Induktion von HAMA musste die Therapie mit Mab A33 nach wenigen Injektionen abgebrochen werden.

## **6.5 Formen von HAMA/HAHA**

Heutzutage unterscheidet man 2 Formen von HAHA/HAMA:

- Natürliche vorkommende HAHA/HAMA
- Funktionelle HAHA/HAMA

Natürlich vorkommende HAHA/HAMA wurden bei gesunden Probanden ohne jegliche Therapie sowohl in meiner Arbeit als auch durch andere Autoren nachgewiesen. So wurden HAHA (Anti-Adalimumab-Antikörper) zwar bei

Psoriasis Patienten unter Adalimumab-Therapie gefunden, aber auch bei 5 (33%) der 15 gesunden Probanden [37].

Die zweite Form von HAHA/HAMA sind die funktionellen HAHA/HAMA, die unter Immuntherapie mit monoklonalem Antikörper (MAB) induziert werden und die Wirksamkeit der Therapie beeinflussen können. Dies zeigte z.B. eine Studie von Ritter et al. [52], in der Patienten mit Kolonkarzinom unter Therapie mit MAB A33 untersucht wurden. Mittels ELISA wurden zwei Typen von HAMA nachgewiesen: Typ 1 (bei 49% der Patienten), die früh (nach 2-wöchiger Behandlung) induziert wurden und Typ 2 (17% der Patienten), die später (länger als 2 Wochen) induziert wurden. Eine andere Studie von Maid et al. [38] zeigte Antidrug-Antikörper-Induktion unter Adalimumab und Infliximab-Therapie bei RA Patienten. In dieser Analyse zeigten Antidrug-Antikörper-negative Patienten im Vergleich zu ADA-positiven Patienten eine Tendenz zu besseren klinischen Ergebnissen.

## **6.6 Kreuzreaktivität der Antikörper**

Eine geringe Spezifität eines serologischen Tests kann beispielsweise durch eine Kreuzreaktion bedingt sein. Antikörper binden an spezifische Erkennungsstellen an Antigene, den Epitopen. Falls dieses von Antikörper erkannte Epitop oder eine sehr ähnliche Variation davon, noch an anderen Strukturen exprimiert wird, kann dieser Antikörper ebenfalls an diese zweite Struktur binden. Somit könnte ein falsch-positives Testergebnis durch vorliegen einer anderen Struktur mit einem ähnlichen Epitop wie dem des getesteten, bedingt sein. Die Kreuzreaktivität hat eine große Bedeutung in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern. So zeigte eine Arbeit von Buurgman et al. [4] eine Kreuzreaktivität zwischen HAHA (Anti-Infliximab-Antikörper) und Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern der zweiten Generation (Biosimilär CT-P13). Eine andere Arbeit führte eine Untersuchung der Seren von Patienten mit ANCA-assoziiierter Granulomatose mit Anti-Neutrophilen-Zytoplasma-Antikörpern und Polyangiitis unter Rituximab- und Adalimumab-Therapie durch. In allen Seren der Patienten konnten Antikörper gegen Rituximab nachgewiesen werden, allerdings waren

auch zu Zeitpunkten, zu denen die Patienten noch kein Adalimumab erhalten hatten, Antikörper gegen Adalimumab vorhanden, was auf eine Kreuzreaktivität zwischen beiden Substanzen hindeutete [32]. Um die Kreuzreaktionen zu vermeiden bzw. vermindern wurde einige weitere Arbeiten durchgeführt. So entwickelten Gallagher et al. [18] einen MAB MEDI-531, der weder mit Nagetieren noch mit menschlichen Primaten CD19 kreuzreagieren kann. Ein weiteres Beispiel zeigte eine Arbeit von Hillmann et al. [24]. Dort wurde eine Verbesserung der Target-Spezifität des T-Zellrezeptors durchgeführt. Obwohl die Antigenspezifität ein Merkmal der adaptiven Immunität ist, besitzen TCRs selbst nicht die hohe Spezifität von monoklonalen Antikörpern. Obwohl dies eine notwendige Funktion der T-Zellbiologie ist, stellt die resultierende Kreuzreaktivität eine bedeutende Herausforderung für die TCR-basierte therapeutische Entwicklung dar, da sie die Möglichkeit einer Erkennung außerhalb des Zielbereichs und der Immuntoxizität schafft. Versuche, die TCR-Spezifität durch Nachahmen des Antikörper-Reifungsprozesses und die Erhöhung der Affinität zu verbessern, können die Kreuzreaktivität des TCR verstärken. Es wurde gezeigt, dass sogar auf Peptide gerichtete Mutationen im TCR neue Reaktivitäten gegen Peptide einführen können, die eine Ähnlichkeit mit dem ursprünglichen Ziel aufweisen. Um dies zu vermeiden, wurde ein strukturgesteuerter Ansatz zur Steigerung der TCR-Spezifität unabhängig von der Affinität untersucht. Mit dem MART-1-spezifischen TCR-DMF5 konnte man die DMF5-Kreuzerkennung von divergenten, nicht verwandten Epitopen eliminieren.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HAMA/HAHA bei bis zu 73% der M. Behcet, bis zu 39% RA- und bis zu 83% der GP-Patienten bereits vor einer Antikörpertherapie vorkommen. Aber auch ca. 24% der gesunden Probanden weisen HAMA/HAHA auf. Patienten mit M. Behcet und GP zeigten eine signifikant höhere IgG Reaktivität gegen Anti-Maus-Antikörper sowie gegen Anti-FLT3-Antikörper als gesunde Probanden. Weitere signifikante Unterschiede in Immunoglobulin-Reaktivitäten zeigten sich zwischen den verschiedenen Patientengruppen und gesunden Probanden. Gegen Rituximab und Adalimumab in Patienten mit GP und gegen Anti-CD19-Antikörper in RA Patienten ergab sich eine signifikant erhöhte IgG-Reaktivität. Hingegen waren bei RA Patienten die IgM-Reaktivitäten gegen alle getesteten Antikörper im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant vermindert. Die Häufigkeit der HAMA/HAHA änderte sich bei verschiedenen Patienten unter unterschiedlichen Therapieformen. Am stärksten ausgeprägt war die Änderung der HAHA unter Therapie bei den M. Behcet Patienten. Sowohl unter monoklonaler, AK+IS-Therapie als auch unter IS-Therapie nahmen die HAHA vom IgG-Typ gegen Rituximab ab. Die Häufigkeit der HAHA vom IgM-Typ gegen Rituximab stieg unter IS-Therapie an. Bei den Patienten mit GP und RA zeigte sich eine minimale Änderung der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ. Außerdem zeigten die spezifischen Antikörpertherapien einen unterschiedlichen Einfluss auf die Induktion von HAMA/HAHA (Zunahme, Abnahme oder kein Effekt). Patienten mit M. Behcet zeigten die stärkste Änderung (in Form einer Abnahme) der HAHA-Reaktivität vom IgG-Typ unter Rituximab- oder Canakimumab-Therapie. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich die Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ unter den verschiedenen Therapieformen unterschiedlich. So stieg die Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgM-Typ unter IS-Therapie bei Probanden mit RA an. Bei Patienten mit M. Behcet und GP wurde kaum eine Änderung festgestellt. Eine Abnahme der Häufigkeit der HAMA/HAHA vom IgG- und IgM-Typ wurde sowohl bei Probanden mit RA unter Rituximab-Monotherapie als auch bei Probanden mit GP unter IS+ Adalimumab-Monotherapie beobachtet. Ein signifikanter Anstieg der Häufigkeit

der HAMA/HAHA vom IgG Typ im Verlauf zeigte sich bei Probanden mit RA unter Adalimumab + IS-Therapie.

Probanden mit verschiedenen Erkrankungen zeigten unterschiedliche Ausprägungen der HAMA/HAHA Reaktivität. Bei Patienten mit GP ließ sich eine erhöhte IgG-Reaktivität gegen fast alle Antikörper außer Anti-CD19-Antikörper feststellen. Die Häufigkeit der HAMA/HAHA konnte unter verschiedenen Therapieformen beeinflusst werden. Am meisten wurde dies bei den Patienten mit M. Behcet sowohl unter IS- als auch unter IS + Monoklonalen Therapie beobachtet.

## 8 Literaturverzeichnis

1. American College of Rheumatology.  
[http://www.rheumatology.org/Practice & Qualität/Clinical Support/Criteria/ACR-Endorsed Criteria](http://www.rheumatology.org/Practice%20&%20Qualität/Clinical%20Support/Criteria/ACR-Endorsed%20Criteria)
2. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008;41(2):123-32
3. Berger M, Shankar V, Vafai A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am J Med Sci.* 2002;324:14–30
4. Blank M, Barzilai O, Shoenfeld Y. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;32:111-8
5. Bogdanos DP, Smyk DS, Invernizzi Pet al. Infectome: a platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013;12:726-40
6. Buurman D, Blokzijl T, Festen E, Pham B, Faber K, Brouwer E, Dijkstra G. Quantitative comparison of the neutralizing capacity, immunogenicity and cross-reactivity of anti-TNF- $\alpha$  biologicals and an Infliximab-biosimilar. *PLoS One.* 2018;13(12):e0208922
7. Casadevall A, Pirofski LA. Antibody-mediated regulation of cellular Immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003;24:474–8
8. Ciurea A. Monoklonale Antikörper in der Behandlung von autoimmunen rheumatischen Erkrankungen. *Schweiz Med Forum.* 2008;8(10):182-186
9. Colafrancesco S, Perricone C, Priori R, Valesini G, Shoenfeld Y. Sjogren's syndrome: another facet of the autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *J Autoimmun.* 2014;51:10-6
10. Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev.* 2014;13(11):1121-5. doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.017.
11. Delong T, et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science.* 2016;351:711–714
12. DeNardo G, Bradt B, Mirick G, DeNardo S. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:309-316
13. Deuter ME, Zierhut M, Doycheva D, Kötter I. Treatment of Behcet's disease yesterday and today. Review. *Ophtalmologe.* 2012;109(6):568-74. doi: 10.1007/s00347-011-2504-9.
14. Doyle HA, Mamula MJ. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.* 2012;24:112–118

15. Dubel, S. (ed.) Handbook of Therapeutic Antibodies. Volume I: Technologies, Volume II: Emerging Developments, Volume III: Approved Therapeutics (Wiley, Weinheim, 2007)
16. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350:2572–81
17. Fridkis-Harelli M. Immunogenetic mechanism for the coexistence of organ-specific and systemic autoimmune diseases. *J Autoimmune Dis*. 2008;15:5,1
18. Gallagner S, Turman S, Yusuf I, Akhgar A, Wu Y, Roskos L, Herbst R, Wang Y. Pharmacological Profile of MEDI-551, a novel anti-CD19 antibody, in human CD19 transgenic mice. *Int Immunopharmacol*. 2016;36:205-212
19. Garner S, Khalidi N. Updates in the treatment of granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis: At a crossroad. *Review. Presse Med*. 2020;49(3):104038. doi: 10.1016/j.lpm.2020.104038.
20. Greco A, Marinelli C, Fusconi M, Macri GF, Gallo A, De Virgilio A, Zambetti G, De Vincentis M. Clinic manifestations in granulomatosis with polyangiitis. *Review. Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(2):151-9. doi: 10.1177/0394632015617063.
21. HAMA-Antwort, in: Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 2003
22. Hansel, T., Kropshofer, H., Singer, T. et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(4):325–338. doi: 10.1038/nrd3003
23. Harding, Fiona A et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*. 2010;2(3):256-65. doi:10.4161/mabs.2.3.11641
24. Hellman L, Foley K, Singh N, Alonso S, Riley T, Devlin J, Ayres C, Keller G, Zhang Y, Vander Kooi C, Nishimura M, Naker B. Improving T cell Receptor on-Target Specificity via Structure-Guided Design. 2018;1525-0016(18):30594
25. Hiroki Mitoma, Takahiko Horiuchi, Hiroshi Tsukamoto, Naoyasu Ueda. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Cytokine*. 2018;101:56-63
26. Hudson P, Souriau G: Engineered antibodies. *Review Nat Med*. 2003;9(1):129-34
27. Kivity S, Arango MT, Ehrenfeld M et al. Infection and autoimmunity in Sjogren's syndrome: a clinical study and comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;51:17-22
28. Klein R, Marx A, Ströbel P, Schalke B, Nix W, Willcox N. Autoimmune associations and autoantibody screening show focused recognition in patient subgroups with generalized myasthenia gravis. *Human Immunol*. 2013;74:1184-1193

29. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495–497
30. Kötter I. Morbus Behcet. *Dtsch Med Wochenschr*. 2017;142(20):1534-1539. doi: 10.1055/s-0043-108483.
31. Kötter I, Xenitidis T, Fierlbeck G, schanz S, Melms A, Horger M, Ernemann U, Deuter C. Behcet's disease. *Z Rheumatol*. 2012;71(8):685-96; quiz 697. doi: 10.1007/s00393-012-1012-x.
32. Latus J, Klein R, Koetter I, Schwab M, Fritz P, Kimmel M, Alscher M, Braun N. Cholestatic liver disease after rituximab and adalimumab and the possible role of cross-reacting antibodies to Fab 2 fragments. *PLoS One*. 2013;11(8):e78856
33. Lembicz M, Batura-Gabryel H, Nowicka A. Granulomatosis with polyangiitis-clinical picture and review of current treatment options. Review. *Pneumonol Alergol Pol*. 2014;82(1):61-73. doi: 105603/PiAP.2014.0010.
34. Liang B, Mamula MJ. Molecular mimicry and the role of B Lymphocytes in the processing of autoantigens. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(4):561-8
35. Lim H, Lee SH, Lee HAT, Lee JU, Son JY, Shin W, Heo YS. Structural Biology of the TNF Antagonists Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):768. doi: 10.3390/ijms19030768.
36. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today*. 2000;21:364–70
37. Lombardi G, Perego S, Sansoni V, Diane M, Banfi G, Altomare G. Anti-adalimumab antibodies in psoriasis: lack of clinical utility and laboratory evidence. *BMJ Open*. 2016;9;6(12):e011941
38. Maid P, Xavier R, Real R, Pederson R, Shen Q, Marshall L, Solano G, Borlenghi C, Hidalgo R. Incidence of Antidrug Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients From Argentina Treated With Adalimumab, Etanercept, or Infliximab in a Real-World Setting. 2018;24(4):177-182
39. Mirick G, Bradt B, DeNardo S, DeNardo G. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *QJ Nucl Med. Mol. Imaging*. 2004;48: 251-257
40. Mukherjee S, Ayanambakkam A, Ibrahim S, Schmidt S, Charkrabarty J, Khawandanah M. Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and elevated serum human anti-murine antibody (HAMA). Review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2018;11(3):187-188
41. Murphy M1, Jason-Moller L, Bruno J. Using Biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction. *Curr Protoc Protein Sci*. 2006; Chapter 19:Unit 19.14
42. Neumann E, Frommer K, Diller M, Müller-Ladner U. Rheumatoide Arthritis. Review. *Z Rheumatol*. 2018;77(9):769-775. doi: 10.1007/s00393-018-0500-z.

43. Ochsenbein AF. Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen. *Schweiz Med Forum*. 2008;8(8):140-143
44. Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*. 1987;50:819–820
45. Peipp, M. & Valerius, T. (2002) Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(4):507-511
46. Peng J, Narasimhan S, Marchesi JR, Benson A, Wong FS, Wen L. Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development. *J Autoimmun*. 2014;53:85-94
47. Quistrebert J, Hässler S, Bachelet D, Mbogning G, Musters A, Tak P, Wijbrandts C, Herenius M, Bergstra S, Akdemir G, Johannesson M, Combe B, Fautrel B, Chollet-Martin S, Gleizes A, Donnellan N, Deisenhammer F, Davidson J, Hincelin-Mery A, Dönnès P, Fogdell-Hahn A, De Vries N, Huizinga T, Abugessaisa I, Saevarsdottir S, Hacein-Bey-Abina S, Pallardy M, Broët P, Mariette X; ABIRISK Consortium. Incidence and risk factors for adalimumab and infliximab anti-drug antibodies in rheumatoid arthritis: A European retrospective multicohort analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2019;48(6):967-975. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.10.006. Epub 2018 Oct 12.
48. Rashedi L, Panigrahi S, Ezzati P, Ghavami S, Los M. Autoimmunity and apoptosis-therapeutic implications. *Curr Med Chem*. 2007;14(29):3139-51
49. Real-Fernandez F, Pregnolate F, Cimaz R, Papini A, Borghi M, Rovero P. Detection of anti-adalimumab antibodies in a RA responsive cohort of patients using three different techniques. 2019;566:133-138
50. Rindfleisen JA, Müller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. Review. *Am Fam Physician*. 2005;72(6):1037-47
51. Ring GH, Lakkis FG. Breakdown of self-tolerance and the pathogenesis of autoimmunity. *Semin Nephrol*. 1999;19(1):25-33
52. Ritter G, Cohen L, Williams G, Richards E, Old L, Welt S. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. 2001;61(18):6851-9
53. Rote Liste  
<http://www.patienteninfo-service.de/a-z-liste/h/hau-hys/herceptin.pdf> (2020)
54. Salinas GF, Braza F, Brouard S, Tak PP, Baeten D. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmune disease. *Clin Immunol*. 2013;146:34-45
55. Sanderson NS, et al. Cocapture of cognate and bystander antigens can activate autoreactive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:734–739.
56. Schneider M, Baseler G, Funke O, Heberger S, Kiltz U, Kloese P, Krüger K, Langhorst J, Mau W, Oltman R, Richter B, Seitz S, Sewerin P, Tholen R,

Weseloh G, Witthöft M, Specker C. Interdisziplinäre Leitlinie. Management der frühen rheumatoiden Arthritis. AWMF-Register Nr. 060/002, Klasse: S3. Version 2019

57. Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2006;355:704–12

58. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein G, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K. Rheumatoid arthritis. Review. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;8(4):18001. doi: 10.1038/nrdp.2018.1.

59. Steenholdt C, Svenson M, Bendtzen K, Thomsen O, Brynskov J, Ainsworth M. Acute and delayed hypersensitivity reactions to infliximab and adalimumab in a patient with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2012;6(1):108-11. doi: 10.1016/j.crohns.2011.08.001. Epub 2011 Aug 31.

60. Störk S, Kneitz C, Bröcker E-B, Hoyer C, Ertl G, Augermann CE. Adamantiades-Behcet's disease. *Clinical Review Med Klein*. 2008;103(3):146-52. doi: 10.1007/s0063-008-1021-3.

61. Strand V, Balsa A, Al-Saleh J, Barile-Fabris L, Horiuchi T, Takeuchi T, Lula S, Hawes C, Kola B, Marshall L. Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. 2017;31(4):229-316

62. Surany P. Modern treatment of rheumatoid arthritis. *Orv Hetil*. 2005;146(40):2059-65

63. Szabo N.: Untersuchungen zur Häufigkeit von Farbsehstörungen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. Diss 2008, Universität des Saarlands, 2008

[http://publikationen.sulb.uni-saarland.de/gegliederte\\_doktorarbeit\\_17.06.08.pdf](http://publikationen.sulb.uni-saarland.de/gegliederte_doktorarbeit_17.06.08.pdf) (17.06.2008)

64. Theofilopoulos, Argyrios N et al. The multiple pathways to autoimmunity. *Nature immunology*. 2017;18(7): 716-724

65. Weiner LM. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother*. 1997;29:1–9

66. Yoo EM Chintalacharavu KR, Penichett ML, Morrison SL. Myeloma expression systems. *J Immunol Methods*. 2002;261:1-20

## **9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im immunpathologischen Labor der medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein durchgeführt. Sie hatte maßgeblichen Einfluss auf die Konzeption der Arbeit und hat das Manuskript korrigiert. Die Patientendaten wurden durch Herrn PD Dr. Jörg Henes zur Verfügung gestellt. Sämtliche Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Einarbeitung erfolgte durch Frau Sandra Plankenhorn und Frau Elwira Herdt (ELISA) sowie durch Frau Maja Wilczek (Patientendatenbank). Die Herstellung der Fab2-Fragmente erfolgte durch Frau Sandra Plankenhorn. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Ich versichere das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## **10 Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Reinhild Klein für ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Besonders dankbar bin ich für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie, vor allen meiner Mama und meinem Mann für die unermüdliche Stärkung und Motivierung danken, sowie für das stets offene Ohr für meine Gedanken.