

"Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen"

Kerstin Brettschneider

Hämophilie A ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit, die aufgrund von Mutationen innerhalb des Gens von Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) zum funktionellen Defekt oder zum Fehlen des körpereigenen FVIII führt. FVIII zirkuliert als Heterodimer und besteht aus einer schweren Kette mit der Domänenstruktur A1-A2-B und einer leichten Kette mit der Domänenstruktur A3-C1-C2. Bei Patienten unter Prophylaxe wird durch regelmäßige Substitution mit rekombinanten oder aus Plasma gewonnenen FVIII-Präparaten die Hämostase wiederhergestellt. Allerdings entwickeln hierbei etwa 30% der Patienten mit einer schweren Hämophilie eine FVIII-spezifische Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern (Inhibitoren). Die sogenannte Immuntoleranz-Therapie (engl. *immune tolerance induction therapy*, ITI) ist bisher die einzige etablierte Therapie, die zu einer dauerhaften Eradikation der FVIII-Inhibitoren und Induktion von Toleranz gegenüber FVIII führen kann. Die Therapie beruht auf einer meist täglichen Gabe hoher FVIII-Dosen, welche sich, je nach Behandlungsdauer, über Wochen bis hin zu Jahren erstrecken kann. Bei etwa 30% der Patienten ist diese Therapie nicht erfolgreich. Für solche Patienten besteht die Gefahr lebensbedrohlicher, unkontrollierbarer Blutungen und erheblicher Gelenkschäden.

Die spezifische Ansteuerung des Membran-gebundenen Immunglobulin G (mIg) des B-Zellrezeptors (BZR) mithilfe von Immuntoxinen ist eine mögliche Option zur selektiven Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen und somit zur Eradikation von FVIII-Inhibitoren. Solche Immuntoxine bestehen aus einer zellbindenden und einer zytotoxischen Domäne, welche nach Internalisierung zur Apoptose der Zielzelle führen soll. Da FVIII aufgrund der Größe als zellbindende Domäne ungeeignet ist, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung und Evaluierung alternativer Immuntoxine zur selektiven Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen. Die FVIII-spezifische Immunantwort ist zwar polyklonal, jedoch vor allem gegen A2- und die C2-Domäne gerichtet. Aus diesem Grund wurden die humane A2- und C2-Domäne (hA2, hC2) als zellbindende Domäne verwendet und jeweils genetisch an eine verkürzte Version des Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* fusioniert, bei welcher die natürliche zellbindende Domäne entfernt wurde. Die rekombinanten Proteine wurden bakteriell produziert und im Anschluss an die Aufreinigung biochemisch charakterisiert. Während das bakterielle Expressionssystem für hA2-ETA nicht geeignet war, konnte hC2-ETA neben weiteren Kontrollproteinen mit korrekter Konformation der hC2-Domäne hergestellt und aufgereinigt werden.

Die Fähigkeit zur selektiven Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen wurde im weiteren Verlauf sowohl *in vitro* mithilfe einer hC2-spezifischen Hybridomazelllinie als auch *ex vivo* und *in vivo* mithilfe von Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII-*knockout* Mäusen untersucht.

Durch Inkubation der hC2-spezifischen Hybridomazelllinie mit hC2-ETA konnten ca. 38 % der Zellen eliminiert werden. Weitere Untersuchungen der Zelllinie ergaben, dass diese keinen vollständigen funktionalen B-Zellrezeptor auf der Oberfläche exprimiert, welcher für die Bindung und die korrekte Internalisierung des Immuntoxins notwendig ist. Aufgrund dessen eignet sich diese Zelllinie nicht als Modell für eine genauere Analyse der *in vitro* Eliminierungseffizienz von hC2-ETA.

Weitere Analysen mithilfe von Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII-*knockout* Mäusen haben jedoch gezeigt, dass durch *ex vivo* Inkubation der Splenozyten mit hC2-ETA, alle hC2-spezifischen B-Zellen vollständig, selektiv und konzentrationsabhängig eliminiert werden konnten. Auch die mehrfache Applikation von hC2-ETA in FVIII-immunisierten FVIII-*knockout* Mäusen führte bei der Hälfte der Tiere zur vollständigen Eliminierung aller hC2-spezifischen B-Zellen. Eine Reduktion des hC2-spezifischen Antikörpersignals konnte nach Gabe von hC2-ETA in allen behandelten Tieren beobachtet werden. Die unvollständige Eliminierung in der Hälfte der Tiere ist vermutlich auf die Präsenz hC2-spezifischer Antikörper zurückzuführen, die einen Teil des applizierten Immuntoxins neutralisiert haben, sodass nicht alle hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen erreicht und eliminiert werden konnten. Um die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA weiter zu erhöhen, müsste das Behandlungsprotokoll geändert werden. Sowohl eine Verlängerung des Behandlungszeitraums als auch eine kombinierte Therapie aus FVIII und hC2-ETA sollte zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit des Toxins und dadurch zu einer gesteigerten Eliminierungseffizienz führen.

Die Ausweitung des hier vorgestellten Ansatzes auf weitere FVIII-Domänen ist generell möglich, jedoch muss hierzu ein alternatives Expressionssystem aufgrund des eukaryotischen Ursprungs von FVIII in Betracht gezogen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen dennoch, dass FVIII-Domänen-Immuntoxine ein wirkungsvolles Mittel sind, um FVIII-spezifische B-Zellen selektiv zu eliminieren. Die Anpassung der Gabe von FVIII-Domänen-Immuntoxinen an die individuelle Immunantwort des Patienten könnte das Auftreten von Nebenwirkungen minimieren. Außerdem könnte eine kombinierte Therapie aus ITI und FVIII-Domänen-Immuntoxinen die Zeit bis zur Induktion von Toleranz verkürzen und die Chancen für den generellen Therapieerfolg erhöhen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf internationalen Konferenzen (ASH 2016, GTH 2018) präsentiert. Weiterhin ist ein Teil der Ergebnisse in Manuskriptform zur Publikation im *Journal of Thrombosis and Hemostasis* eingereicht (eingereicht am 12. Februar 2018).