

Wirksamkeitsprüfung von Anti-Lymphozytenseren: Entwicklung von *in vitro* Methoden als Ersatz des Affenhaut-Transplantationstests

Christoph Conrad, Dieter Kabelitz, Gabriele Schöffner
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

Zusammenfassung

Anti-Lymphozytenseren (ALS) sind polyklonale Seren aus dem Kaninchen oder dem Pferd. Sie werden durch Immunisierung der Tiere mit humanen Thymozyten oder einer etablierten humanen T-Zelllinie hergestellt. Der Nachweis einer immun-suppressiven Wirkung wird von jeder Charge in vitro an Primaten nach allogener Hauttransplantation überprüft. Als in vitro Methoden zur Bewertung der Chargen stehen zur Zeit ein Zytotoxizitätstest und ein E-Rosetten-Hemmtest zur Verfügung, die jeweils am Mikroskop durch Auszählen von toten Zellen bzw. gebildeter Rosetten ausgewertet werden. Neben dem Tierschutzaspekt sind die geringe statistische Aussagekraft, die Subjektivität der Auswertung und die schlechte Validierbarkeit der genannten Methoden zu beachten. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welche Auskunft man mit den genannten Methoden über die biologische Wirksamkeit der Seren erhält. Ziel dieses Projektes ist es, im Zuge einer besseren biologischen Charakterisierung neue in vitro Testmethoden zu validieren und den Tierversuch abzulösen.

Mittels Kompetition mit monoklonalen Antikörpern konnte eine Reihe von Spezifitäten identifiziert werden. Dabei handelt es sich sowohl um T-Lymphozyten spezifische Antikörper wie CD2, CD3, CD5 und CD7, aber auch um andere Spezifitäten wie CD16, für Makrophagen NK-Zellen und Granulozyten und CD19 für B-Zellen.

Eine Variation des Zytotoxizitätstests, bei dem tote Zellen nach Einbau von Propidiumjodid (PI) am Durchflußzytometer ausgewertet werden können, eignet sich zum Nachweis von komplement-abhängiger und -unabhängiger Zytolyse. Auch DNA-Fragmentierung, als Nachweis des programmierten Zelltods, läßt sich an verschiedenen Zellsystemen darstellen. Mittels Gelelektrophorese nach Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP (Kinaseassay) ist ein spezifisches Bandenmuster zu erkennen. Hiermit ließe sich möglicherweise die Homogenität verschiedener Chargen produktspezifisch überprüfen.

Summary: Potency testing of anti-lymphocyte Globulins: In vitro alternatives for the monkey skin-graft assay
Antilymphocyte globulins (ALG) are immunosuppressive agents of animal origin currently used in clinical transplantation medicine and for the treatment of severe aplastic anemia. The potency of each batch is tested in vivo using primates as hosts for allogeneic skin transplantation. The test is done with a maximum of three animals, one as a control and two after the treatment with ALG. The two in vitro methods in use are a cytotoxic assay and the rosette inhibition assay. These methods are evaluated with the microscope. Besides welfare aspects these methods require a lot of experience, are subjective, difficult to validate and the information about the biological potency of the sera is questionable.

The aim of our study is a better biological characterisation as a prerequisite to subsequently define an in vitro alternative for the potency test in monkeys.

Using a competition assay with monoclonal antibodies we can identify several specificities directed against functional molecules on T cells (e.g., CD2, CD3, CD5, CD28), B Cells (CD19), macrophages and natural killer cells (CD16) and nonlineage specificities such as CD18, CD25, CD95. This method could describe a part of the biological potency and control homogeneity of batches. The cytotoxic capacity of ALG either with or without complement as well as DNA-fragmentation characteristic for apoptosis can be analysed by flowcytometry using propidiumiodide- (PI) incorporation. Immunoprecipitation of cell-lysate with ALG's and subsequent incubation with radioactive ATP (kinase-assay) shows specific bands which seem to be identical between different batches of one product.

Keywords: transplantation, immunosuppression, anti-lymphocyte globulins (ALG), potency testing, monkey skin-graft assay, cytotoxicity

1 Einleitung

Anti-Lymphozytenseren (ALS) werden seit den 70er Jahren als Immunsuppressi-

va zur Prävention oder Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen eingesetzt (Thomas et al., 1977; Touraine et al., 1981; Dreikorn et

al., 1985). Zur Herstellung der auf dem deutschen Markt erhältlichen ALS werden Kaninchen oder Pferde mit Thymozyten oder einer etablierten T-Zelllinie immuni-

sirt. Die aus den Tieren gewonnenen Hyperimmunseren enthalten nach Aufreinigung überwiegend monomeres gamma Immunglobulin, dessen immunsuppressive Wirkung zur Prophylaxe oder Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen bei der Transplantation von Nieren, Herz, Leber und Pankreas eingesetzt wird (Johnson et al., 1989; Kormos et al., 1990). Einzelne Produkte finden darüber hinaus Anwendung bei Knochenmarktransplantationen sowie der aplastischen Anämie (Marsh et al., 1987; Platanius et al., 1987; Teramura et al., 1996).

Für die Überprüfung der Wirksamkeit von ALS stehen zur Zeit drei Methoden zur Verfügung, für die bis heute noch keine einheitliche Vorschrift bzw. keine Arzneibuchmonographie existiert. Es handelt sich hierbei um den Affenhaut-Transplantationstest als *in vivo* Methode, sowie um einen Zytotoxizitätstest und den Rosetten-Inhibitionstest als *in vitro* Methoden (Bach et al., 1969; Balner et al., 1968; Balner et al., 1969). Der Affenhaut-Transplantationstest wird mit maximal drei Tieren durchgeführt, zwei Versuchstieren und einem Kontrolltier, wobei die Verlängerung der Transplantatakzeptanz der Versuchstiere gegenüber dem Kontrolltier als Maß für die biologische Wirksamkeit der Seren gewertet wird. Die Auswertung der beiden *in vitro* Methoden erfolgt am Mikroskop und verlangt - wie auch der Affenhaut-Transplantationstest - sehr viel Geschick und Erfahrung des Experimentators. Alle drei Methoden sind statistisch schwer zu bewerten; zudem ist die mit diesen Methoden gegebene Aussagekraft über die biologische Wirksamkeit der Seren nur sehr gering.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Zellsysteme sind Subklone der humanen T-Zelllinie Jurkat und mittels Ficoll-Hypaque (Seromed, Biochrom KG, Berlin) Gradientenzentrifugation isolierte periphere Blutlymphozyten.

2.1 Immunfluoreszenz

Für die sekundäre Immunmarkierung von ALS wurde ein FITC-konjugierter Schafanti-Kaninchen/Pferd Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet. Nach Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von ALS wird die Fluoreszenzintensität oder die Anzahl positiv markierter

Zellen mittels Durchflußzytometer (FAC-Scan, Becton-Dickinson) ausgewertet.

Für die kompetitive Immunfluoreszenz haben wir primär fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper (mAk) von Becton-Dickinson verwendet. Nach Inkubation der Zellen mit einer konstanten Konzentration eines mAKs wurden zur Kompetition der Antikörper-Antigen-Bindung steigende Konzentrationen der ALS dazugegeben. Die so veränderte Fluoreszenzintensität kann am Durchflußzytometer gemessen werden.

2.2 Zytotoxizität

Für die komplement-abhängige Zytotoxizität wurden PBMZ mit steigender Konzentration von ALS zusammen mit einer konstanten nicht toxischen Konzentration von Kaninchen-Komplement (Chiron-Behring GmbH & Co, Marburg) für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Der Anteil toter Zellen wurde mittels positivem Propidiumjodideinbau am Durchflußzytometer ausgewertet. Der zytotoxische Effekt von ALS ohne Komplement wurde an PBMC sowie an verschiedenen Jurkat-Subklonen in einer Kinetik mit den Zeitpunkten 30 Minuten, 6 Stunden und 20-22 Stunden ermittelt. DNA-Fragmentierung als Nachweis von Apoptose wurde mittels PI in hypotoner Lösung ebenfalls am Durchflußzytometer gemessen.

2.3 Proliferation

Die Mitogenität von ALS wurde an frisch isolierten peripheren Blutlymphozyten über einen Konzentrationsbereich der Seren von 0.01 bis 1000 µg/ml getestet. Ei-

nen Einfluß der Seren auf die gemischte Lymphozytenkultur wurde nach allogener Stimulation von PBMZ mit EBV-transformierten humanen B-Lymphozyten untersucht. Die Versuchsansätze erfolgten in 96er Mikrotiterplatten mit Rundboden und 10% humanes bzw. bovinus Serum enthaltendem Medium. Die Messung der Proliferation erfolgt nach Einbau von ³H-Thymidine an einem Beta-Zählgerät (Berthold, Wildbad, BRD).

2.4 Kinase assay

Individuelle ALS wurden zur Präzipitation von Zellysat aus Jurkat-Zelllinien oder PHA-Blasten an Protein A Sepharosepartikel gebunden, das Präzipitat anschließend mit radioaktiv markiertem ATP (γ -ATP) inkubiert und mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. In der Radiographie werden die spezifisch radioaktiv markierten Proteine sichtbar.

3 Ergebnisse und Diskussion

In der Klinik wertet man den Rückgang der Lymphozytenzahl im peripheren Blut als zuverlässigsten Parameter für die immunsuppressive Wirkung der Seren (Albert et al., 1982; Grosse-Wilde et al., 1981; Kaden et al., 1992). Eine Voraussetzung hierfür ist die spezifische Bindung an humane Lymphozyten, die sehr einfach und schnell durch die indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden kann. Ausgehend von dieser Bindung sind eine Reihe von Wirkungen denkbar, die sich stark reduziert in drei prinzipielle Mechanismen einteilen lassen: Fc-abhängige Zytotoxi-

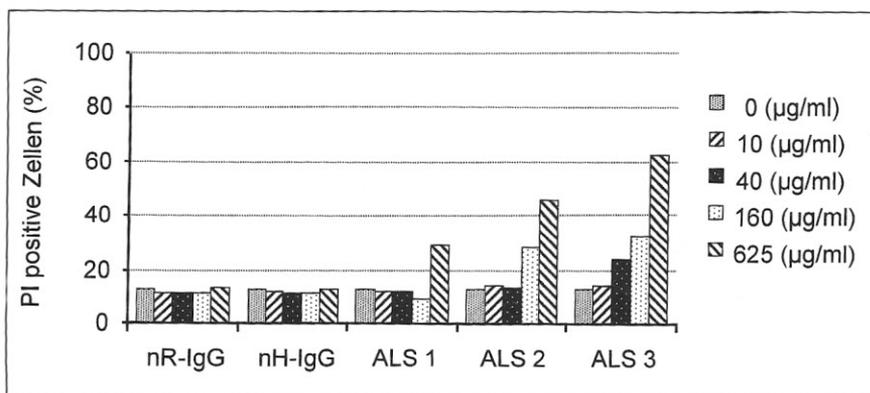


Abbildung 1: Zytotoxischer Effekt auf PBMZ
Zytotoxischer Effekt von drei verschiedenen Anti-Lymphozytenseren (ALS 1 bis ALS 3) und normalem Kaninchen- (nR-IgG) sowie normalem Pferde- (nH-IgG) Immunglobulin auf periphere blutmononukleäre Zellen (PBMZ). Anzahl der toten Zellen sind in Prozent Propidiumjodid- (PI) positiven Zellen dargestellt.

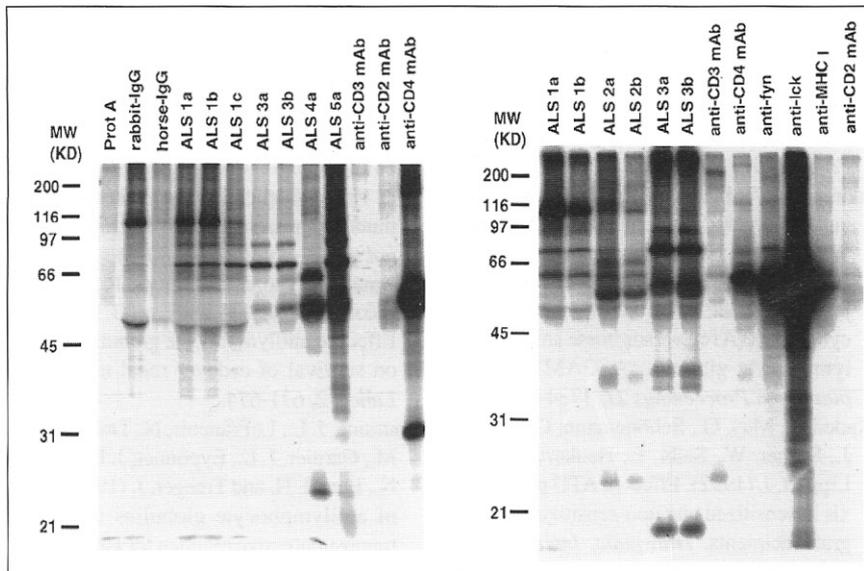


Abbildung 2: Kinaseassay
 Proteine aus dem Zellysate von PHA-Blasten wurden mit den angegebenen Seren (1-3 bezeichnet die verschiedenen Produkte, a-c je unterschiedliche Chargen) und Antikörpern zur Kontrolle präzipitiert und mit radioaktivem ATP inkubiert; anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

zität, Aktivierung und induzierter Zelltod. Hierbei werden die komplexen assoziierten Mechanismen, wie Zytokinproduktion und Regulation von zellulären Oberflächenmolekülen sowie die zum Teil daraus resultierenden Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen nicht mit eingeschlossen (Bonney-Bérard und Revillard, 1996).

Eine sehr viel spezifischere Aussage als die bloße Bindung an humane Lymphozyten oder die Inhibition der Rosettenbildung, die ein indirekter Nachweis von anti-CD2 Antikörpern darstellt, läßt sich mit der kompetitiven Immunfluoreszenz machen. Erwartungsgemäß lassen sich Spezifitäten gegen T-Zellen, aber auch gegen B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und Granulozyten, sowie Aktivierungsmarker und den Apoptose induzierenden Fas-Rezeptor (CD95) in verschiedenen ALS nachweisen: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD25, CD28, CD45, CD57, CD95 und HLA-DR.

Die Fc-abhängige Zytotoxizität wird über das Komplementsystem, zytotoxische Zellen oder Makrophagen vermittelt, wobei ein großer Anteil der von ALS vermittelten Zytotoxizität vermutlich komplement-abhängig ist. Unter Verwendung von Kaninchen-Komplement zeigen die Seren eine deutliche Zytotoxizität. In ei-

nem Konzentrationsbereich von 10 bis 80 µg/ml und einer Inkubation von 30 Minuten induzieren alle ALS über 90% Zelltod. Die zytotoxische Potenz der einzelnen Seren ist spenderabhängig, und es muß berücksichtigt werden, daß humanes Komplement eine vergleichsweise schwächere Interaktion mit Kaninchen- bzw. Pferde-Seren zeigt.

Neben den Fc-abhängigen zytotoxischen Mechanismen können ALS Zelltod ohne Beteiligung von Komplement auslösen (Abb. 1). PBMZ zeigen nach einer Inkubation von 20 Stunden in einem Konzentrationsbereich von 160 bis 625 µg/ml einen erhöhten Anteil an toten Zellen (25-60%) im Vergleich zu Kontrollen, wo der Anteil an toten Zellen bei 16-18% liegt. Es ist zu beachten, daß bei Patienten, die mit ALS behandelt wurden, Serumkonzentrationen von bis zu 300 µg/ml vorkommen (Bunn et al., 1996). Untersuchungen zum Nachweis von Apoptose an frisch isolierten PBMZ zeigen, daß keine DNA-Fragmentierung durch ALS induziert werden kann; T-Zell-Blasten und verschiedene Subklone der Jurkat Zelllinie, die sensitiv bzw. resistent gegenüber einer Fas-induzierten Apoptose sind, zeigen eine Induktion der DNA-Fragmentierung nach einer Inkubation von 20 Stunden mit ALS (Bonney-Bérard et al., 1994; Genestier et al., 1998).

Ein immunologisches Modell für die Transplantation stellt die gemischte Lymphozytenkultur dar. Wir haben den inhibitorischen Effekt von ALS auf die Proliferation der gemischten Lymphozytenkultur über einen Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1000 µg/ml untersucht, wobei eine Inhibition nur bei einer Konzentration der Seren von 1000 µg/ml zu sehen war. Ein Vergleich mit dem zytotoxischen Potential der Seren legt nahe, daß es sich hier im wesentlichen um einen toxischen und nicht um einen spezifisch inhibitorischen Effekt handelt. Eine Konzentration der Seren von 100 µg/ml zeigt demgegenüber einen mitogenen Effekt, der sowohl in der gemischten Lymphozytenkultur als auch in separaten Proliferationsassays zu sehen ist und in der Größenordnung mit Standardmitogenen (PHA) verglichen werden kann. Eine Aktivierung der T-Zellen führt zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel CD11a, über die eine verstärkte Adhäsion an das Endothel der Blutgefäße vermittelt wird. Es ist denkbar, daß dieser Effekt einen Beitrag zur starken Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut leistet, wodurch die Bedeutung der komplement-abhängigen Zytotoxizität als eine Ursache für die immunsuppressive Wirkung geringer bewertet werden müßte.

Die komplexe Wirkung von ALS vollständig zu beschreiben, wird in allen Einzelheiten nicht möglich sein. Ein Ansatz, um sehr sensitiv die Chargenhomogenität zu überprüfen, wäre die Präzipitation von Zellysate mit ALS; anschließende Inkubation des Präzipitats mit radioaktiv markiertem ATP läßt ein spezifisches Bandenmuster erkennen (Abb. 2). Weitere Möglichkeiten, die Spezifität der Präzipitate zu untersuchen, sind Westernblot Analysen zum Nachweis einzelner bekannter Proteine oder Färben der Blots mit den individuellen ALS, welche zur Präzipitation verwendet wurden, um ein produktspezifisches Bandenmuster darzustellen.

Literatur

- Albert, F. W. (1982). Antilymphocyte globulin treatment of acute rejection crises after allogenic kidney transplantation. *Krankenhaushausarzt* 5, 675-681.
- Bach, J.-F., Dardenne, M., Dormont, J. and Antoine, B. (1969). A new *in vitro* test evaluating anti-lymphocyte serum potency.

- Transplantation Proceedings* 1, 403-407
- Balner, H., Eysvoogel, V. P. and Cleton, F. J. (1968). Testing of anti-human lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Lancet* 1, 19-22.
- Balner, H., Dersjant, H. and van Bekkum, D. W. (1969). Testing of antihuman lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Transplantation* 8, 281-290.
- Bonnefoy-Berard, N., Genestier, L., Flacher, M., Rouault, J. P., Lizard, G., Mutin, M. and Revillard, J. P. (1994). Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 83, 1051-1059.
- Bonnefoy-Berard, N. and Revillard, J. P. (1996). Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. [Review] [52 refs]. *Journal of Heart & Lung Transplantation* 15, 435-442.
- Bunn, D., Lea, C. K., Bevan, D. J., Higgins, R. M. and Hendry, B. M. (1996). The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man. *Clinical Nephrology* 45, 29-32.
- Dreikorn, K., Horsch, R., Rohl, L., Rossler, W. and Olschewski, M. (1985). A randomized trial with different immunosuppressive regimens after renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 17, 2663-2665.
- Genestier, L., Fournel, S., Flacher, M., Assosou, O., Revillard, J. P. and Bonnefoy-Berard, N. (1998). Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91, 2360-2368.
- Grosse-Wilde, H., Jakubowski, H. D., Eigler, W. and Kuwert, F. K. (1981). *In vitro* immunounresponsiveness in recipients of cadaveric renal allografts during ATG therapy. *Proc. EDTA* 18, 481-485.
- Johnson, K., Niblack, G., Richie, R., MacDonnell, R., Nylander, W., Walker, P., Sterling, W., Ross, G., Humphries, A. and Peterson, D. (1989). Multicenter comparison of rejection reversal: rabbit anti-human lymphocyte serum (ATS) versus horse anti-human lymphocyte globulin (ATGAM). *Transplantation Proceedings* 21, 1734-1735.
- Kaden, J., May, G., Schönemann, C., Groth, J., Seeger, W., Seibt, F., Henkert, M. and Lippert, J. (1992). Effect of ATG prophylaxis in sensitized and non-sensitized kidney graft recipients. *Transplant. International* 5, 75-78.
- Kormos, R. L., Armitage, J. M., Dummer, J. S., Miyamoto, Y., Griffith, B. P. and Hardesty, R. L. (1990). Optimal perioperative immunosuppression in cardiac transplantation using rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 49, 306-311.
- Marsh, J. C. W., Hows, J. M., Bryett, K. A., Al-Hashimi, S., Fairhead, S. M. and Gordon-Smith, E. C. (1987). Survival after antilymphocyte globulin therapy for aplastic anemia depends on disease severity. *Blood* 70, 1046-1052.
- Platanias, L., Gascon, P., Bielory, L., Griffith, P., Nienhuis, A. and Young, N. (1987). Lymphocyte phenotype and lymphokines following anti-thymocyte globulin therapy in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* 66, 437
- Teramura, M., Kobayashi, S., Iwabe, K., Yoshinaga, K. and Mizoguchi, H. (1997). Mechanism of action of antithymocyte globulin in the treatment of aplastic anaemia: *in vitro* evidence for the presence of immunosuppressive mechanism. *British Journal of Haematology* 96, 80-84.
- Thomas, F., Thomas, J., Flora, R., Mendez-Picon, G., Peace, K. and Lee, H. M. (1977). Effect of antilymphocyte globulin potency on survival of cadaver renal transplants. *Lancet* 2, 671-674.
- Touraine, J. L., LeFrancois, N., Dubernard, J. M., Garnier, J. L., Eygonnet, J. P., Gibelin, N., Bétuel, H. and Traeger, J. (1987). Place of antilymphocyte globulins in the immunosuppressive regimen for kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 19, 1881-1881.

Danksagung

Das Projekt wird gefördert durch das BMBF (Projekt BEO/21 0311238).

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Christoph Conrad
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Immunologie
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
D-63225 Langen
Fax: +49-6103 77 1253
Tel.: +49-6103 77 5100/5104
E-mail: Ch.Conrad@em.uni-frankfurt.de



Optimierung und Etablierung von serologischen Methoden für die Wirksamkeitsprüfung von Immunglobulinen gegen *Clostridium tetani*-Toxoid

Elvira Ebert¹, Annett Abu Karim¹, Tanja Kayser¹, Renate Wenig¹, Karin Weißer¹, Maria Wirz², Giulio Pisani², Gabriele Schäffner¹ und Klaus Cußler¹

¹ Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ² Istituto Superiore di Sanità, I-Roma

Zusammenfassung

Die Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Immunglobulin (Ig)-Präparaten für den Menschen wird nach Monographie 398 der Europäischen Pharmakopöe (Ph. Eur.) in einem Toxin-Neutralisations-Test in Mäusen (MNT) oder Meerschweinchen durchgeführt. Diese Monographie erlaubt jedoch auch den Einsatz serologischer Methoden, sofern deren Eignung zuvor belegt werden konnte. Nach den ersten Untersuchungsergebnissen dieser Studie kann gezeigt werden, daß sowohl ein indirekter Enzyme-Linked-

Immunsorbent-Assay (ELISA), eine Rocket-Immunelektrophorese (RIE) als auch ein Toxin-Bindungs-Inhibitionstest (ToBI) als mögliche Alternativmethoden zum *in vivo* MNT einsetzbar sind. Die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Methoden kann derzeit mit inter-assay-Variationskoeffizienten von 2 bis 27% angegeben werden. Der ELISA ist mit einer Nachweisgrenze von 0,005 IE/ml am sensitivsten, gefolgt vom ToBI (Nachweisgrenze von 0,04 IE/ml) und der RIE (Nachweisgrenze von 5,0 IE/ml). Bislang konnte die Transferierbarkeit des ELISA-Systems in andere Laboratorien