

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie
(Direktoren: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, Prof. Dr. med. Philipp Rosenstiel,
Prof. Dr. rer. nat. Andre Franke)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung von klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen
Markern des Therapieansprechens in Patienten mit chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen unter IL-6 trans-signaling Blockade (Olamkicept)**

Retrospektive Analyse aus einer Phase IIa Studie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Hanna Höper
aus Oldenburg in Holstein

Kiel (2023)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Konrad Aden

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Witigo von Schönfels

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.05.2024

(Prof. Dr. med. Konrad Aden)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1 Krankheitsbild.....	1
1.1.2 Ätiopathogenese	2
1.1.3 Initial- und Verlaufsdagnostik	4
1.1.4 Therapieziele, Therapiemanagement und Therapieansätze	5
1.2 Die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) und (p)STAT3 in intestinaler Entzündung.....	8
1.2.1 IL-6 Signalwege: classic signaling, trans-signaling und trans-presentation	9
1.2.2 Das intrazelluläre Signalmolekül STAT3	11
1.2.3 Medikamentöse IL-6 Blockade	12
1.3 Das Medikament Olamkicept	13
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	15
2 Methoden	16
2.1 Studiendesign	16
2.2 Olamkicept	17
2.3 Beschreibung der Kohorte	18
2.4 Pharmakokinetik und STAT3-Assay.....	19
2.5 Bestimmung von Entzündungsaktivitäten	20
2.5.1 Klinische Entzündungsparameter.....	20
2.5.2 Biochemische Entzündungsparameter	20
2.5.3 Endoskopische Entzündungsparameter	21
2.5.4 Histologische und immunhistochemische Entzündungsparameter	21
2.6 Immunhistochemie	22
2.6.1 Immunhistochemisch dargestellte Moleküle: pSTAT3, Ki-67, CD3, CD68, MPO22	
2.6.2 Methodik der Immunhistochemie	23
2.6.3 Auswertung der immunhistochemischen Präparate	24

2.7	Definition von klinischer Remission und klinischer Response	27
2.8	Statistische Auswertungen	27
2.8.1	Definition der Baseline	28
2.8.2	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	28
2.8.3	Spearman-Rangkorrelationen	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Studienverlauf	30
3.2	Klinisches Remissions- und Responseverhalten.....	30
3.3	Pharmakokinetik.....	31
3.4	STAT3-Assay.....	32
3.5	Entwicklung der Entzündungsaktivitäten unter Therapie mit Olamkicept.....	35
3.5.1	Klinische Entzündungsaktivität	35
3.5.2	Biochemische Entzündungsaktivität	37
3.5.3	Endoskopische Entzündungsaktivität.....	41
3.5.4	Histologische Entzündungsaktivität	41
3.6	Immunhistochemische Entzündungsparameter	42
3.6.1	Intestinales pSTAT3	43
3.6.2	Intestinales Ki-67	45
3.6.3	Intestinales CD3.....	46
3.6.4	Intestinales CD68.....	47
3.6.5	Intestinales MPO	48
3.6.6	Fazit der immunhistochemischen Analyse.....	49
3.7	Korrelationen	50
3.7.1	Korrelationen der klinischen, biochemischen und histologischen Parameter mit den immunhistochemischen Parametern	50
3.7.2	Korrelationen der STAT3-Aktivierung in PBMC mit klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen Parametern	53
3.7.3	Fazit der Korrelationsergebnisse.....	54
4	Diskussion	55
4.1	Bewertung des Studienaufbaus	55
4.2	Bewertung der Methodik und Statistik	56
4.3	Bewertung des Therapieansprechen durch Olamkicept.....	56

4.4	Klinische Entzündungsparameter und ihre Validität	58
4.5	Biochemische Entzündungsparameter und ihre Validität	60
4.5.1	CRP und FC	60
4.5.2	Leukozyten	63
4.5.3	IL-6	63
4.5.4	Fazit der biochemischen Entzündungsaktivitätsparameter	65
4.6	Endoskopische und histologische Entzündungsparameter und ihre Validität	65
4.7	Einfluss von Olamkicept auf intestinale Zellen und deren STAT3-Aktivierung	66
4.7.1	Epitheliale pSTAT3-Expression	66
4.7.2	pSTAT3-Expression in der Lamina propria	68
4.7.3	Zellen der Lamina propria und IL-6 trans-signaling	69
4.7.4	Intestinale T-Zellen (CD3)	69
4.7.5	Intestinale Makrophagen (CD68)	71
4.7.6	Intestinale Neutrophile Granulozyten (MPO)	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang	88
7.1	Danksagung	101
7.2	Publikationen und wissenschaftliche Vorträge	102
7.2.1	Publikationen	102
7.2.2	Wissenschaftliche Vorträge	102
7.3	Eidesstaatliche Erklärung	103

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD68	Cluster of Differentiation 68
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FC	Fäkales Calprotectin
GIT	Gastrointestinaltrakt
gp130	Glykoprotein 130
HBI	Harvey-Bradshaw-Index
HE	Hämatoxylin-Eosin
hIL-6	hyper-IL-6
HPF	high power field
IHC	Immunhistochemie
IL-6 /IL-23	Interleukin-6/Interleukin-23
INH	Inhibitor
JAK	Januskinase
Ki-67	Kiel-67
MC	Morbus Crohn
MPO	Myeloperoxidase
NRem	Nicht-Remission

OD	objective density
PBMC	peripheral blood monocytes
pSTAT3	phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3
Rem	Remission
SES-CD	Simple endoscopic score für Crohn's Disease
sgp130	soluble glycoprotein 130
sgp130-Fc	soluble glycoprotein 130 - fragment crystallizable region
sIL-6R	soluble Interleukin-6 receptor bzw. löslicher IL-6 Rezeptor
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TH-17	T-Helfer 17 - Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL-6 Signalwege: classic signaling, trans-signaling, trans-presentation	10
Abbildung 2: Olamkicept	13
Abbildung 3: Studienablauf als Zeitstrahl	16
Abbildung 4: Immunhistochemische Präparate	25
Abbildung 5: Klinische Remission und Response	31
Abbildung 6: Pharmakokinetik über den Therapiezeitraum	32
Abbildung 7: STAT3-Assay über den Therapiezeitraum	33
Abbildung 8: Klinische Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum	36
Abbildung 9: Biochemische Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum ...	38
Abbildung 10: Histologischer Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum	42
Abbildung 11: pSTAT3-Expression über den Therapiezeitraum	44
Abbildung 12: Ki-67-Expression über den Therapiezeitraum	45
Abbildung 13: CD3-Expression über den Therapiezeitraum	47
Abbildung 14: CD68-Expression über den Therapiezeitraum	47
Abbildung 15: MPO-Expression über den Therapiezeitraum	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zugelassene Medikamente für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	7
Tabelle 2: Charakteristika der Kohorte am Ausgangspunkt der Studie.	18
Tabelle 3: Genauere Betrachtung der Patienten mit erhöhten IL-6 Konzentrationen.....	40
Tabelle 4: Endoskopischer Entzündungsaktivitätsparameter.....	41
Tabelle 5: Immunhistochemische Parameter und deren Veränderungen	43
Tabelle 6: Ergebnisse der Korrelationen von klinischen, biochemischen und histologischen Parametern mit den immunhistochemischen Parametern	51
Tabelle 7: Ergebnisse der Korrelationen zwischen STAT3-Aktivierung in PBMC mit klinischen, biochemischen und histologischen sowie immunhistochemischen Parametern.....	54

1 Einleitung

Die für diese Dissertation verwendeten klinischen und molekularen Daten wurden im Rahmen einer klinischen Phase IIa Studie der Arzneimittelzulassung (*European union drug regulating authorities clinical trials database (EudraCT)*-Nummer:2016-00205-36)) erfasst. In dieser Studie wurde ein neuartiger, medikamentöser Therapieansatz für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht: ein selektiver IL-6 trans-signaling Inhibitor.

Ausschließlich, damit die Lesbarkeit der Dissertation fließender ist, wurde auf geschlechtsspezifische Formulierung verzichtet. Personenbezogene Bezeichnungen sind bitte als geschlechtsneutral zu verstehen.

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die folgenden Unterkapitel bieten eine Einführung in chronische entzündliche Darmerkrankungen.

1.1.1 Krankheitsbild

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind lebenslang andauernde Erkrankungen, in denen schubartig Entzündungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) auftreten. Es werden zwei Hauptformen unterschieden: Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) (1). Sie ähneln sich in vielerlei Hinsicht, sind aber dennoch als zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten mit unterschiedlichen Ätiopathogenesen zu betrachten (2). Hauptsymptome bei CED sind Bauchschmerzen, Durchfälle, gastrointestinale Blutungen und Gewichtsverluste. Als schwerwiegende Komplikationen können bei MC Darmfisteln, Darmstenosen und Abszesse sowie bei CU das Megakolon auftreten (3).

Bei MC kann der gesamte Gastrointestinaltrakt segmental von Mund bis zum Anus entzündlich befallen sein; bei CU ist die Entzündung kontinuierlich ausgebreitet und auf den Dickdarm begrenzt (3, 4). Außerhalb des Gastrointestinaltrakts können bei CED begleitende Entzündungen der Augen, der Leber, der Gelenke und der Haut auftreten (5). Außerdem liegt ein erhöhtes Risiko für Darmkrebs vor (6). Die Patienten sind in ihrer Symptomatik je nach Krankheitsverlauf unterschiedlich stark betroffen und dementsprechend in ihrer Lebensqualität eingeschränkt. Neben milden Verläufen mit dauerhafter Entzündungsfreiheit ohne Therapiebedarf treten chronisch aktive Entzündungen oder gar lebensbedrohliche

Verläufe auf. Eine immunsuppressive Dauertherapie, Hospitalisationen oder chirurgische Interventionen (z.B. Darmresektionen (7)) können notwendig werden (8). Die weltweit höchsten Prävalenzen liegen in den westlichen Nationen (Nordamerika und Europa), allerdings steigen die Inzidenzen und Prävalenzen weltweit erheblich. Die Erkrankung tritt meist zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade auf (8, 9). Gesundheitsökonomisch betrachtet, führen die steigenden CED-Fallzahlen zu einer hohen Kostenbelastung (9, 10). Da die bisherigen Therapien nicht gänzlich zufriedenstellend sind, wurde und wird intensiv an tiefergehendem Krankheitsverständnis und an neuen Therapieansätzen geforscht (3).

1.1.2 Ätiopathogenese

Obwohl MC und CU viele klinische Gemeinsamkeiten aufweisen, sind sie zwei verschiedene Krankheitsentitäten mit unterschiedlichen Immunpathogenesen (11). Die exakten molekularen Mechanismen der Ätiopathogenese von CED sind unverstanden. Es herrscht Einigkeit darüber, dass die Ursachen multifaktoriell sind. Komplexe Interaktionen zwischen der Genetik, der Umwelt, dem Mikrobiom und dem Immunsystem sind ursächliche Komponenten (1, 3, 12, 13).

Als Schlüsselereignisse in der Entstehung von CED werden fehlregulierte Immunantworten, die Unterbrechung der Darmbarriere, eine beeinträchtigte intestinale Wundheilung sowie eine mikrobielle Fehlbesiedlung des Darms (Dysbiose) beschrieben (14–17).

Normalerweise schützen entzündlich wirkende Immunreaktionen den menschlichen Körper vor Infektionen und vor anderen Schädigungen. Durch die Freisetzung von Abwehrstoffen wird auch das körpereigene Gewebe geschädigt. Wenn der Auslöser für die Immunreaktion bestehen bleibt oder die Immunreaktion nicht beendet wird, entstehen chronische Entzündungen (18, 19). Für CED wurde eine unkontrollierte Aktivierung der intestinalen Immunzellen bestätigt (17). Zudem zeigte sich eine abnormale Expression von pro- und antiinflammatorischen Entzündungsbotschaften (Zytokine), die zu einem Ungleichgewicht des Immunsystems führte. So wurden erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-12, IL-18, Interferon (IFN- α), IFN- β und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) für CED beschrieben. In therapeutischer, antientzündlicher Absicht werden bereits einige dieser Zytokine gezielt blockiert (11).

Eine intakte Darmbarriere fungiert als Grenz- und Schutzschicht zwischen Darmschleimhaut und Außenwelt (Darmlumen mit Mikroorganismen) und verhindert somit, dass Krankheitserreger oder andere schädlichen Substanzen in den Körper gelangen (20). Die Darmbarriere besteht aus kommensalen Darmmikroben, einer Schleimschicht mit Abwehrstoffen, epithelialen Zellverbindungen und Immunzellen. Wird die Darmbarriere beschädigt, können Mikroorganismen und andere Antigene in tiefere Darmgewebsschichten gelangen und dort aberrante Immunreaktionen sowie Gewebeschäden auslösen (16).

Reparaturen von Defekten in der Darmschleimhaut werden als intestinale Wundheilung bezeichnet. Für CED wurde eine gestörte intestinale Wundheilung festgestellt, welche von Schleimhautulcera bis hin zu Fisteln, Blutungen, Darmdurchbrüchen und dem toxischen Megakolon führen kann (15, 21).

Als Umweltfaktoren beeinflussen bspw. Antibiotikatherapien (v.a. im Säuglingsalter) oder die Ernährungsweise die Entstehung von CED. Die Stilldauer und eine ausgewogene ballaststoffreiche Ernährung schützen vor einer Erkrankung, eine fett- und zuckerreiche Kost sowie Zusatzstoffe (z.B. Emulgatoren) erhöhen das Risiko an CED zu erkranken. Rauchen ist ein protektiver Faktor für CU, hingegen ein Risikofaktor für MC (17, 22–24).

Als auslösende Faktoren der CED rücken genetische Prädispositionen zunehmend ins Zentrum. In genomweiten Assoziationsstudien wurden bereits mehr als 200 Risikogene (z.B. ATG16L1, IL23R, IL6R (25–27)) identifiziert, die mit dem Auftreten von CED assoziiert sind. Die Risikogene sind als veränderte Genvarianten in entscheidende Funktionsmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität involviert und beeinflussen somit Abläufe von Immunantworten. Dabei überlappen einige Risikogene für MC und CU, andere liegen spezifisch bei MC oder bei CU vor (12, 16, 27–29). Interessanterweise liegen einige Risikogene ebenfalls in anderen entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis vor (30). Bei CED kann eine einzelne Genmutation für die Erkrankung verantwortlich sein (z.B. IL-10 Rezeptor Defizienz), in der Mehrheit der Fälle liegen jedoch polygene Ursache vor. Die individuelle Risikogen-Konstellation kann Hinweise für zielgerichtete Therapieansätze bieten (31).

Abschließend soll betont werden, dass nur die Integration aller verursachender Komponenten – von Genetik, Umwelt, Mikrobiom und Immunsystem – zu einem vollen Krankheitsverständnis und folglich zu kurativen Therapien führen kann (1).

1.1.3 Initial- und Verlaufsdagnostik

Es gibt bislang keinen Goldstandard für die Diagnosestellung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Diagnostik basiert auf der Zusammenschau von klinischen, laborchemischen, bildgebenden und histologischen Untersuchungen. Dabei ist anfangs nicht immer klar zwischen MC und CU differenzierbar, wobei eine ausführliche Anamnese, die körperliche Untersuchung, und o.g. Untersuchungen wegweisend sind (7, 32). In der Primär- und auch in der Verlaufsdagnostik ist es wichtig, die bestehenden Entzündungs- bzw. Krankheitsaktivitäten im Patienten zu erfassen. Dabei werden die Krankheitsaktivitäten auf verschiedenen Ebenen beurteilt: klinisch, biochemisch/laborchemisch, endoskopisch und histologisch. Je nach Krankheitsaktivität richtet sich anschließend die medikamentöse Therapieanpassung.

Als klinische Parameter werden klinische Entzündungsaktivitätsindizes erhoben: Für Morbus Crohn gibt es den *Crohn's disease activity index* (CDAI) und den *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI); für Colitis ulcerosa den *Mayo-Score*. Unter Einbezug von klinischen Symptomen wie der Stuhlfrequenz, dem Vorliegen von blutigem Stuhl, dem Allgemeinbefinden oder Fieber werden diese Indizes bestimmt. Die für die Indizes einbezogenen Parameter sowie die entsprechende Einstufung der Krankheitsaktivität sind im Anhang 1 dargestellt (33–43).

Als biochemische Parameter werden die Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) aus dem Serum und fäkales Calprotectin (FC) aus dem Stuhl bestimmt (7, 32, 44). CRP ist ein Plasmaprotein der Akuten Phase Reaktion, das bei Entzündungsreaktionen z.B. im Rahmen von Infektionen oder bei Gewebeschädigungen freigesetzt wird. Als normwertiger Referenzwert wird CRP <5 mg/l angegeben (45). Calprotectin ist ein intrazelluläres Protein aus der Immunzellgruppe der Neutrophilen Granulozyten. Es wird bei intestinaler Entzündung über den Stuhl ausgeschieden und weist sensitiv Entzündungen des Darmtrakts nach. Als Referenzwert für Erwachsene gilt FC <50 mg/kg Stuhl. Sowohl CRP als auch Calprotectin sind keine spezifischen Entzündungsparameter für CED, wobei FC spezifischer für Darmentzündungen ist als CRP. CRP und FC gelten als objektive, valide, kostengünstige und minimalinvasive Entzündungsaktivitätsmarker für CED (7, 32, 44).

Zur weitergehenden Diagnostik stehen bildgebende Verfahren zur Verfügung: die hochauflösende abdominelle Sonographie, CT, MRT und endoskopische Untersuchungen (7, 32).

Darmspiegelungen mit Stufenbiopsien stellen eine invasive Standarduntersuchung in der Diagnostik von CED dar. Mit ihr können die entzündlichen Befallsmuster (MC: diskontinuierlich, multilokulär vs. CU: kontinuierlich, diffus panmukosal), Komplikationen wie Ulzerationen, Stenosen oder Fisteln und die endoskopische Entzündungsaktivität beurteilt werden. Als endoskopische Entzündungsaktivitätsindizes werden für MC der *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD) und für CU der Mayo-Score bestimmt (7, 32). Auch deren Parameter und Interpretation sind im Anhang 1 dargestellt.

Die entnommenen Darmgewebebiopsien werden histologisch untersucht. Für MC ist dabei eine transmurale Entzündung mit Granulomen charakteristisch, für CU ist es eine panmukosale Entzündung mit Abszessen in den Darmkrypten (7, 32). Als histologischen Entzündungsaktivitätsscore für CU gibt es den *Nancy-Index* und den *Robarts histopathology index*, für MC gibt es bislang keinen validen histologischen Krankheitsaktivitätsindex (7, 32, 46).

1.1.4 Therapieziele, Therapiemanagement und Therapieansätze

In der Therapie von CED kommt das *Treat to target* Prinzip zur Anwendung. Dies bedeutet, dass bestimmte Therapieziele definiert werden und mit entsprechender Therapiewahl zielgerichtet verfolgt werden. Hierfür müssen Krankheitsaktivitäten frühzeitig durch ein kontinuierliches Monitoring erkannt werden, um die jeweiligen Therapien rechtzeitig anzupassen, sodass die Therapieziele erreicht werden können (47, 48). Die CALM-Studie zeigte, dass als Entscheidungsgrundlage für Therapieanpassungen ein intensivierte Verlaufsmonitoring unter Einbezug von sowohl klinischen Symptomen als auch von biochemischen Entzündungsmarkern (CRP, FC) anzustreben ist (49).

Primäres Therapieziel ist es heutzutage, möglichst rasch Remission zu induzieren, also eine Abwesenheit von Entzündungszeichen zu erreichen. Im weiteren Verlauf wird ein stetiger Remissionserhalt angestrebt (7, 32). Remission wird mittlerweile in verschiedene Ebenen unterteilt: So gibt es klinische Remission, die anhand der klinischen Indizes bestimmt wird, biochemische Remission, die anhand von Biomarkern bestimmt wird, endoskopische

Remission, die anhand von endoskopischen Untersuchungen bestimmt wird und histologische Remission, die durch mikroskopische Untersuchungen bestimmt wird (50–52).

Als ein seit 20 Jahren an Bedeutung zunehmendes Therapieziel wird die mukosale Wundheilung beschrieben, wobei eine exakt validierte Definition hierfür noch nicht vorliegt. Am ehesten wird mukosale Wundheilung als Wiederherstellung der intestinalen Barrierefunktion verstanden, was z.B. endoskopisch, radiologisch und histologisch beurteilt werden kann. Mukosale Wundheilung ist mit einem besserem Langzeitergebnis verbunden und geht mit einer geringeren Rate an Krankheitsrückfällen, Hospitalisierungen, Komplikationen und Chirurgie einher (51, 53) und wird daher zunehmend ein angestrebtes Therapieziel.

Als kombiniertes Therapieziel ist das Erreichen von klinischer und biochemischer Remission sowie mukosaler Wundheilung mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Krankheitsfreiheit verbunden (53) und damit für die Lebensqualität der Patienten entscheidend.

Für CED gibt es derzeit keine kurativen Therapieoptionen. Die Wahl der Therapie adaptiert sich stufenweise an der Krankheitsaktivität und an patientenspezifischen Faktoren. Spontane Remissionsraten von CU liegen ohne therapeutische Intervention bei <50 %. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von medikamentösen Therapien, durch welche höhere Remissionsraten erzielt werden können (7, 32, 54).

Es wird zwischen remissionsinduzierenden Medikamenten im akuten Schub und remissionserhaltenden Medikamenten im symptomfreien Intervall unterschieden (7, 32, 54). Die effektivsten Interventionen sind allerdings nur für ca. 30 % der Patienten geeignet (55). Konventionelle Medikamente in der Behandlung von CED wirken unspezifisch immunsuppressiv (56) und sind daher mit ungünstigen Nebenwirkungen wie schweren (opportunistischen) Infektionen, Lymphomen und möglicherweise Krebsentstehung verbunden (57). Eine neuere, spezifischere Wirkstoffgruppe stellen Biologika dar, die als monoklonale Antikörper zielgerichtet auf entscheidende molekulare Entzündungssignalwege einwirken. Sie blockieren entweder proentzündliche Zytokine oder verstärken antientzündliche Signalwege (14, 58). Die für CED zugelassenen Medikamente sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Medikament	Remissionsinduktion		Remissionserhalt	
	MC	CU	MC	CU
Aminosalicylate	x	✓	x	✓
Steroide	✓	✓	x	x
Immunsuppressiva				
Thiopurine	(✓)	x	✓	✓
Calcineurin-Inhibitor	x	(✓)	x	(✓)
Methotrexat	(✓)	x	✓	(✓)
Biologika:	✓	✓	✓	✓
Anti-TNF	✓	✓	✓	✓
Anti-IL-12/-23	✓	x	✓	x
Anti-Integrin	✓	✓	✓	✓
Pan-JAK-Inhibitor	x	✓	x	✓
JAK-1-Inhibitor	x	✓	x	✓
S1p-Inhibitor	x	✓	x	✓

Tabelle 1: Zugelassene Medikamente für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die zugelassenen Medikamente sind nach Induktion oder Erhalt von Remission für Morbus Crohn (MC) und für Colitis ulcerosa (CU) aufgelistet. ✓ bedeutet Anwendung empfohlen, (✓) bedeutet eingeschränkte Anwendung möglich und X bedeutet keine Anwendung empfohlen (7, 54, 59, 60).

Für die Remissionsinduktion im akuten Schub stehen Kortikosteroide (z.B. Cortison), Immunsuppressiva, Biologika und die enterale Ernährungstherapie (v.a. bei Kindern) zur Auswahl (7, 54, 61).

Für den langfristigen Remissionserhalt sind Dauertherapien mit Immunsuppressiva und Biologika möglich. Kortikosteroide sind für die Langzeitanwendung wegen ihrer Nebenwirkungen ungeeignet (z.B. Immunsuppression, Osteoporose). Der schwerwiegende Nachteil von immunsuppressiven Langzeittherapien sind die o.g. ernstzunehmenden Nebenwirkungen ((opportunistische) Infektionen oder Krebs). Aber auch während der Behandlung mit Biologika können als Nebenwirkung latente Infektionen wie Tuberkulose und Hepatiden reaktiviert werden (7, 32, 57).

Als nicht-medikamentöse Therapieoption müssen bei Auftreten von Komplikationen wie Fisteln oder Krebs chirurgische Interventionen erwogen werden (7, 54). In therapierefraktärer CU kann als Ultima Ratio und als kurative Therapieoption der Dickdarm chirurgisch entfernt werden (62).

Trotz der genannten Therapieoptionen gibt es Patienten, denen aufgrund von Vorerkrankungen, Kontraindikationen, fehlenden Wirkeffekten, Wirkverlusten oder schweren

Nebenwirkungen kaum Therapien für einen langfristigen Remissionserhalt zur Verfügung stehen. Bislang ist es noch nicht möglich, den Therapieerfolg von Medikamenten vor Therapiebeginn vorherzusagen. Daher werden die Medikamente nach dem *trial and error* Prinzip ausprobiert und je nach Therapieansprechen fortgeführt oder abgesetzt. Erstrebenswert wäre eine individualisierte Therapiewahl auf Grundlage der persönlichen Krankheitsbiologie, bei der vorab anhand von Biomarkern eingeschätzt werden kann, ob die Medikation beim jeweiligen Patienten effektiv wirken wird. Aus diesem Grund wird am weiteren Verständnis der komplexen und heterogenen Krankheitsbiologie von CED geforscht, um daraus innovative, zielgerichtete Therapieansätzen zu entwickeln (55, 63, 64). Mit diesem Hintergrund entstand das in dieser Studie erprobte Biologikum.

1.2 Die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) und (p)STAT3 in intestinaler Entzündung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin, das an der Entstehung von MC und CU beteiligt ist (65). Signifikant erhöhtes IL-6 lag im Serum von Patienten mit aktiver CED gegenüber Patienten mit inaktiver CED oder gegenüber gesunden Probanden vor. Die erhöhten IL-6 Konzentrationen konnten zwar nur in einem Teil der Patienten gemessen werden, bei diesen waren die erhöhten IL-6 Werte jedoch mit einer starken Krankheitsaktivität assoziiert. Zudem korrelierte die IL-6 Konzentration signifikant mit CRP und der Anzahl an Leukozyten (66). Auch in der Darmmukosa von MC- und CU-Patienten wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6 gemessen (67). Physiologisch betragen die Konzentrationen von IL-6 im Serum 1-5 pg/ml; bei Entzündung, Infektion und Krebs kann sich die IL-6 Konzentration 1000-fach bis in niedrige ng/ml-Konzentrationen und im septischen Zustand 1.000.000-fach in den µg/ml Bereich erhöhen (68, 69). Dabei wird IL-6 aus Immunzellen (u.a. T- und B-Zellen, Monozyten), Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten freigesetzt (69).

IL-6 vermittelt kontextabhängig vielseitige und wichtige Funktionen in Gesundheit und Krankheit. Es erfüllt unter Anderem physiologische Funktionen in Stoffwechselprozessen (z.B. Blutzucker- und Knochenmetabolismus) und koordiniert wichtige Abwehrreaktionen gegen infektiöse Erreger. Es leitet die Akute Phase Reaktion ein, die als systemische Abwehrreaktion des angeborenen Immunsystems gegen Infektion und Pathogene wichtig ist (69). Fehlreguliertes IL-6 signaling wirkt proentzündlich und trägt zu Autoimmunität, der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungen sowie zur Entstehung von Darmkrebs bei (69–71).

Als Chemokin lockt IL-6 weitere Immunzellen wie T-Zellen ins Gewebe. Es verhindert die Differenzierung von antiinflammatorischen, regulatorischen T-Zellen (Tregs) und fördert die Differenzierung von Makrophagen sowie von einigen T-Zellen (72). So fördert es die Bildung von hochentzündlich wirkenden T-Helfer-17-Zellen (TH17), welche eine zentrale Rolle in autoimmunen sowie chronisch entzündlichen Erkrankungen spielen (73, 74). Somit beeinflusst IL-6 in CED das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen TH17-Zellen und antiinflammatorischen regulatorischen T-Zellen hin zur proentzündlichen Seite (3, 67, 75).

1.2.1 IL-6 Signalwege: classic signaling, trans-signaling und trans-presentation

IL-6 kann auf unterschiedliche Weisen auf seine Zielzellen einwirken: über „Classic signaling“, „Trans-signaling“ und „Trans-presentation“ (Abbildung 1). Beim classic signaling bindet IL-6 an einen membrangebundenen IL-6 Rezeptor (mIL-6R) und anschließend an das Glykoprotein 130 (gp130). gp130 ist auf jeder Körperzelle exprimiert, wohingegen der mIL-6R nur auf Leberzellen, auf einigen Epithelzellen und auf einigen Leukozyten vorzufinden ist. Daraus folgt, dass IL-6 via classic signaling nur auf diejenigen Zellen einwirken kann, die einen membranösen IL-6R besitzen (76).

Im Gegensatz dazu kann IL-6 trans-signaling jede Körperzelle stimulieren. Dies geschieht mithilfe des im Blut zirkulierenden, löslichen IL-6 Rezeptors (soluble IL-6R, sIL-6R). Dieser sIL-6R kann durch zwei Wege entstehen: a) indem der membrangebundene IL-6R proteolytisch gespalten wird oder b) indem er durch alternatives Splicing de novo von Zellen produziert wird (70).

Als Resultat zirkuliert der lösliche IL-6R frei im Blut und kann an IL-6 binden, wodurch ein IL-6/sIL-6R-Komplex gebildet wird. Dieser Komplex wiederum kann an das ubiquitär vorkommende gp130 binden und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade einleiten. Dieser, alle Körperzellen beeinflussende IL-6 Signalweg wird als IL-6 trans-signaling bezeichnet (76).

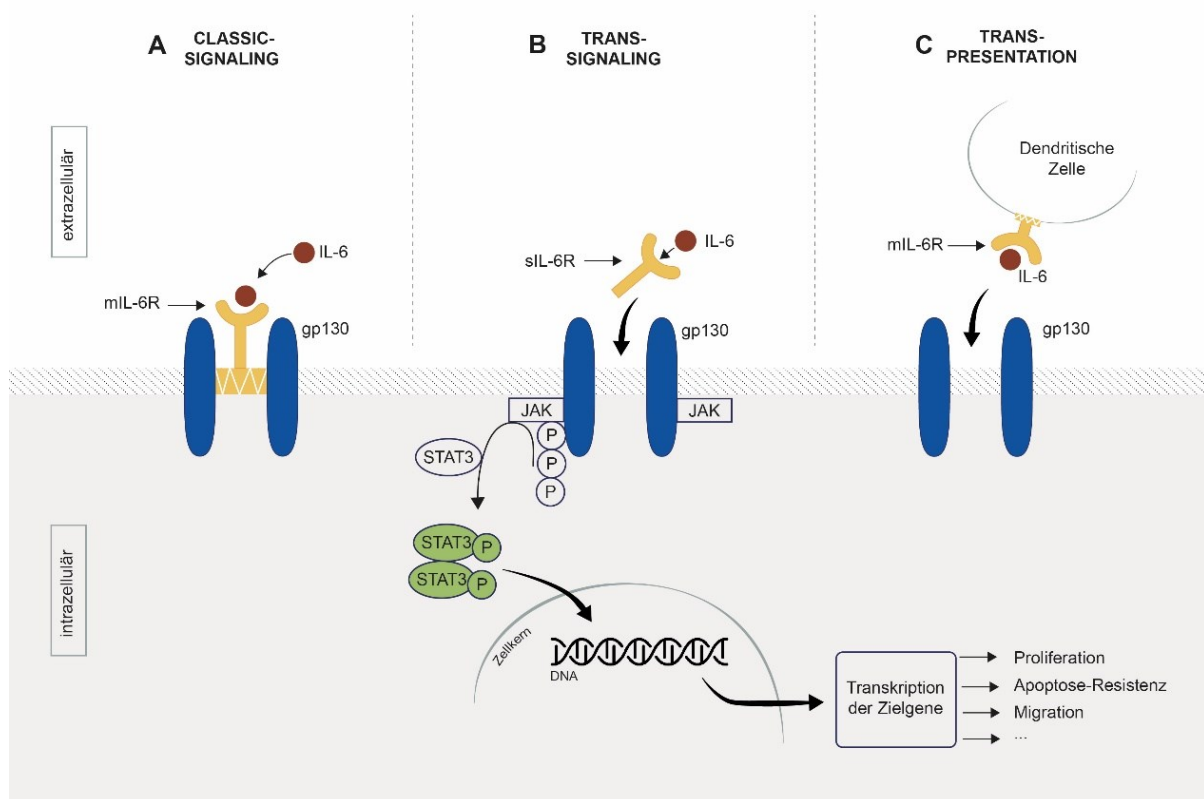


Abbildung 1: IL-6 Signalwege: classic signaling, trans-signaling, trans-presentation

Abb. 1 in Anlehnung an Kang und Kishimoto, Nature, 2021 (77):

(A+B): Interleukin-6 (IL-6) bindet an den membrangebundenen IL-6 Rezeptor (mIL-6R) (classic signaling) (A) oder an den löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) (trans-signaling) (B). Der IL-6/IL-6R - Komplex bindet an gp130, wodurch intrazellulär die Signalkaskade über die Januskinase (JAK) und den signal transducer and activator of transcription (STAT3) (JAK/ STAT3-Signalkaskade) aktiviert wird. Dabei phosphoryliert das Enzym JAK das intrazelluläre Signalmolekül STAT3 zu phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3), woraufhin dieses dimerisiert und als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandert. Hier werden die spezifischen Zielgene transkribiert (für classic signaling bspw. die Akute Phase Reaktion). (C): IL-6 trans-presentation wird über dendritische Zellen vermittelt. Sie präsentieren einen IL-6/IL-6R - Komplex auf ihrer Oberfläche, welcher wiederum an gp130 binden kann und darüber intrazelluläre Signalkaskaden einleitet.

IL-6 classic signaling wird eine antientzündliche und protektive Wirkung zugeschrieben. Es ist wichtig für die Verteidigung gegenüber bakteriellen Infektionen und initiiert die Akute Phase Reaktion. IL-6 trans-signaling wird hingegen als entzündungsfördernd eingestuft und kann zu chronischen Entzündungen sowie zur Krebsentstehung beitragen (72, 78). Es unterdrückt die erste, von Neutrophilen Granulozyten geprägte Immunantwort, indem es die Gewebeinvasion von diesen einschränkt. Gleichzeitig leitet es die zweite, spezifische Immunantwort ein, indem es die Einwanderung von mononuklearen Zellen (T-Zellen, Makrophagen) fördert. IL-6 trans-signaling wird somit eine entscheidende Funktion für den Übergang von der akuten zur

chronischen Immunantwort zugeschrieben (72, 79, 80). Zudem unterdrückt IL-6 trans-signaling die Differenzierung von antientzündlich wirkenden, regulatorischen T-Zellen und vermittelt in mukosalen T-Zellen eine Resistenz gegenüber dem natürlichen Zelltod (Apoptose). Dadurch können längerlebige Immunzellen entzündliche Prozesse im Darm aufrechterhalten (72, 81).

IL-6 trans-signaling hat intestinal zudem eine proliferative Wirkung und dysreguliertes IL-6 trans-signaling führte in Mäusen zu Darmkrebs (82). Interessanterweise hatten nur IL-6 trans-signaling und IL-22 einen proliferativen Einfluss auf epitheliale Darmzellen, während IL-6 classic signaling widererwarten keinen Einfluss auf intestinale Wundheilung zeigte (83). Experimentell konnte IL-6 trans-signaling in epithelialen Darmzellen in Abhängigkeit von den vorliegenden Umständen regenerativ, wachstumshemmend oder gar zellschädigend wirken. Regenerativ wirkte es bei einzelnen IL-6 trans-signaling Stimulationen. Wachstumshemmend wirkte IL-6 trans-signaling in Kombination mit zusätzlichen Zellstressreizen. Zelluntergang trat bei länger andauernden, wiederholten IL-6 trans-signaling Stimulationen in Kombination mit Zellstress auf. Sowohl die regenerative, als auch die wachstumshemmende und die zellschädigende Wirkung von IL-6 trans-signaling konnte durch eine medikamentöse IL-6 trans-signaling Blockade unterbunden werden (84). Zusammengefasst wird IL-6 trans-signaling einerseits eine entzündungsfördernde und -chronifizierende Wirkung zugeschrieben, andererseits konnte es experimentell in Abhängigkeit von Umweltfaktoren wundheilungsfördernd, wachstumshemmend oder zellschädigend wirken.

Über einen dritten Signalweg, die IL-6 trans-presentation, trägt IL-6 zur Differenzierung der hochinflammatorischen TH17 - Zellen bei (73, 74). Dendritische Zellen präsentieren auf ihrer Zelloberfläche einen membrangebundenen IL-6 / IL-6R - Komplex. Wenn dieser Komplex einer T-Zelle präsentiert wird, kann sie durch ihr membrangebundenes gp130 mit dem Komplex interagieren. Folglich wird eine intrazelluläre Signalkaskade mit pathogenen Zielprogrammen eingeleitet (69).

1.2.2 Das intrazelluläre Signalmolekül STAT3

Sowohl IL-6 classic als auch trans-signaling induzieren intrazellulär verschiedene Signalkaskaden. Darunter ist der intrazelluläre Signalweg über die *Januskinase/signal transducer and activator of transcription 3* (JAK/STAT3) sehr bekannt. Dieser JAK/STAT3

Signalweg ist in entzündlichen Zuständen oft aktiviert. JAK ist ein intrazelluläres Enzym und STAT3 ein intrazelluläres Signalmolekül. Nach der extrazellulären Zellstimulation durch IL-6 phosphoryliert JAK die Tyrosinreste von STAT3, sodass die aktivierte Form, phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3), entsteht. Daraufhin dimerisieren zwei pSTAT3-Moleküle, die in den Zellkern wandern, um dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren. Dabei bindet das pSTAT3-Dimer an die DNA und induziert spezifisch die Expression von Zielgenen wie z.B. mit Proliferation assoziierten Genen (69, 85, 86). STAT3 wird in intestinalen Epithelzellen sowohl durch IL-6 via classic und via trans-signaling, kann aber auch von IL-11 und IL-22 aktiviert werden (84, 87).

STAT3 kommt in jeder Zellart im Darm vor und hat je nach Zellart vielseitige Einflüsse. Es scheint zentral für die molekulare Koordination der mukosalen Immunantwort zu sein. Im angeborenen Immunsystem trägt STAT3 zur Infektionsabwehr bei und bspw. brauchen regulatorische T-Zellen STAT3 für ihre antientzündlichen Funktionen (86). Lovato et al. zeigten, dass STAT3 in intestinalen T-Zellen von MC gegenüber Gesunden wesentlich aktiviert war (88). Im Epithel unterdrückte STAT3 Immunantworten und förderte epitheliale Regeneration (86). IL-6 und STAT3 förderten Proliferation und darüber epitheliales Zellüberleben und andererseits Colitis-assoziierten Darmkrebs (71). Aden et al. konnten in intestinalen Epithelzellen experimentell zeigen, dass IL-22 und IL-6 trans-signaling (hingegen nicht IL-6 classic signaling) hauptverantwortlich für die Expression von STAT3-Zielgenen waren und dass sie signifikant intestinale Wundheilung förderten (83). IL-6 trans-signaling konnte epithelial allerdings ebenfalls zellschädigend wirken und zwar in Anwesenheit von zellulären Stressfaktoren und langandauernden IL-6 trans-signaling Stimulationen (84).

Mitsuyama et al. zeigten in einem Colitis - Mausmodell, dass STAT3 via IL-6 trans-signaling aktiviert wurde und die Krankheitsaktivität verstärkte. Eine medikamentöse Blockade von IL-6 trans-signaling konnte die STAT3-Aktivität erfolgreich reduzieren und den intestinalen Entzündungsgrad verbessern. Somit scheint eine medikamentöse Blockade von IL-6 trans-signaling ein vielversprechender Therapieansatz zu sein (89, 90).

1.2.3 Medikamentöse IL-6 Blockade

Eine medikamentöse, gänzliche IL-6 Blockade und damit einer Blockade aller IL-6 Signalwege (classic, trans-signaling, trans-presentation) über einen monoklonalen IL-6R Antikörper (Tocilizumab) ist z.B. für die chronisch entzündliche Erkrankung Rheumatoide Arthritis in mehr

als 100 Ländern zugelassen (69). Bei MC war eine globale IL-6 Blockade durch Tocilizumab zwar effektiv und entzündungsmindernd, sorgte allerdings zugleich für schwere Komplikationen: So traten intestinale Wundheilungsstörungen mit Abszessbildung oder Darmperforationen auf und die Studie wurde vorzeitig abgebrochen (91, 92). In klinischen Studien bei anderen Krankheiten führte die medikamentöse IL-6 Inhibition zu ansteigenden Zahlen von schweren und/oder opportunistischen Infektionen (76). Demnach wären entzündungsmindernde, effektive IL-6 modulierende Therapieansätze mit weniger schweren Nebenwirkungen erstrebenswert.

1.3 Das Medikament Olamkicept

Das in dieser Studie erprobte Biologikum *Olamkicept* (FE 999301, TJ 301) wurde entwickelt, um selektiv entzündungsförderndes IL-6 trans-signaling zu blockieren. IL-6 classic signaling und dessen Funktionen bleiben dabei unbeeinträchtigt. Olamkicepts präklinisches Vorgängermodell heißt *sgp130-Fc* (*soluble glykoprotein 130 - fragment crystallizable region*). Olamkicept und *sgp130-Fc* sind rekombinant hergestellte Proteine. Dabei wurden der extrazelluläre Anteil vom membran Glykoprotein gp130 mit der *fragment crystallizable region* (Fc-Region) von humanem Immunglobulin IgG1 fusioniert (Abbildung 2). Olamkicept bindet selektiv den IL-6/sIL-6R - Komplex, jedoch nicht freies IL-6 oder den freien sIL-6R. Somit kann Olamkicept selektiv IL-6 trans-signaling inhibieren (78).

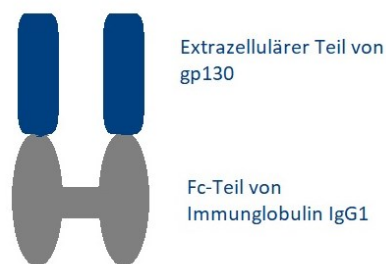


Abbildung 2: Olamkicept in Anlehnung an Rose-John, 2017 (78)

In dieser Abbildung ist die Struktur von Olamkicept bzw. *sgp130-Fc* in Anlehnung an Rose-John (78) dargestellt. Das Protein ist aus dem extrazellulären Anteil von Glykoprotein gp130 und dem Fragment - crystallizable region (Fc-Region) vom humanen Immunglobulin G1 IgG1 fusioniert.

Natürlicherweise gibt es im humanen Serum das Protein *soluble glykoprotein 130* (*sgp130*). Dieses bildet ein natürliches Puffersystem, welches IL-6 trans-signaling entgegenwirken kann. Dabei bindet der IL-6/sIL-6R - Komplex an *sgp130* und wird dadurch neutralisiert (93).

Im menschlichen Blut liegen die Konzentrationen von IL-6 bei 2-6 pg/ml, von sIL-6R bei 40-80 ng/ml und von sgp130 bei 250-400 ng/ml. IL-6 kann in entzündlichen Stadien 1000-fach ansteigen (68, 69, 93). Da sgp130 höher konzentriert als der sIL-6R ist, wurde postuliert, dass sIL-6R der limitierende Faktor für die Pufferkapazität von IL-6 trans-signaling darstellt. In infektiösen Zuständen kann die sIL-6R Konzentration jedoch fünffach ansteigen, während sgp130 in unveränderter Konzentration bleibt. Der in entzündlichen Stadien resultierende „Überhang“ von freiem IL-6 und sIL-6R führt über die Bildung von IL-6/sIL-6R - Komplexen zu vermehrt stattfindendem IL-6 trans-signaling. Diesem vermehrten IL-6 trans-signaling soll Olamkicept bzw. sgp130-Fc entgegenwirken (78, 93). Es wurde gezeigt, dass rekombinant hergestelltes sgp130-Fc zehnfach so stark inhibitorisch wie körpereigenes sgp130 wirkt (72).

Präklinische Studien zeigten in vivo, dass sgp130-Fc die Colitis - Aktivität mindern konnte und Apoptose in T-Zellen induzierte (90). Colitis-assoziierte Vorstufen von Krebs konnten durch sgp130-Fc in Mäusen signifikant reduziert werden (82). Mitsuyama et al. zeigten in Tiermodellen, dass die durch IL-6 trans-signaling vermittelte STAT3-Aktivierung effektiv durch sgp130-Fc unterdrückt werden konnte und sich zudem die Colitis-Aktivität minderte (89). Le Mao et al. zeigten in epithelialen Darmzellen, dass sgp130-Fc sowohl die regenerative als auch die wachstumshemmende und die zellschädigende Wirkung von IL-6 trans-signaling unterbinden konnte (84). Diese Ergebnisse unterstreichen die potentielle Eignung von Olamkicept als Therapieansatz bei CED.

Olamkicept vollendete 2013/2014 die klinischen Phase I der Arzneimittelzulassung erfolgreich (78). Anschließend wurde die klinische Phase IIa der Arzneimittelzulassung initiiert, welche Gegenstand dieser Dissertation ist. In Asien wurde eine größere, randomisierte, doppelblinde Placebo-kontrollierte Phase IIb Studie (NCT03235752) mit CU-Probanden (n=91) durchgeführt. Kurz nach Studienende im Mai 2021, wurde berichtet, dass unter Olamkicept-Therapie signifikant mehr Probanden sowohl klinische Response als auch klinische Remission sowie mukosale Heilung erreichten. Dabei wurde Olamkicept gut vertragen (94).

Präklinisch konnte sgp130-Fc experimentell auch in anderen entzündlichen Erkrankungen Wirkeffekte hervorrufen. In zahlreichen Entzündungsmodellen wie bei z.B. Sepsis, Rheumatoider Arthritis, Lupus erythematoses, Neuroinflammation sowie in einigen entzündlich assoziierten Krebsarten konnte sgp130-Fc IL-6 trans-signaling erfolgreich blockieren (78). In Sepsis-Modellen wurde ein überlegener Effekt der selektiven (Olamkicept

und sgp130-Fc) gegenüber der globalen (z.B. Tocilizumab) IL-6 Hemmung beobachtet (95). Somit scheint die selektive IL-6 trans-signaling Inhibition durch Olamkicept ein vielversprechender Therapieansatz für CED und möglicherweise auch für andere entzündliche Erkrankungen zu sein.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Olamkicept wurde im Rahmen der Arzneimittelzulassung in einer Phase IIa Studie erstmals an Patienten mit aktiven chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verabreicht.

Primäres Ziel dieser Phase IIa Studie war es, Sicherheit und Verträglichkeit von Olamkicept zu beurteilen. Zudem wurde das *target engagement*, also die zielgerichtete Inhibition von IL-6 trans-signaling untersucht.

Ziel dieser Dissertation war es, das therapeutische Ansprechen von Olamkicept bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen anhand von verschiedenen Entzündungsparametern zu beurteilen. Es wird zunehmend wichtig, die Krankheitsaktivität auf verschiedenen Ebenen zu evaluieren, um eine zufriedenstellende Krankheitskontrolle zu erreichen und aufrecht zu erhalten. Im Detail wurden in dieser Dissertation klinische, biochemische, histologische und insbesondere immunhistochemische Entzündungsaktivitätsparameter retrospektiv hinsichtlich antientzündlicher Veränderungen und hinsichtlich eines Remissions- bzw. Responseverhaltens untersucht. Der Hauptfokus dieser Dissertation lag dabei auf der immunhistochemischen Analyse der Darmbiopsien und damit auf einer Untersuchung der entzündlichen Prozesse direkt an der chronisch entzündlich betroffenen Darmmukosa.

In einem zweiten Schritt wurde in Assoziationsanalysen untersucht, in welcher Weise klinische, biochemische und histologische Parameter mit den mukosalen Veränderungen aus der Immunhistochemie korrelieren. Die Korrelationsanalysen sollen die jeweiligen Entzündungsparameter hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter Olamkicept-Therapie validieren.

2 Methoden

Für diese Studie wurden verschiedene Methoden angewendet, zu denen klinische, biochemische, histologische und immunhistochemische Analysen sowie statistische Auswertungen zählen. Diese werden in diesem Abschnitt nacheinander näher erläutert.

2.1 Studiendesign

Die Phase IIa Studie war eine einarmige, prospektiv organisierte Open-Label Studie ohne Untersuchung von Placebo- oder Kontrollgruppen. Open-Label bedeutet, dass Patient und Arzt über die Medikationsgabe informiert waren, wodurch keine Verblindung und ebenfalls keine Randomisierung möglich ist (96). Die Studie verlief über einen Zeitraum von 21 Monaten von 2016 bis 2019. An der Studiendurchführung beteiligten sich das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel und das Asklepios Westklinikum, Hamburg.

Das Ethikkomitee der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und das Paul Ehrlich Institut befürworteten die Durchführung dieser Studie (EudraCT Nr. 2016-000205-36). Die ethischen Anforderungen nach der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki/Tokio 1964/1965 wurden befolgt. Während des Studienverlaufes erhielten die Probanden über insgesamt 12 Wochen in zweiwöchentlichen Intervallen intravenöse Gaben von 600 mg Olamkicept. Anschließend wurden sie 42 Tage lang nachbeobachtet (Abbildung 3).

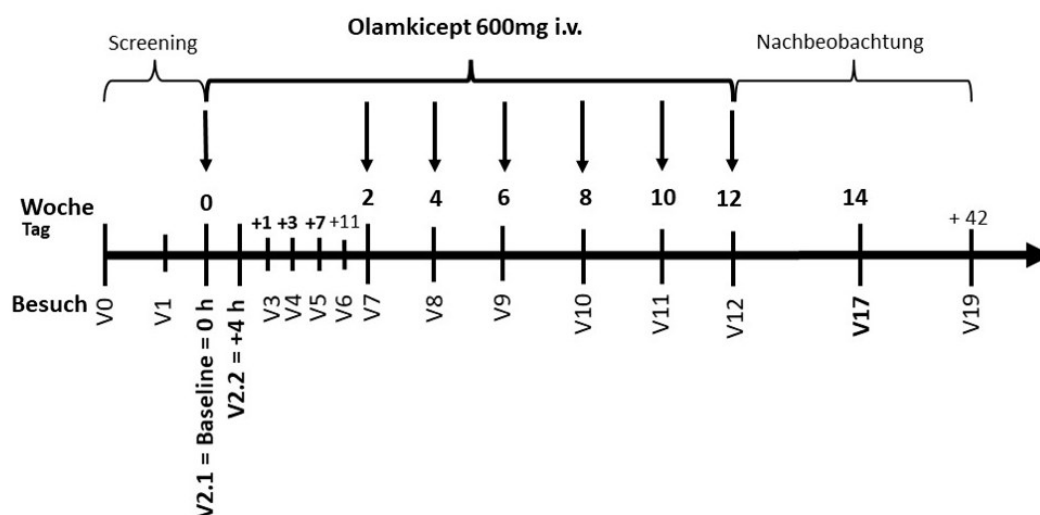


Abbildung 3: Studienablauf als Zeitstrahl

Darstellung der drei Studienphasen: Screening, 12-wöchige Medikationsgabe von Olamkicept im zweiwöchigen Intervall, 42-tägige Nachbeobachtungszeit. Die Studienbesuche sind als Studienzeitpunkte (Visit = Besuch V0 bis V19) mit zugehöriger Zeitangabe (Tage, Wochen) angegeben. Die Pfeile markieren die Medikationsgaben.

Nachdem die Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme (Anhang 2) überprüft und die Probanden aufgeklärt wurden, stimmten sie ihrer Teilnahme in schriftlicher Form zu. Von initial 34 rekrutierten Probanden wurden 20 in die Screening-Phase aufgenommen. Am Startpunkt 0 h = Baseline = V2.1 wurden 16 Probanden in die Studie eingeschlossen. Hier erhielten die Probanden die erste Dosis von 600 mg Olamkicept intravenös. Bereits vier Stunden später (V2.2 = +4 h) erfolgte die erste Datenerhebung mit im Körper verteilten Medikament. An den folgenden Besuchen (+24 h, +3 d, +2 w, +4 w, +6 w, +8 w, +10 w, +12 w) wurde die Verabreichung von Olamkicept unter Beobachtung von Nebenwirkungen und eine umfassende Datenerhebung fortgeführt. Diese Datenerhebung wurden anhand eines standardisierten Studienprotokolls, der *Case Report Form* erhoben. Das Studienprotokoll wurde vom *Zentrum für klinische Studien* (Kiel) sowohl erstellt als auch ausgewertet.

Um Therapieansprechen und molekulare Mechanismen zu untersuchen, wurden über den Studienzeitraum zum einen klinische Symptome erhoben, zum anderen wurden Proben aus Stuhl, Blut und Darm (Sigmoid) entnommen und nach Studienende auf multimodale Weisen analysiert. Verschiedene laborchemische Parameter wurden im *Zentrallabor des UKSH* (Kiel), im *Institut für klinische Molekularbiologie* (Kiel) und in der *Arbeitsgemeinschaft Laudes* (Kiel) anhand von Routineprotokollen bestimmt.

2.2 Olamkicept

Olamkicept soll den Komplex aus IL-6/sIL-6R selektiv binden, wodurch IL-6 trans-signaling als chronischer Entzündungsvermittler inhibiert werden soll. Für diese Studie wurde die bisherige Variante von sgp130-Fc bzw. Olamkicept um stabilisierende Modifikationen (EP1873166B1) erweitert. Olamkicept wurde von der *Firma Ferring Arzneimittel GmbH* in Kollaboration mit *Lonza* hergestellt. Über den gesamten Studienzeitraum wurden die Probanden bezüglich unerwünschter Wirkungen (anhand des *Medical Dictionary for Regulatory Activities*, Version 21.0) engmaschig beobachtet.

2.3 Beschreibung der Kohorte

16 Patienten (CU: n=9, MC: n=7) wurden in die prospektive Interventionsstudie eingeschlossen. Die mediane Erkrankungsdauer betrug für die MC-Probanden sechs und bei CU-Probanden vier Jahre. Das Alter der Kohorte lag im Durchschnitt bei 26 Jahren (21 bis 66 Jahre). Es waren elf weibliche und fünf männliche Teilnehmer, ein Raucher und drei ehemalige Raucher. Komplikationen waren bisher bei einem Patienten in Form von Fisteln aufgetreten und drei Probanden wurden bereits chirurgisch behandelt (Darmresektion, Abszessspaltung). Als bisherige Behandlungsversuche wurden Lokalthapien (n=6) oder Therapien mit Azathioprin (n=8) sowie mit Biologika (n=7) durchgeführt. Fünf Probanden wurden bereits mit einem Biologikum, ein Patient mit zwei verschiedenen und ein Teilnehmer mit drei unterschiedlichen Biologika vorbehandelt (Tabelle 2).

Charakteristikum	Anzahl
Morbus Crohn (MC) (n)	7
Colitis ulcerosa (CU) (n)	9
Mediane Erkrankungsdauer (a)	MC: 6; CU:4
medianes Alter (a)	26
Geschlecht (n)	♀:11; ♂:5
Ex-Nikotinabusus	3
Raucher/innen (n)	1
Fisteln (n)	1
Chirurgische Intervention (n)	3
Lokalthapie (n)	6
Immunsuppression (n)	8
Biologika (n)	7

Tabelle 2: Charakteristika der Kohorte am Ausgangspunkt der Studie.

Während des Studienzeitraumes war die Einnahme von Glukokortikoiden auf 20 mg Prednison-Äquivalent pro Tag limitiert. Patienten, welche dauerhaft Immunsuppressiva oder Aminosalicylate einnahmen, nahmen diese über den gesamten Studienzeitraum in fester Dosierung weiter ein.

Bei Studienbeginn präsentierten die Probanden moderat bis schwer aktive Darmentzündungen. Fünf Probanden befanden sich in einem aktiven Krankheitsrezidiv, während die anderen an chronisch aktiven Darmentzündungen litten.

2.4 Pharmakokinetik und STAT3-Assay

Um zu untersuchen, ob und in welchen Konzentrationen Olamkicept im Blut nachweisbar ist, wurden pharmakokinetische Analysen über den Studienzeitraum durchgeführt.

Mit dem pSTAT3/STAT3 - Assay wurde untersucht, ob die STAT3-Aktivierung in Blutzellen über die zielgerichtete Hemmung von IL-6 trans-signaling durch Olamkicept reduziert werden kann. Dafür wurden peripher monozytäre Blutzellen (*peripheral blood monocyte cells*, PBMC) verwendet. PBMC sind aus dem Blut isolierte Immunzellen mit runden Zellkernen (z.B. Lymphozyten, Monozyten, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen). Rote Blutzellen und Granulozyten zählen hingegen nicht zu den PBMC (97). Für den STAT3-Assay wurden an 0 h, +4 h, +4 w und +14 w Blutproben entnommen. Der Assay war in zwei Testserien unterteilt: In der ersten Testreihe sollte untersucht werden, ob Olamkicept mit der Inhibition von IL-6 trans-signaling einen Einfluss auf die pSTAT3/STAT3 - Expression in PBMC hat. Dafür wurde das native (natürliche) Konzentrationsverhältnis der pSTAT3/STAT3 - Expression in PBMC über den Studienzeitraum quantifiziert.

In der zweiten Testreihe sollte in vitro das *target engagement*, also die zielgerichtete biologische Wirksamkeit von Olamkicept überprüft werden. Es wurde untersucht, ob Olamkicept in humanen PBMC die STAT3-Phosphorylierung von künstlich evoziertem IL-6 trans-signaling spezifisch hemmen kann. Hierfür wurden die Blutproben in vitro mit rekombinant hergestellten IL-6/sIL-6R - Komplexen (hyper-IL-6) stimuliert und daraufhin die pSTAT3/STAT3 - Konzentrationen bestimmt. Hyper-IL-6 (hIL-6) initiiert trans-signaling 100 bis 1000-fach potenter als körpereigene IL-6/sIL-6R - Komplexe (98).

Beide Testreihen wurden mittels Anweisungen der *Standard Operating Procedure* vom *Conaris Versuchsinstitut AG* (Kiel) im IKMB mit Duplikaten als Kontrolle durchgeführt. Zuerst wurde eine der Versuchsreihen mit hyper-IL-6 stimuliert. Die PBMC wurden durch mehrfache Zentrifugation und Behandlung mit *phosphate buffered saline* (*Gibco / ThermoFisher*, Weltham, Massachusetts, USA) aus dem Blut isoliert. Daraufhin wurden die isolierten Zellen lysiert und zentrifugiert, um die intrazellulären Proteine zu separieren. Dieses intrazelluläre Proteingemisch wurde in einem *Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert (Mikrotiterplatten: PathScan ELISA for P-STAT3/STAT3: a) 7300 S, PathScan P-Stat3 (Y705) Sandwich ELISA Kit; b) 7305 S PathScan Total Stat3 Sandwich ELISA Kit (*Cell Signaling*

Technology, Danvers und Bosten, USA)). Sandwich-ELISAs ermöglichen die Quantifizierung von Molekülen, indem sie Antigene durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion detektieren (99).

Für die Konzentrationsbestimmung von den Antigenen a) pSTAT3 und b) STAT3 wurden jeweils primäre Antikörper hinzugefügt, welche a) an pSTAT3 banden (Phospho-STAT3 (Tyr705) Mouse Monoclonal Antibody, Cell Signaling Technology) und b) an STAT3 banden (STAT3 Mouse Detection Antibody, Cell Signaling Technology). Im nächsten Schritt wurden sekundäre Antikörper hinzugefügt, welche an die primären Antikörper banden. An den sekundären Antikörpern ist ein Enzym gebunden, welches durch eine Enzymreaktion einen sichtbaren Farbumschlag bewirkt. Darüber wurden mittels optischer Absorption (bei 450 nm) die Konzentrationen von pSTAT3 und STAT3 in PBMC bestimmt.

2.5 Bestimmung von Entzündungsaktivitäten

Um ein antientzündliches Therapieansprechen von Olamkicept möglichst umfassend einschätzen zu können, wurden Untersuchungen von entzündlich assoziierten Parametern durchgeführt. Dazu zählen klinische, biochemische, endoskopische, histologische und immunhistochemische Analysen.

2.5.1 Klinische Entzündungsparameter

Um die klinische Symptomatik im Verlauf beurteilen zu können, wurden die in der Einleitung erwähnten klinischen Indizes zur Einschätzung der Krankheitsaktivität bestimmt. Für MC wurden der CDAI und der HBI bestimmt, für CU der Mayo-Score. Eine Auflistung der für die Indizes verwendeten Parameter ist im Anhang 1 ersichtlich. Anhand dieser CED-Indizes wurde die Kohorte hinsichtlich klinischer Remission und Nicht-Remission sowie klinischer Response und Non-Response eingeteilt (siehe Kapitel 2.7).

2.5.2 Biochemische Entzündungsparameter

Um die biochemischen Entzündungsaktivität im Verlauf beurteilen zu können, wurden verschiedene Entzündungsmarker aus biologischen Proben bestimmt. Aus Stuhlproben wurde fäkales Calprotectin quantifiziert und aus Blutproben wurden CRP, Interleukin-6 und die Anzahl der Leukozyten (weiße Blutkörperchen) bestimmt.

2.5.3 Endoskopische Entzündungsparameter

Um die mukosale Entzündungsaktivität im Darm makroskopisch zu beurteilen, wurden endoskopische Untersuchungen durchgeführt. Für MC wurde der SES-CD erhoben, bei CU ist im Mayo-Score eine endoskopische Untersuchung mitenthalten. Der Mayo-Score wird in dieser Dissertation bei den klinischen Parametern aufgeführt, da er für Zielpunkt klinische Remission verwendet wurde. Eine direkte Vergleichbarkeit der endoskopischen Entzündungsaktivität von MC und CU ist somit leider erschwert.

2.5.4 Histologische und immunhistochemische Entzündungsparameter

Um den Einfluss von Olamkicept auf entzündliche Prozesse in der Darmmukosa mikroskopisch zu beurteilen, wurden histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt. Histologisch wurde für CU der Nancy-Index bestimmt. Für MC gibt es leider keinen validierten histologischen Index (46). Aus diesem Grund wurde für Patienten mit MC der endoskopische SES-CD und für CU der Nancy-Index bestimmt.

Um die intestinale Entzündungsaktivität bei MC und CU möglichst genau zu beurteilen, wurden verschiedene entzündlich assoziierte Biomoleküle immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch quantifiziert. So wurden das Vorliegen von aktiviertem STAT3 (pSTAT3), von Proliferation und von drei Immunzellgruppen in der Darmmukosa beurteilt.

Die für die histologischen und immunhistochemischen verwendeten Darmproben wurden aus dem Sigmoid an zehn Studienzeitpunkten endoskopisch entnommen und standardgemäß in zehn-prozentigem Formalin fixiert. Sobald alle Proben gesammelt waren, wurden sie mit freundlicher Unterstützung des Pathologischen Instituts des UKSH (Prof. Röcken, Campus Kiel) anhand standardisierter Routineprotokolle zu den gewünschten histologischen und immunhistochemischen Färbungen verarbeitet.

Im Institut für Pathologie wurde zunächst die Fixierungslösung aus den Biopsien gewaschen, um sie daraufhin mit einer in der Konzentration ansteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 % Ethanol) zu dehydrieren. Nachdem die Gewebeproben in Xylol inkubiert wurden, wurden sie in Paraffin eingebettet und auf einer Kühlungsplatte (*COP 30, MEDITE* Burgdorf, Deutschland) gekühlt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke mit dem halbmotorischen Rotationsmikrotom (*Leica RM 24245*, Wetzlar, Deutschland) zu dünnen Schnitten geschnitten. Diese wurden bei 57 °C für zwölf Stunden in einem Brutschrank (*BINDER*, Tuttlingen,

Deutschland) inkubiert, um am Folgetag sechs verschiedene Färbungen pro Biopsie herzustellen: eine Hämatoxylin-Eosin- (HE) und fünf immunhistochemische Färbungen (100).

Die HE-Schnitte wurden in einem vollautomatisierten Färbeautomaten (*Varistain 24-4, Shandon, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland*) angefertigt. Als Farblösung wurden eine Hämalaulösung nach Mayer aus kristallisiertem Hämatoxylin (C.I. 75290, *Merck KGaA, Darmstadt*) und aus einer Eosinlösung (25g Eosin G (C.I. 45380, *Merck KGaA*)) in fünf Liter 96 prozentigem Alkohol hergestellt (100). Die histologischen Untersuchungen der HE-Präparate wurden in der Routinediagnostik des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Kiel mittels histopathologischer Bewertungskriterien beurteilt. Hier wurde der Nancy-Index für die Patienten mit CU bestimmt.

2.6 Immunhistochemie

Im Prinzip beruht die Immunhistochemie (IHC) auf einer Antigen - Antikörper - Reaktion und ermöglicht eine spezifische Darstellung bestimmter Moleküle in Gewebeproben. An darzustellende Strukturen (Antigene) binden spezifische Antikörper (Antigen-Antikörper-Bindung). Nach erfolgter Bindung des Antikörpers wird das Antigen durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht (101).

Mithilfe der Immunhistochemie wurden in dieser Studie verschiedene entzündlich assoziierte Moleküle im Darm dargestellt. Es wurden immunhistochemische Färbungen mit fünf verschiedenen Antikörpern angefertigt, welche die Antigene **pSTAT3**, **Kiel-67 (Ki-67)**, **Cluster of Differentiation 3 (CD3)**, **Cluster of Differentiation 68 (CD68)** und die **Myeloperoxidase (MPO)** anfärbten. Die zelluläre Expression, also die Ausbildung dieser Moleküle/Antigene in oder auf den Zellen, wurde über den Therapiezeitraum quantifiziert. Damit sollen die mukosalen Entzündungsprozesse und mögliche antientzündliche Prozesse bei Therapieansprechen auf Olamkicept beurteilt werden.

2.6.1 Immunhistochemisch dargestellte Moleküle: pSTAT3, Ki-67, CD3, CD68, MPO

(p)STAT3 ist das benannte Zielmolekül, auf das Olamkicept über die Hemmung von IL-6 trans-signaling einwirken soll und damit der Aktivierung von STAT3 zu pSTAT3 entgegenwirken soll.

Ki-67 ist ein intrazelluläres Protein, welches von proliferierenden Zellen im Zellkern exprimiert wird. Somit ist Ki-67 ein Marker für Zellteilung und steht im Zusammenhang mit Geweberegeneration und Wundheilung sowie auch mit Tumorwachstum (102, 103). Ki-67 wird von Herwig et al. als Marker für proliferative Aktivität an Orten der Entzündung beschrieben (104).

CD3 ist ein Oberflächenmolekül von T-Lymphozyten (T-Zellen), die eine Untergruppe von Entzündungszellen der erworbenen Immunabwehr darstellen. Es gibt T-Helferzellen und T-Effektorzellen mit jeweils weiteren Untergruppen, welche unterschiedliche Funktionen in der erworbenen Immunantwort einnehmen und alle das Molekül CD3 auf ihrer Oberfläche exprimieren (105, 106).

CD68 ist ein Glykoprotein in der Zellmembran, welches von Makrophagen und deren Vorstufe, den Monozyten, exprimiert wird. Makrophagen phagozytieren („fressen“) mikrobielle Erreger oder defekte Zellen und präsentieren phagozytierte Antigene auf ihrer Zellmembran. Wenn sie den T-Zellen gewisse Antigene präsentieren, kann dadurch eine spezifische Immunantwort der T-Zellen eingeleitet werden. In immunhistochemischen Färbungen wird CD68 als Marker für Entzündung klassifiziert, da Entzündungen mit dem Vorliegen von Monozyten/Makrophagen einhergehen (107, 108).

MPO ist ein zytoplasmatisches Enzym von Neutrophilen Granulozyten, welche Entzündungszellen der akuten, angeborenen Immunabwehr sind. Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle in der Abtötung von Erregern, indem sie beispielsweise reaktive Sauerstoffradikale produzieren. Außerdem fungieren Neutrophile auch als phagozytierende Zellen. Es wurde gezeigt, dass MPO ein lokaler Mediator von Gewebeschädigung ist und Entzündung fördert. Eine MPO-Aktivität kann als Surrogat Marker für Entzündung verwendet werden (109–111).

2.6.2 Methodik der Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem vollautomatischen Färbeautomaten (*BOND-MAX*, Seriennummer M 211566, *Leica Biosystems*, Wetzlar/Nussloch, Deutschland) anhand von Routineprotokollen hergestellt. Die dafür notwendigen Lösungen und Waschlösungen sind in dem zum Gerät passenden *Kompakt-Polymer-Detektionssystem*

(*BOND-Polymer Refine Detection Red*, Leica Biosystems) (112) enthalten.

Zuerst wurde das Paraffin mit einer entparaffinierenden Lösung (DeWax Solution, Leica Biosystems) aus den Schnitten gelöst. Abhängig von dem verwendeten Antikörper, wurden die Schnitte unterschiedlich vorbehandelt (Anhang 3). Hierbei handelte es sich vorwiegend um eine 10- bis 20-minütige Inkubation mit kochendem 10 mM Citratpuffer (LabVision Katalognummer AP 9003, Thermo Scientific) und einer darauffolgenden Abkühlung von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die primären Antikörper mussten vor Anwendung in bestimmten Konzentrationsverhältnissen mit einer Verdünnungslösung (Bond Primary Antibody Diluent, Leica Biosystems) verdünnt werden (Anhang 3). Anschließend wurden die primären Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den Gewebeschnitten inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt, welcher an die primären Antikörper band. Dabei lokalisierte das Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz primäre Mausantikörper und das Poly-HRP-IgG-Reagenz primäre Kaninchenantikörper (beide im *BOND-Polymer Refine Detection Red* enthalten). Am sekundären Antikörper ist ein Enzym, eine Peroxidase, gebunden. Unter Zugabe des Substrats der Peroxidase, 3,3'-Diaminobenzidtetrahydrochloridlösung Hydrat, entstand durch eine enzymatische Reaktion ein lichtmikroskopisch braun sichtbares Präzipitat, welches das gewünschte Antigen (z.B. pSTAT3 oder Ki-67) markierte. Nachdem die Zellkerne mit HE gegengefärbt wurden, wurden die Präparate mit Pertex (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) und einem Deckglas (Th. Geyer, Hamburg, Deutschland) zu einem Dauerpräparat eingefasst. Mit der Immunhistochemie wurden die Expressionen der Antigene pSTAT3, Ki-67, CD3, CD68 und MPO in den intestinalen Gewebeschnitten dargestellt (100).

2.6.3 Auswertung der immunhistochemischen Präparate

Jedes Präparat hatte eine zugewiesene Journalnummer, welche nach der Auswertung Auskunft über den Patienten und den Studienzeitpunkt gab. Ausschließlich mit dieser Nummer wurden die zufällig sortierten Schnitte ausgewertet, wodurch eine Verblindung und eine Randomisierung gewährleistet wurde.

Die immunhistochemischen Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (*Axiolmager Z1*, Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet. Mit einer Kamera (*Axiocam HrC/HrM*, Zeiss) und der zugehörigen Software (*AxioVision* Version 08/2013, Zeiss) wurden von jedem Präparat fünf Fotos als technische Replikate aufgenommen. Dabei wurden die Fotos 400-fach (40x durch

das Objektiv, 10x durch das Okular) vergrößert aufgenommen. Es wurden fünf großflächig verteilte, repräsentative Blickfelder aus den Schnitten ausgewählt und die Gewebeschichten Epithel und Lamina propria wurden stets abgelichtet. In Abbildung 4 sind zwei beschriftete, immunhistochemische Präparate ersichtlich. Darmzotten bzw. Darmkrypten wurden im Längs- und im Querschnitt fotografiert. Eine Ausnahme hiervon galt für die Auswertung der Ki-67-Expression: In dieser wurden ausschließlich Längsanschnitte fotografiert, da Ki-67 entlang der Kryptachse unterschiedlich stark exprimiert ist. Vor allem in entzündlichen und in dysplastischen Stadien, aber auch in Zonen von Wundheilung erhöht sich die Anzahl von proliferierenden Zellen entlang der Kryptachse (113, 114).

Ungeeignete Präparat Anteile wie z.B. überfärbte oder zerrissene Abschnitte wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt wurde eine intern möglichst konsistente fotografische Darstellung der Gewebeschnitte angestrebt.

Für die Auszählung der angefärbten Antigene wurde das Programm *ZEN blue* (ZEN 2.5, Zeiss) verwendet. Dessen Programmfunktion *best fit* optimierte die Bildqualität. Für die Auszählung wurden die Fotos auf 96 % vergrößert und ein Gitternetz wurde als Orientierungshilfe aufgelegt. Als Zählhilfe wurde eine App (Click Counter 1.4, *Google Commerce Ltd.*, Mountain View, Kalifornien, USA) verwendet. Die Auszählungsergebnisse wurden, nach Färbung und Journalnummer sortiert, in einer Exceltabelle dokumentiert.

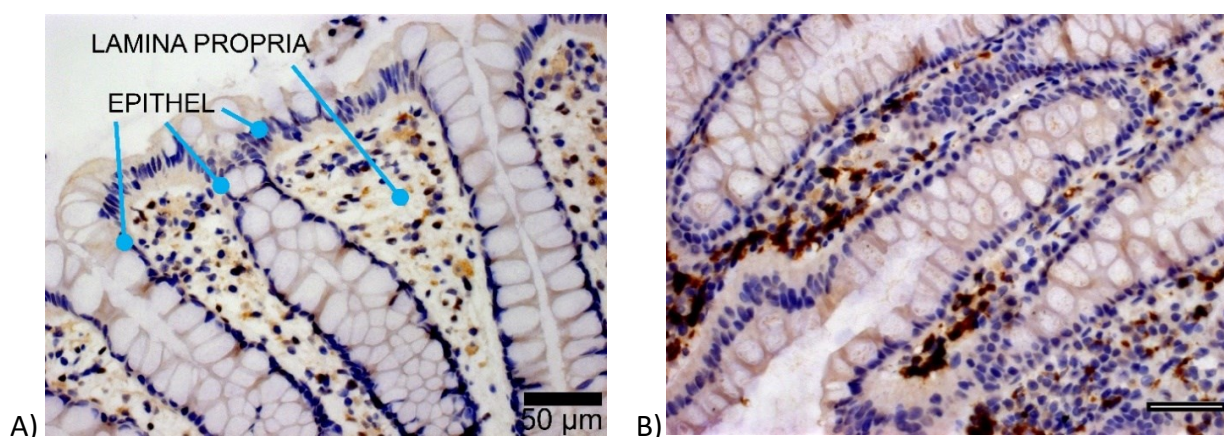


Abbildung 4: Immunhistochemische Präparate

Beispielhaft sind zwei lichtmikroskopisch aufgenommene Präparate dargestellt. Die Darmkrypten sind im Längsschnitt angeschnitten. In A) wurde pSTAT3 immunhistochemisch angefärbt und ist als braunes Präzipitat zu erkennen. Die Epithelzellschicht sowie die darunter liegende Lamina propria sind

gekennzeichnet. In Abb. B) wurde CD68 angefärbt und ist als braunes Präzipitat erkenntlich. Als Maßstab wurde in beide Abbildungen ein 50 µm Balken eingezeichnet.

In den pSTAT3- und Ki-67-Präparaten wurde eine relative Zählweise angewandt, da es bei diesen Färbungen um einen Ausdruck von Zellaktivität geht. Dafür sind relative Bezugswerte notwendig. CD3, CD68 und MPO wurden als spezifische Zellgruppenmarker als Ausdruck für das Vorliegen der jeweiligen Zellart in absoluter Zählweise gezählt. In der relativen Zählweise wurden je 100 Zellen abgezählt und davon der pSTAT3- bzw. Ki-67-positiv gefärbte Zellanteil notiert. Dieses Zählverfahren wurde in diesen zwei Färbungen jeweils für die Zellen in der Epithelzellschicht und für die Zellen in der Lamina propria angewendet. In Abbildung 4 sind Epithelschicht und Lamina propria zum besseren Verständnis gekennzeichnet. Die getrennte Auszählung dieser zwei Gewebeschichten hat folgenden Hintergrund: Epithel und Lamina propria unterscheiden sich in ihrer zellulären Zusammensetzung und damit in ihrer zellulären Aktivität. Intestinale Epithelzellen haben vielfältige Funktionen: Sie sind u.a. Teil der intestinalen Barriere zwischen Darmlumen und Darmzellen, sie resorbieren Nahrungsbestandteile und Wasser, sie spielen eine große Rolle in der Koordination der intestinalen Immunantwort (115). In dieser Dissertation wurde untersucht, wie stark intestinale Epithelzellen proliferieren (epitheliale Ki-67-Expression) und in welchem Maß STAT3 in ihnen in aktivierter Form (epitheliale pSTAT3-Expression) vorliegt.

Die Lamina propria liegt unterhalb der Epithelschicht und ist ein zellreiches Bindegewebe mit vielen freien Abwehrzellen (116). Auch in der Lamina propria wurde das Proliferationsverhalten der Zellen (Ki-67 - Expression) und die STAT3-Aktivierung untersucht. In den Färbungen CD3, CD68 und MPO wurden die positiv angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld (*high power field* (HPF)) ausgezählt und damit das Vorliegen der drei Zellgruppen T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten analysiert.

Alle Präparate wurden nach einem intern möglichst konsistenten Schema ausgewertet. Artefakte sowie unübersichtliche Zell - und Gewebearrangierungen wurden von der Auszählung ausgeschlossen. Als interne Qualitätskontrolle der Zählweise wurden Präparate stichprobenartig zweifach ausgezählt und die Konsistenz wurde dabei mit leichten Abweichungen sichergestellt. Nachdem die Auszählung beendet war, wurde die Verblindung aufgehoben, indem die Journalnummern den jeweiligen Patienten und Studienzeitpunkten zugeordnet wurden. Dabei wurde zugleich die Vollständigkeit der Daten überprüft.

Somit wurde mit der immunhistochemischen Analyse die Entwicklung von insgesamt sieben

mukosalen Entzündungsparametern ausgewertet: die pSTAT3-Expression im Epithel, die pSTAT3-Expression in der Lamina propria, die Ki-67-Expression im Epithel, die Ki-67-Expression in der Lamina propria, die CD3-, CD68- und MPO-Expression).

Idealerweise sollten 800 Präparate ausgezählt werden: fünf Färbungen (bzw. sieben immunhistochemische Entzündungsparameter) an zehn Studienzeitpunkten für 16 Probanden. Dabei wurden von jedem Präparat fünf Fotografien als technisches Replikat ausgezählt, womit 5600 Zählwerte erhoben werden sollten, die sogenannten Rohdaten. Aus den Rohdaten wurden anschließend Mediane für jeden Probanden an dem jeweiligen Studienzeitpunkt für den jeweiligen Parameter errechnet. Aus diesen „patienteneigenen“ Medianen wurden anschließend Mediane der jeweiligen Parameter für die Remissions- und für die Nicht-Remissionsgruppe errechnet. Diese Mediane wurden für die statistischen Analysen verwendet und sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (siehe Anhang 4D).

2.7 Definition von klinischer Remission und klinischer Response

Um ein Therapieansprechen zu beurteilen, ist eine Definition von Remissionsverhalten notwendig. Als primärer Endpunkt wurde in dieser Studie (I) das klinische Remissionsverhalten zum Zeitpunkt +14 w festgelegt. Weiterhin galt es (II) das klinische Responseverhalten zum Zeitpunkt +14 w zu untersuchen.

(I) Die Definition von klinischer Remission beinhaltet für CU einen Mayo-Score ≤ 2 Punkten und für MC einen CDAI von <150 Punkten.

(II) Die Definition von klinischer Response beinhaltet für CU eine Reduktion des Mayo-Scores ≥ 3 Punkte und für MC eine Reduktion des CDAI um >100 Punkte.

2.8 Statistische Auswertungen

Um die Entzündungsaktivitäten aus den erhobenen Parametern zu bewerten, wurden statistische Analysen kalkuliert. Hierfür wurde die Kohorte in eine Remissions- und Nicht-Remissionsgruppe unterteilt. Die Entzündungsaktivitätsparameter der Gruppen wurden miteinander verglichen und hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht, um ein differentes Therapieansprechen zu bewerten. Desweiteren wurden die Entzündungsaktivitätsparameter der Kohorte gruppenübergreifend bezüglich signifikanter Assoziationen untersucht, um damit die Validität der Parameter einzustufen.

Es ist vorab wichtig zu sagen, dass aufgrund der geringen Probandenanzahl n und der klinischen Phase IIa mit dem Ziel der Testung von Sicherheit und Verträglichkeit, keine Unterscheidung zwischen Therapieansprechen bei Probanden mit MC und bei Probanden mit CU vorgenommen wurde.

Die statistischen Analysen wurde mit der Software *Graph Prism* (Version 5.03, GraphPad Software) durchgeführt.

2.8.1 Definition der Baseline

In kleinen Kohorten ist es günstig, möglichst viele Datenpunkte in die statistische Auswertung einzubeziehen, damit der Fehler 2. Art vermieden wird (117). In der immunhistochemischen Datensammlung gab es Daten von drei Zeitpunkte vor Therapiebeginn (V_0 , V_1 , $V_{2.1} = 0$ h). Keiner der drei Zeitpunkte hatte vollständige immunhistochemische Daten aller Probanden. Daher wurde überlegt, wie die *Baseline*, also die Ausgangslage „vor Therapiebeginn“ definiert werden sollte, um Daten von möglichst vielen Probanden einzubeziehen. So kamen drei Varianten als Baseline ((I)-(III)) in Betracht. Die Anzahl von Probanden, die in die jeweilige Baseline einfluss, ist im Anhang 4E unter den Summenzeichen (Σ) angegeben.

- (I) nahm allein Werte vom Zeitpunkt $V_{2.1} = 0$ h als Ausgangslage an,
- (II) setzte bei fehlenden 0 h - Werten Werte von V_1 ein und
- (III) ergänzte V_0 - Werte bei fehlenden Daten von 0 h und V_1 .

Mit diesen drei Varianten (I)-(III) wurden die statistischen Analysen kalkuliert, wobei auffiel, dass keine relevanten Unterschiede zwischen den statistischen Ergebnissen vorlagen (Anhang 4E). Deshalb wurde entschieden in dieser Dissertation allein Variante (I) darzustellen und damit Daten von 0 h (= $V_{2.1}$ = Baseline) bis +14 w (= V_{17}) darzustellen.

2.8.2 Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Um zu untersuchen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Entzündungsaktivitätsparametern der Remissions- und der Nicht-Remissionsgruppe existierten, wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für nicht-parametrische Verteilungen mit gepaarten Daten kalkuliert. *Nicht-parametrisch* war die Verteilung, da die Stichprobe klein war und *gepaart*, da die Untersuchung durch die Studienzeitpunkte sortiert

war. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. (W) gab die Rangsumme an.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde für die Auswertung der klinischen, biochemischen, histologischen sowie immunhistochemischen Parameter angewendet.

Als Nullhypothese wurde postuliert, dass es hinsichtlich der untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen der Remissions- und der Nicht-Remissionsgruppe gibt.

2.8.3 Spearman-Rangkorrelationen

Um Assoziationen zwischen den klinischen, biochemischen und histologischen und den immunhistochemischen Ergebnissen (z.B. pSTAT3-Expression im Epithel) zu untersuchen, wurden zweiseitige Spearman-Rangkorrelation für nicht-parametrische Daten angewendet. Damit sollte die Validität der untersuchten Entzündungsparameter unter Olamkicept geprüft werden. Als Nullhypothese wurde postuliert, dass keine signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten klinischen, biochemischen und histologischen Parametern und den immunhistochemischen Parametern vorlagen.

Außerdem wurden Korrelationen zwischen der pSTAT3/STAT3 - Expression in PBMC und den klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen Parametern mit der Spearman-Rangkorrelation untersucht. Dabei interessierte insbesondere ein möglicher Zusammenhang zwischen der pSTAT3-Expression im Blut und der pSTAT3-Expression in der Darmmukosa. Als Nullhypothese wurde postuliert, dass es keine signifikanten Korrelationen zwischen der pSTAT3/STAT3 - Expression und den klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen Parametern gab. Insbesondere wurde postuliert, dass es keine signifikanten Korrelationen zwischen der pSTAT3-Expression im Blut und der in der Darmmukosa gibt.

Für die Spearman-Rangkorrelationen wurden die Medianwerte der einzelnen Probanden an allen Studienzeitpunkten gruppenübergreifend verwendet. Für die Bewertung der Korrelationen präsentiert der Pearsons-Korrelationskoeffizient r_s die Stärke der Korrelation und ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

3 Ergebnisse

Ziel der Dissertation war es, die Entzündungsaktivität bei Patienten mit CED unter der Therapie mit Olamkicept anhand von verschiedenen Entzündungsparametern zu beurteilen. Es wurden klinische, biochemische, endoskopische, histologische und immunhistochemische Entzündungsparameter erhoben, anhand derer eine Remissionsinduktion bzw. ein Therapieansprechen beurteilt wurde. Es wurde analysiert, ob die jeweiligen Entzündungsparameter signifikante Unterschiede zwischen der klinischen Remissions- und der klinischen Nicht-Remissionsgruppe darboten.

Des Weiteren sollte die Validität/Verwendbarkeit der Entzündungsaktivitätsparameter unter Olamkicept-Therapie überprüft werden. Dafür wurden Korrelationen zwischen den klinischen, biochemischen und histologischen Entzündungsparametern und den mukosalen Entzündungsparametern durchgeführt.

3.1 Studienverlauf

Insgesamt wurden an der Baseline (V2.1 = 0h) 16 Probanden in die Studie eingeschlossen (CU, n=9; MC, n=7). Während der Studie beendeten sechs Probanden frühzeitig die Studienteilnahme. Gründe hierfür waren Krankheitsaggravation (n=5) oder Studienrückzug (n=1). Somit wurden zehn Patienten (MC n=5, CU n=5) über 12 Wochen mit Olamkicept behandelt. Anzumerken ist, dass die Datenerhebung teilweise unvollständig war. Für eine gute Transparenz ist im Anhang die Probandenanzahl n, die in die jeweilige Medianerhebung einfluss, unter dem Summenzeichen Σ angegeben (Anhang 4).

3.2 Klinisches Remissions- und Responseverhalten

Anhand der in Kapitel 2.7 genannten Definitionen wurde das Erreichen der Studienziele klinische Remission und klinische Response bewertet. Die Ergebnisse sind in tabellarischer Form und als Balkendiagramm (Abbildung 5) dargestellt. Drei Probanden erreichten klinische Remission (19 %; CU n=2 (22 %); MC n=1 (14 %)). Alle Probanden mit klinischem Remissionsverhalten erreichten ebenfalls endoskopische Remission und mukosale Heilung (118). Sieben Probanden zeigten klinische Response (44 %; CU n=5 ((56 %); MC n=2 ((29 %)). Somit zeigten sich möglicherweise Hinweise, dass Olamkicept einen etwas größeren therapeutischen Effekt in CU-Patienten hat.

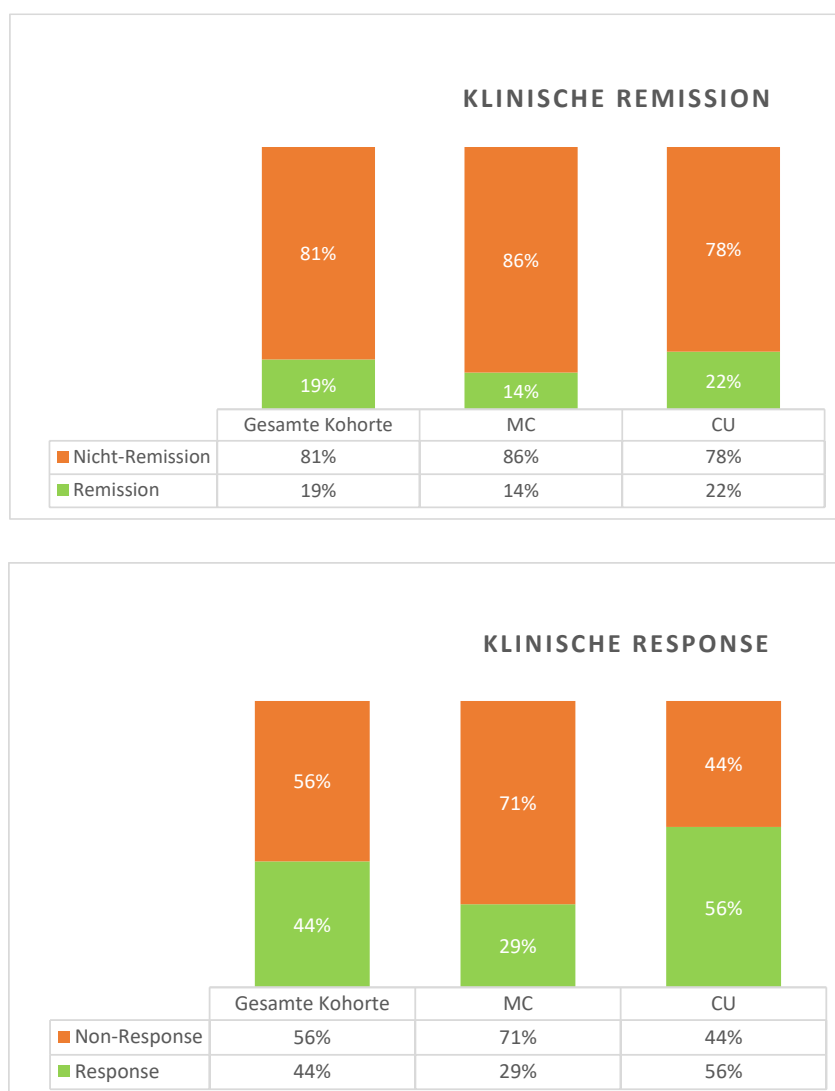


Abbildung 5: Klinische Remission und Response

Die prozentualen Anteile von Remission- und Nicht-Remission bzw. Response- und Non-Response sind im Balkendiagramm dargestellt. Dabei wird zum einen die Remissions- bzw. Response-Induktion der gesamten Kohorte betrachtet (Remission 19 %; Response 44 %) und zum anderen wird zwischen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) unterschieden.

3.3 Pharmakokinetik

Mit der Pharmakokinetik, also den gemessenen Konzentrationen von Olamkicept im Blut, wurde überprüft, ob ein unterschiedliches Therapieansprechen der Gruppen an unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen von Olamkicept gelegen haben könnte. Der Verlauf der Pharmakokinetik von Olamkicept an den Zeitpunkten 0 h, +4 h, +24 h, +2 w, +6 w, +14 w ist in Abbildung 6 ersichtlich.

Die Wirkstoffkonzentrationen von Olamkicept verliefen in beiden Gruppen parallel schwankend und nahezu identisch. Wie erwartet, gingen die Schwankungen mit

Niedrigwerten vor geplanter Olamkicept-Gabe und mit Plasmaspitzenpiegeln nach erfolgter Medikationsgabe einher. Der Plasmaspiegel sank nie unter die Nachweisgrenze, demnach lag stets Wirkstoff im Blut vor. Im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde bestätigt, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen bestand ($W=-2$; $p=0,9375$). Demzufolge kann ein unterschiedliches Therapieansprechen nicht auf unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen zurückgeführt werden.

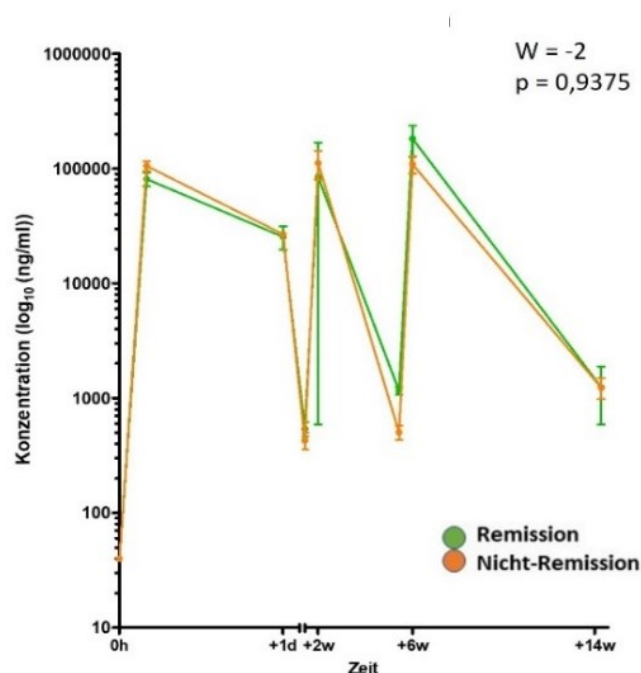


Abbildung 6: Pharmakokinetik über den Therapiezeitraum

Der Verlauf der Plasmakonzentrationen von Olamkicept ist dargestellt. Die Medianwerte der Wirkstoffkonzentration (in log (ng/ml)) und deren zugehörigen Interquartilabstände wurden eingezeichnet. Gruppenübergreifend zeigen sich Plasmaspitzenpiegel nach Olamkicept-Gabe und Niedrigwerte vor geplanter Olamkicept-Gabe. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests werden über die Rangsumme (W) und den p -Wert (p) angegeben und zeigten sich nicht signifikant unterschiedlich.

3.4 STAT3-Assay

Der pSTAT3/STAT3 - Assay untersuchte den Einfluss von Olamkicept auf die STAT3-Aktivierung in Immunzellen des Blutes (PBMC) an den Zeitpunkten 0 h, +4 h, +4 w, +14 w. Der graphische Verlauf ist in Abbildung 7 zu sehen und die erhobenen Medianwerte des gesamten STAT3-Assays sind im Anhang 4A ersichtlich.

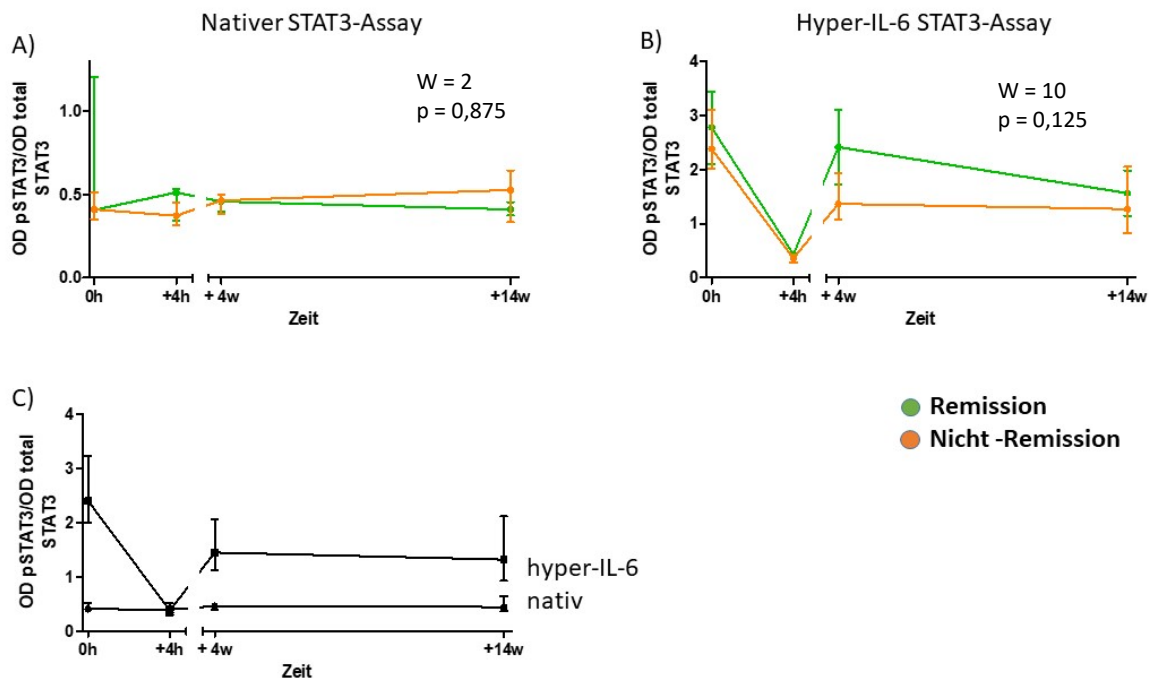


Abbildung 7: STAT3-Assay über den Therapiezeitraum

Die pSTAT3/STAT3-Expression (Medianwerte und Interquartilabstände) in peripher monozytären Blutzellen (PBMC) ist über den Studienzeitraum eingezeichnet. Das Konzentrationsverhältnis von pSTAT3 zu STAT3 ist als Objective Density (OD) angegeben und die Ergebnisse aus dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben.

(A) zeigt, dass die Konzentrationsverhältnisse der nativen Testreihe gruppenübergreifend kaum Veränderungen unterlagen, weshalb ein Einfluss von Olamkicept auf PBMC unwahrscheinlich ist. (B) zeigt die Ergebnisse der in vitro mit hyper-IL-6 stimulierten Testreihe, in der durch die hyper-IL-6 Stimulation zu Beginn deutlich höhere pSTAT3/STAT3-Verhältnisse evoziert wurden, welche bereits kurz nach der ersten Olamkicept-Gabe reduziert wurden. Dies bestätigt die effektive biologische Wirksamkeit von Olamkicept in humanen Zellen. (C) stellt gruppenübergreifend die pSTAT3/STAT3-Verhältnisse aus der nativen Testreihe denen der hyper-IL-6 stimulierten Testreihe gegenüber. Damit soll die durch hyper-IL-6 vermittelte höhere pSTAT3-Expression verdeutlicht werden, welche bereits nach +4 h vollständig durch Olamkicept blockiert werden konnte.

Der erste Versuchsteil analysierte das pSTAT3/STAT3-Konzentrationsverhältnis in nativen, nicht-stimulierten PBMC (Abbildung 7A). Hiermit sollte untersucht werden, ob IL-6 transsignaling möglicherweise eine vermehrte STAT3-Aktivierung in PBMC auslöst, welche wiederum durch Olamkicept blockiert werden könnte.

Beide Gruppen präsentierten zu Beginn einen ähnlichen STAT3-Aktivierungsgrad in PBMC und im Verlauf ziemlich konstant bleibende pSTAT3/STAT3-Verhältnisse. Nach 14 Wochen lag das Konzentrationsverhältnis der Remissionsgruppe unterhalb dessen der Nicht-Remissionsgruppe, was bedeutet, dass eine geringere STAT3-Aktivierung in der Remissionsgruppe vorlag. Über den gesamten Studienzeitraum betrachtet, stiegen die STAT3-Aktivierungen jedoch in beiden Gruppen leicht an: In der Remissionsgruppe um +0,99 % und

in der Nicht-Remissionsgruppe um +29 %. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergab, dass sich die STAT3-Aktivierung in PBMC nicht signifikant zwischen der Remissions- und der Nicht-Remissionsgruppe unterschied ((W)=2; $p=0,875$). Somit hatte Olamkicept keinen reduzierenden Einfluss auf die STAT3-Aktivierung in nativen PBMC. Dies deutet darauf hin, dass IL-6 trans-signaling in Immunzellen des Kompartiments Blut gruppenübergreifend keine relevante STAT3-Aktivierung auslöste.

Der zweite Part des STAT3-Assays basierte auf einer ex vivo Stimulation der PBMC mit hyper-IL-6 (hIL-6). Hyper-IL-6 induziert IL-6 trans-signaling stark. Hiermit wurde die funktionelle Aktivität, das *target engagement*, von Olamkicept untersucht: Kann die durch hIL-6 künstlich vermehrt initiierte STAT3-Aktivierung durch Olamkicept inhibiert werden?

Durch die hIL-6 Stimulation war das pSTAT3/STAT3-Verhältnis an der Baseline gruppenübergreifend sechsmal so hoch wie das der nativen Versuchsreihe (Abbildung 7B). Innerhalb von vier Stunden nach der ersten Olamkicept-Gabe sanken die pSTAT3/STAT3-Konzentrationen in beiden Gruppen erheblich, nämlich um ≥ -85 % (Remission -86 %, Nicht-Remission -85%). Damit reduzierten sie sich auf das pSTAT3/STAT3-Konzentrationsniveau der nativen Testreihe (Abbildung 7C). Demzufolge scheint der Großteil der künstlich zugefügten hIL-6-Komplexe bereits nach +4 h durch Olamkicept „abgefangen“ worden zu sein. Dies geschah unabhängig vom Remissionsverhalten. Warum die pSTAT3/STAT3-Konzentrationen daraufhin wieder anstiegen, bleibt unklar.

Für den hIL-6 stimulierten Teil ergab der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ((W)=10; $p=0,125$). Somit wurde das *target engagement* in vitro remissionsunabhängig nachgewiesen. Es wurde bestätigt, dass Olamkicept künstlich evoziertes IL-6 trans-signaling in humanen Blutzellen erfolgreich inhibiert.

Somit lässt sich festhalten, dass sich die pSTAT3/STAT3-Verhältnisse in PBMC sowohl nativ als auch stimuliert statistisch nicht signifikant zwischen Remission und Nicht-Remission unterschieden. Olamkicept hatte über 14 Wochen keinen reduzierenden Einfluss auf das native pSTAT3/STAT3-Verhältnis. Dies spricht dafür, dass eine STAT3-Aktivierung durch IL-6 trans-signaling in PBMC kaum relevant zu sein scheint. Erfreulicherweise konnte im hIL-6 stimulierten Versuchsteil das *target engagement*, also die zielgerichtete, funktionelle Aktivität von Olamkicept remissionsunabhängig nachgewiesen werden.

3.5 Entwicklung der Entzündungsaktivitäten unter Therapie mit Olamkicept

Für die Beurteilung der klinischen, biochemischen, endoskopischen und histologischen Entzündungsaktivitäten wurden Daten an den Zeitpunkten 0 h, +2 w, +4 w, +6 w, +8 w, +10 w, +12 w, +14 w gesammelt. Im Anhang 4B sind die vollständigen Ergebnisse (Medianwerte) tabellarisch dargestellt.

3.5.1 Klinische Entzündungsaktivität

Um die Entwicklung der klinischen Symptomatik der Probanden unter Olamkicept-Therapie beurteilen zu können, wurden die Krankheitsaktivitäts-Indizes CDAI, HBI und Mayo-Score bestimmt. Diese waren definierend für die Kategorisierung in klinische Remission und Nicht-Remission.

Bei Studienbeginn präsentierten die Probanden gruppenübergreifend moderat bis schwer aktive Darmentzündungen (im Median: CDAI 307 Pkt., HBI 10 Pkt., Mayo 10 Pkt.). Die Remissionsgruppe hatte bei Studienbeginn tendenziell etwas niedrigere klinische Entzündungsaktivitäten als die Nicht-Remissionsgruppe. Die Graphen der klinischen Parameter sind in Abbildung 8 zu sehen.

Bei den Probanden mit Morbus Crohn reduzierte sich der CDAI in der Remissionsgruppe bereits nach zwei Wochen deutlich und stärker, nämlich um -75 %, verglichen mit -11,5 % in der Nicht-Remissionsgruppe. Gleiches gilt für den HBI (Remission -89 %, Nicht-Remission -45 %). Über den gesamten Therapiezeitraum reduzierten sich der CDAI und der HBI ebenfalls deutlich stärker in der Remissionsgruppe: Der CDAI um -94 %, der HBI um -100 %. In der Nicht-Remissionsgruppe stieg der CDAI sogar leicht (+6 %) an. Der HBI reduzierte sich um -35 %. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde für Morbus Crohn sowohl für den CDAI ((W)=-34; p=0,0156) als auch für den HBI ((W)=-36; p=0,0078) kalkuliert.

Bei den Probanden mit Colitis ulcerosa verminderte sich der Mayo-Score in beiden Gruppen bis zur zweiten Woche leicht und dabei stärker in der Nicht-Remissionsgruppe (Remission -7 %, Nicht-Remission -18 %). Bis zur 14. Woche reduzierte sich der Mayo-Score stark, nämlich in der Remissionsgruppe um -87 % und in der Nicht-Remissionsgruppe um -64 %. Für Colitis ulcerosa war der Mayo-Score nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ((W)=-15, p=0,0625), der p-Wert lag allerdings nahe am Signifikanzniveau. Möglicherweise

profitierten bei CU gruppenübergreifend mehr Probanden von der Therapie, weshalb keine Signifikanz kalkuliert werden konnte.

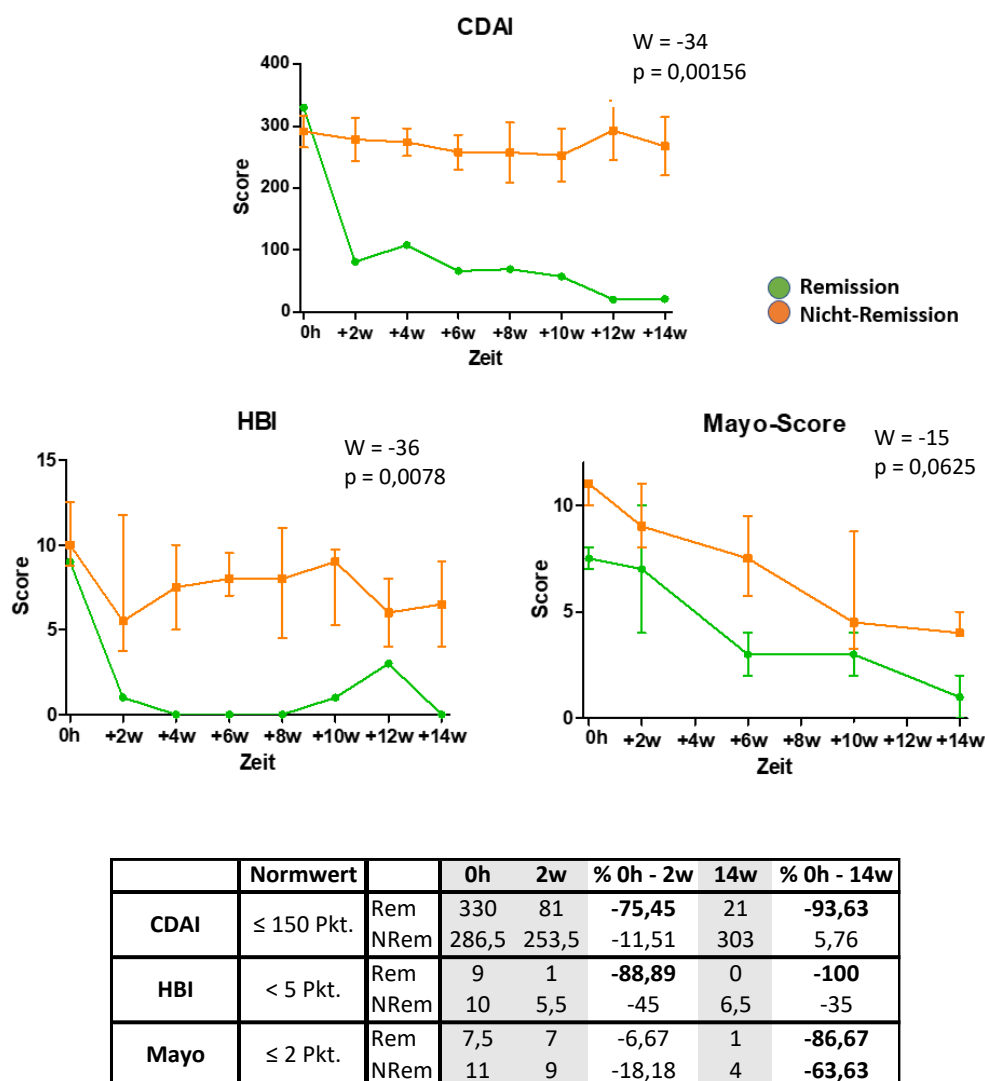


Abbildung 8: Klinische Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum

In dieser Abbildung sind die Verläufe der klinischen Entzündungsparameter (CDAI, HBI für Morbus Crohn und Mayo-Score für Colitis ulcerosa) über den Therapiezeitraum graphisch dargestellt. Die Medianwerte der jeweiligen Gruppe wurden mit den Interquartilabständen eingezeichnet. Jeder Graph wird von den Ergebnissen aus dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert begleitet. Tabellarisch sind darunter die absoluten und relativen Ergebnisse kurz- und langfristig abgebildet, Reduktionen von >50 % sind fett markiert.

Für Morbus Crohn reduzierten sich CDAI und HBI kurz- und langfristig deutlich sowie signifikant stärker in der Remissionsgruppe. Für Colitis ulcerosa reduzierte sich der Mayo-Score langfristig deutlich in beiden Gruppen, dabei nahezu signifikant stärker in der Remissionsgruppe.

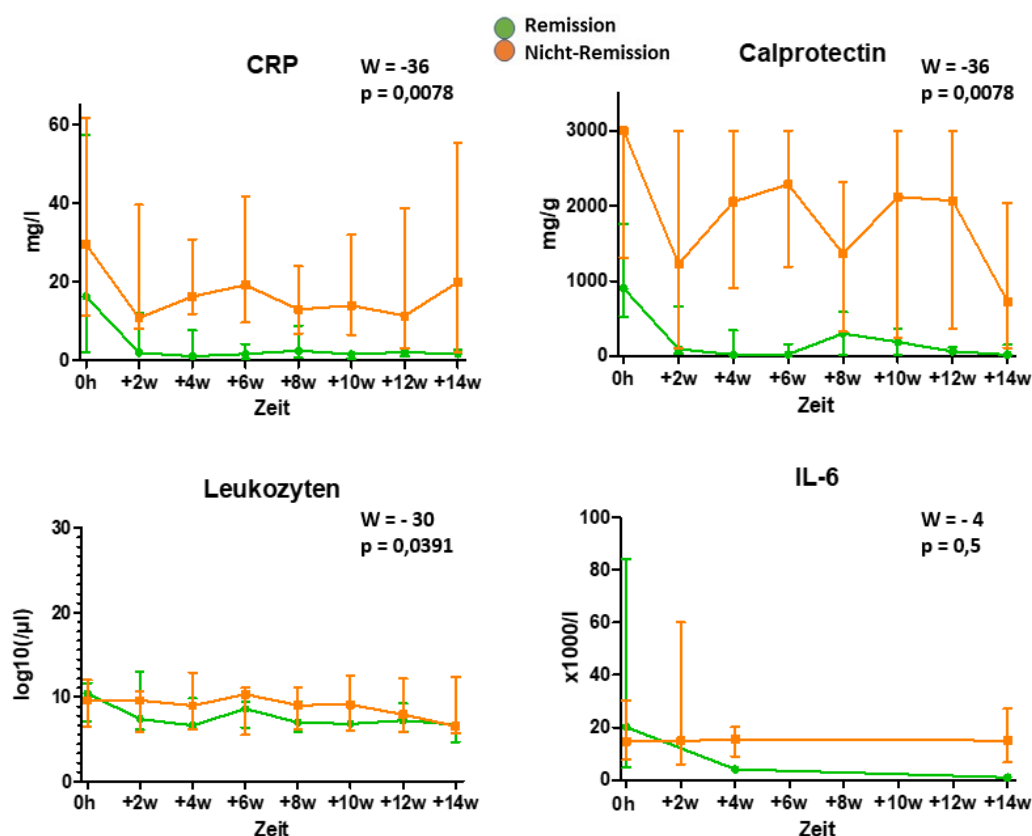
Somit verdeutlichen die klinischen Entzündungsparameter, dass bei Therapiebeginn ähnliche klinische Krankheitsaktivitäten in beiden Gruppen vorlagen. Die klinische Krankheitsaktivität

reduzierte sich unter der Therapie mit Olamkicept in der Remissionsgruppe deutlich ausgeprägter, frühzeitiger und stabiler als in der Nicht-Remissionsgruppe. Statistisch signifikant stärkere Reduktionen lagen für den CDAI und HBI und nahezu signifikante für den Mayo-Score vor. Dies spricht für eine erfolgreiche klinische Remissionsinduktion durch Olamkicept in einem Teil der Kohorte.

3.5.2 Biochemische Entzündungsaktivität

Um die Entwicklung der biochemischen Entzündungsaktivität in den Probanden unter Olamkicept-Therapie beurteilen zu können, wurden verschiedene laborchemische Entzündungsmarker bestimmt.

An der Baseline hatte die Kohorte gruppenübergreifend erhöhte laborchemische Entzündungsparameter. Im Median lag das CRP bei 23 mg/dl, fäkales Calprotectin (FC) bei 3000 mg/g und IL-6 bei 15 pg/ml. Die Leukozyten-Anzahl zeigte sich nahezu normwertig. Die Remissionsgruppe zeigte niedrigere Ausgangskonzentrationen von CRP und FC, was für stärkere Entzündungsprozesse in der Nicht-Remissionsgruppe spricht (CRP 16 vs. 30 mg/l; FC 903 vs. 3000 mg/g). Umgekehrt zeigte IL-6 in der Remissionsgruppe interessanterweise höhere IL-6 Konzentrationen (IL-6: 20 vs. 15 pg/ml), hatte also eine höhere IL-6 Aktivität. In Abbildung 9 sind die Graphen der biochemischen Parameter zu sehen.



	Normwert		0h	2w	% 0h - 2w	4w	% 0h - 4w	14w	% 0h - 14w
CRP	< 5mg/l	Rem	16,3	2,02	-87,61	1,09		1,72	-89,45
		NRem	29,6	10,8	-63,51	15,2		19,9	-32,77
Calprotectin	< 50 mg/g	Rem	903	91	-89,92	15		15	-98,34
		NRem	3000	1225	-59,17	2054		725	-75,83
Leukozyten	4 - 10 /nl	Rem	10,43	7,41	-28,95	6,64		6,73	-35,47
		NRem	9,62	9,6	-0,02	8,96		6,55	-31,91
IL-6	ca. 1 pg/ml	Rem	20,1			4,15	-79,35	1,8	-91,04
		NRem	14,8	14,85		15,5	4,72	15	1,35

Abbildung 9: Biochemische Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum

Die graphischen Verläufe der biochemischen Parameter (Medianwerte und Interquartilabstände) sind dargestellt. Jede Graphik ist von den zugehörigen Ergebnissen des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests mit Angabe der Rangsumme (W) und des p-Wertes (p) begleitet. Tabellarisch sind darunter die kurz- und langfristigen Entwicklungen der Parameter angegeben. Die Remissionsgruppe (Rem) zeigte in allen Parametern frühzeitige, stabile und langfristig stärkere Reduktionen, die nur für IL-6 nicht signifikant stärker waren. Die Nicht-Remissionsgruppe (NRem) zeigte ebenfalls langfristig starke Entzündungsminderungen in allen Parametern (außer IL-6).

Bereits innerhalb von zwei Wochen sanken CRP und FC in beiden Gruppen deutlich und dabei stärker in der Remissionsgruppe (Remission: CRP -88 %, FC -90 %; Nicht-Remission: CRP -63 %, FC -59 %). Über den gesamten Studienzeitraum reduzierte sich in der Remissionsgruppe CRP von 16,3 auf 1,7 mg/ml (-89 %) und FC von 903 auf 15 mg/g (-98 %), womit beide

Entzündungsmarker Normwertigkeit erreichten. Das CRP in der Nicht-Remissionsgruppe reduzierte sich um -32,77 % auf 19,9 mg/ml, womit CRP an +14 w jedoch weiterhin erhöht war. FC reduzierte sich in der Nicht-Remissionsgruppe ebenfalls deutlich von 3000 auf 725 mg/g (-76 %), was allerdings weiterhin erhöhtes FC an +14 w darstellt.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestätigte, dass es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen für CRP ((W)=-36; p=0,0078) und für fäkales Calprotectin ((W)=-36; p=0,0078) gab.

Die für beide Gruppen normwertigen Leukozytenzahlen reduzierten sich in der Remissionsgruppe deutlich früher und langfristig etwas stärker (Remission -36 %; Nicht-Remission -32 %). Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestätigte, dass es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen für die Leukozytenzahl ((W)=-30; p=0,0391) gab.

Interleukin-6 als Vermittler von IL-6 trans-signaling zeigte initial in der Remissionsgruppe höhere Konzentrationen als in der Nicht-Remissionsgruppe. In der Nicht-Remissionsgruppe blieb der IL-6 Spiegel über den gesamten Studienzeitraum stabil hoch (ca. 15 pg/ml), während IL-6 in der Remissionsgruppe stark reduziert wurde: Frühzeitig von 0 h bis +4 w bereits um -79 % und langfristig bis +14 w um -91 % auf <1,5 pg/ml und war damit normwertig. Dies spricht dafür, dass die Olamkicept-Therapie in der Remissionsgruppe einen reduzierenden Einfluss auf die IL-6 Konzentration hatte.

Im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test konnte für IL-6 leider kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen errechnet werden.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist es bekannt, dass IL-6 nur in einer Minderheit von CED-Probanden erhöht ist (66). Daher wurden die IL-6 Konzentrationen der einzelnen Probanden genauer betrachtet. Dabei fiel interessanterweise auf, dass drei Probanden deutlich höhere IL-6 Werte an 0h als die restliche Kohorte vorwiesen (82-120 pg/ml vs. 14 pg/ml als Median der restlichen Kohorte). Deren IL-6 reduzierte sich frühzeitig deutlich. Dabei fiel auf, dass eine hohe IL-6 Konzentration, mit hohen pSTAT3/STAT3-Expressionsraten sowie hohem CRP, FC und Leukozyten sowie v.a. bei MC mit hohen klinischen Indizes einherging. In Tabelle 3 ist dies dargestellt.

	IL-6 (pg/ml)			pSTAT3/STAT3		
	0h	4w	14w	0h	4h	14w
Proband 1 (Remission, MC)	82,4	< 1,5	< 1,5	1,204	0,51	0,45
Proband 2 (unklar, UC)	119,5	75,2	x	0,74	0,57	x
Proband 3 (NRem, UC)	96,6	16,8	x	0,434	0,436	x
Median restliche Kohorte	14,35	13,15	11,55	0,34	0,349	0,432

	CRP (mg/l)			Calprotectin (mg/g)			Leukozyten (xx/nl)		
	0h	2w	14w	0h	2w	14w	0h	2w	14w
Proband 1	57,2	2,02	1,66	903	28	6,1	10,43	7,41	7,17
Proband 2	197	57,5	x	6000	3814	x	15,88	12,82	x
Proband 3	46,8	30,4	x	3000	3000	x	12,74	10,65	x
Median restliche Kohorte	16,35	10,65	10,1	3000	586	299,5	9,055	9,13	6,55

	CDAI			HBI			SES-CD		
	0h	2w	14w	0h	2w	14w	0h	2w	14w
Proband 1	330	81	21	9	1	0	24		0
Median restliche Kohorte MC	286,5	253,5	303	10	5,5	6,5	14	x	15

	Mayo-Score			Nancy-Index		
	0h	2w	14w	0h	2w	14w
Proband 2	11	11	x	4	2	x
Proband 3	11	3	x	3	4	x
Median restliche Kohorte CU	10	9	4	3	3,5	3

Tabelle 3: Genauere Betrachtung der Patienten mit erhöhten IL-6 Konzentrationen

In dieser Tabelle sind die klinischen, biochemischen, endoskopischen und histologischen Parameter von drei Probanden mit initial erhöhten IL-6 Konzentrationen im Vergleich zu den Medianwerten der übrigen Kohorte dargestellt. Fett markiert sind deutliche Reduktionen von Entzündungsparametern. Auffällig ist, dass die Patienten mit erhöhten IL-6 Konzentrationen tendenziell auch erhöhte pSTAT3/STAT3-Konzentrationen und ebenfalls Erhöhungen von anderen Entzündungsparametern zeigten. Diese reduzierten sich zu einem großen Teil frühzeitig und deutlich.

Somit lässt sich für die biochemischen Entzündungsparameter festhalten, dass sich die Remissions- und die Nicht-Remissionsgruppe deutlich und signifikant für CRP, FC und Leukozyten unterscheiden. Die Reduktion der Entzündungsmarker war in der Remissionsgruppe frühzeitiger, effektiver und stabiler als in der Nicht-Remissionsgruppe und die Parameter erreichten an +14 w normwertige Konzentrationen und damit auch biochemische Remission. Dies spricht für einen größeren antiinflammatorischen Effekt von Olamkicept in der Remissionsgruppe, wobei nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass in beiden Gruppen antientzündliche Effekte durch Olamkicept eingeleitet worden sind.

3.5.3 Endoskopische Entzündungsaktivität

Die Beurteilung der endoskopischen Entzündungsaktivität ist nur eingeschränkt möglich, da der SES-CD für MC nur an 0 h und an +14 w erhoben worden ist. Daher wurde auf eine graphische Darstellung und statistische Analyse verzichtet. Der SES-CD zeigte in der Remissionsgruppe der MC-Probanden (n=1) einen Abfall um -100 % von 24 auf 0 Punkte (Tabelle 4). Die Probanden aus der Nicht-Remissionsgruppe mit MC zeigten einen leichten Abfall um -21 % von im Median 19 auf 15 Punkte an +14 w.

Im Mayo-Score für CU ist als Unterkategorie eine endoskopische Beurteilung mitinbegriffen und dessen Ergebnisse wurden bei den klinischen Parametern beschrieben.

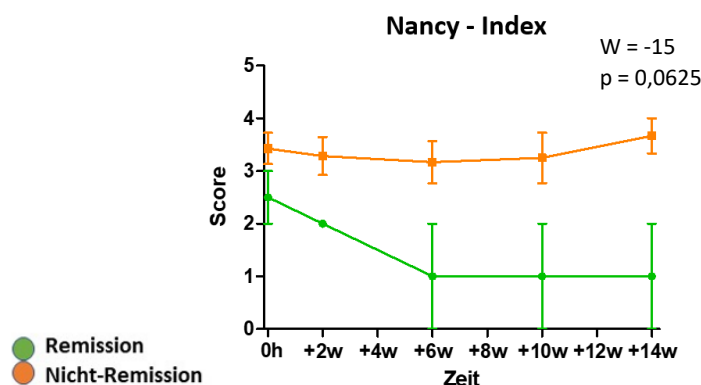
	Normwert		0h	14w	% 0h - 14w
SES-CD	≤ 2 Pkt.	Rem	24	0	-100
		NRem	19	15	-21,05

Tabelle 4: Endoskopischer Entzündungsaktivitätsparameter

Tabellarisch dargestellt ist der endoskopische Entzündungsaktivitätsparameter SES-CD, der nur an 0h und an +14 w erhoben wurde. Der SES-CD der Remissionsgruppe (Rem) reduzierte sich langfristig um -100 %, der der Nicht-Remissionsgruppe (NRem) um -21 %.

3.5.4 Histologische Entzündungsaktivität

Um die Entzündungsaktivität direkt im Gastrointestinaltrakt zu beurteilen, wurden aus Darmbiopsien histologische Analysen durchgeführt. Für MC gibt es bisher keinen validierten histologischen Index, für CU wurde der Nancy-Index bestimmt (Abbildung 10). Dieser zeigte sich initial in der Nicht-Remissionsgruppe höher als in der Remissionsgruppe und reduzierte sich langfristig in der Remissionsgruppe um -60 %. In der Nicht-Remissionsgruppe blieb der Nancy-Index konstant bei 4 Punkten. Im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test konnte kein signifikanter Unterschied kalkuliert werden, wobei der p-Wert nah am Signifikanzniveau lag ((W)=-15, p=0,0625).



	Normwert		0h	2w	% 0h - 2w	14w	% 0h - 14w
Nancy	0 Pkt.	Rem	2,5	2	-20	1	-60
		NRem	4	4	0	4	0

Abbildung 10: Histologischer Entzündungsaktivitätsparameter über den Therapiezeitraum

Der graphische Verlauf des Nancy-Index (Medianwerte und Interquartilabstände) ist dargestellt. Das Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests mit Rangsumme (W) und p -Wert (p) ist ersichtlich. Tabellarisch sind darunter die kurz- und langfristigen Entwicklungen des Nancy-Index angegeben. Die Remissionsgruppe (Rem) zeigte im Gegensatz zur Nicht-Remissionsgruppe eine Reduktion des Nancy-Index, welche nahezu signifikant stärker war.

3.6 Immunhistochemische Entzündungsparameter

Um die entzündlichen Prozesse mikroskopisch in der entzündlich betroffenen Darmmukosa zu untersuchen, wurden in der immunhistochemischen Auswertung die STAT3-Aktivierung, die Zellproliferationsrate sowie folgende Immunzellen quantifiziert: T-Zellen, Makrophagen/Monozyten und Neutrophile Granulozyten. Es sollte untersucht werden, ob Olamkicept über die Blockade von IL-6 trans-signaling Effekte auf die intestinale STAT3-Aktivierung, die Proliferationsrate und auf die Zusammensetzung der mukosalen Immunzellen bewirken kann.

An den Zeitpunkten 0 h, +4 h, +24 h, +3 d, +2 w, +6 w, +10 w, +14 w wurden Darmbiopsien entnommen. Eine vollständige immunhistochemische Datenerhebung gab es lediglich für einen Remissions- und für einen Nicht-Remissionsprobanden. Insgesamt wurden 110 Darmgewebsproben entnommen, womit 550 immunhistochemisch gefärbte Präparate vorlagen, von denen sechs wegen ungeeigneter Qualität von der Wertung ausgeschlossen wurden. In Tabelle 5 sind die kurz- und langfristigen Ergebnisse der immunhistochemischen Datensammlung dargestellt, im Anhang 4D ist die vollständige immunhistochemische Datensammlung mit Medianwertangabe ersichtlich. Zudem sind dort die Fotografien der

immunhistochemischen Färbungen an 0 h und +14 w von Remission und Nicht-Remission gegenübergestellt (Anhang 5).

		0h	4h	% 0h bis 4h	2w	% 0h bis 2w	14w	% 0h bis 14w
pSTAT3 Epi	Rem	0,755	0,715	-5,3	0,74	-2	0,07	-90,73
	NRem	0,75	0,83	10,67	0,8	6,67	0,245	-67,34
pSTAT3 LP	Rem	0,465	0,22	-52,69	0,29	-37,63	0,245	-47,31
	NRem	0,46	0,295	-35,87	0,44	-4,35	0,345	-25
Ki Epi	Rem	0,4375	0,41	-6,3	0,29	-33,71	0,19	-56,57
	NRem	0,305	0,368	20,49	0,315	3,28	0,265	-13,11
Ki LP	Rem	0,12	0,145	20,84	0,04	-66,7	0,01	-91,67
	NRem	0,06	0,105	75	0,07	16,67	0,06	0
CD3	Rem	61,5	51,5	-16,26	52	-15,45	34	-44,72
	NRem	33	37,5	13,64	49	48,48	41,5	25,76
CD68	Rem	50	100,5	101	62	24	113	126
	NRem	79,5	89,5	12,58	106	33,34	114,5	44,03
MPO	Rem	68,5	38,5	-43,8	20	-70,8	15	-78,1
	NRem	34,5	40	15,94	48	39,13	32,5	-5,8

Tabelle 5: Immunhistochemische Parameter und deren Veränderungen

Die kurz- und langfristigen Entwicklungen der immunhistochemischen Parameter (Medianwerte und prozentuale Veränderungen) sind tabellarisch dargestellt. Die Expressionen von pSTAT3 (pSTAT3) und Ki-67 (Ki, Proliferationsmarker) sind in relativer Zählweise (xx positiv gefärbte Zellen / 100 Zellen), die von CD3 (T-Zellen), CD68 (Makrophagen), MPO (Neutrophile Granulozyten) sind in absoluter Zählweise angegeben (xx positiv gefärbte Zellen/Sichtfeld). Fett markiert sind Reduktionen von >40 %. In der Remissionsgruppe (Rem) ist eine unmittelbare (0h bis +4 h) und deutliche Reduktion von pSTAT3 in der Lamina propria (pSTAT3 LP) und von MPO hervorzuheben. Langfristig reduzierten sich in der Remissionsgruppe alle immunhistochemischen Parameter (außer CD68) deutlich und stärker als in der Nicht-Remissionsgruppe (NRem).

3.6.1 Intestinales pSTAT3

Um die STAT3-Aktivierung in der Darmmukosa zu beurteilen, wurde die pSTAT3-Expression in epithelialen Zellen sowie in den Zellen der Lamina propria quantifiziert. Es wurde untersucht, inwieweit eine IL-6 trans-signaling Inhibition durch Olamkicept reduzierende Einflüsse auf die STAT3-Aktivierung und damit auf die pSTAT3-Expression hatte. In Abbildung 11 sind die graphischen Verläufe ersichtlich.

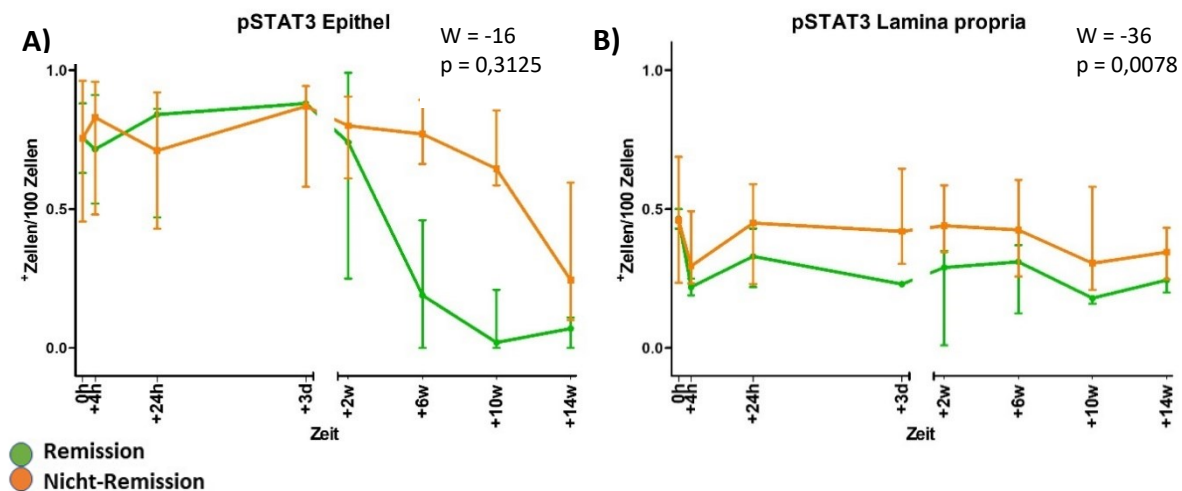


Abbildung 11: pSTAT3-Expression über den Therapiezeitraum

Die pSTAT3-Expression (A) im Epithel und (B) in der Lamina propria ist graphisch dargestellt (Medianwerte und Interquartilabstände). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben. Epitheliales pSTAT3 reduzierte sich gruppenübergreifend erst spät (ab der 2. Woche in der Remissionsgruppe, ab der 6. Woche in der Nicht-Remissionsgruppe). Insgesamt reduzierte es sich stärker, allerdings nicht signifikant stärker, in der Remissionsgruppe. Die pSTAT3-Expression in der Lamina propria reduzierte sich bereits unmittelbar nach +4 h, nahezu stabil bleibend und signifikant stärker in der Remissionsgruppe.

Die epitheliale pSTAT3-Expression zeigte in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 0 h ähnlich hohe Werte. Kurzfristig präsentierte sich in beiden Gruppen ein schwankender Verlauf mit eher steigender STAT3-Aktivierung. Auffällig war ein scherenförmiger Verlauf ab der zweiten Woche: Während sich die pSTAT3-Expression in der Remissionsgruppe stark reduzierte, blieben die Werte der Nicht-Remissionsgruppe bis zur zehnten Woche auf einem stabil hohen Niveau.

Über den gesamten Therapiezeitraum reduzierte sich die epitheliale pSTAT3-Expression in der Remissionsgruppe sehr stark um -91 % und in der Nicht-Remissionsgruppe um -67 %. Statistisch zeigte sich in der epithelialen pSTAT3-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Somit wurde die epitheliale STAT3-Aktivierung insgesamt gruppenübergreifend reduziert. Die Reduktionen traten dabei zeitlich verzögert auf und waren in der Remissionsgruppe stärker - jedoch nicht signifikant stärker - ausgeprägt.

Auch die pSTAT3-Expression in der Lamina propria zeigte in beiden Gruppen ähnliche Ausgangswerte. Eine stärkere Reduktion gab es von 0 h bis +4 h in der Remissionsgruppe um -53 % (Nicht-Remission: -36 %). Ab +4 h präsentierte die Remissionsgruppe konsequent niedrigere pSTAT3-Expressionen als zu Beginn und ebenfalls niedrigere als die Nicht-

Remissionsgruppe. Insgesamt wurde die pSTAT3-Expression in der Lamina propria in der Remissionsgruppe um -47 %, in der Nicht-Remissionsgruppe um -25 % reduziert. In der immunhistochemischen Analyse konnte allein für die pSTAT3-Expression in der Lamina propria eine signifikant stärkere Reduktion in der Remissionsgruppe bestätigt werden ((W)=-36, p=0,0078). Dies gibt der pSTAT3-Expression in der Lamina propria eine Sonderstellung. In der Remissionsgruppe ist das intrazelluläre STAT3-Signaling in den Immunzellen der Lamina propria durch die therapeutische Inhibition von IL-6 trans-signaling signifikant reduziert worden. Somit stellt die pSTAT3-Expression in der Lamina propria einen frühen, spezifischen Marker für Therapieansprechen auf Olamkicept dar.

3.6.2 Intestinales Ki-67

Um das Proliferationsverhalten unter therapeutischer IL-6 trans-signaling Hemmung zu beurteilen, wurde die Expression von Ki-67 im Epithel und in Zellen der Lamina propria untersucht (Abbildung 12).

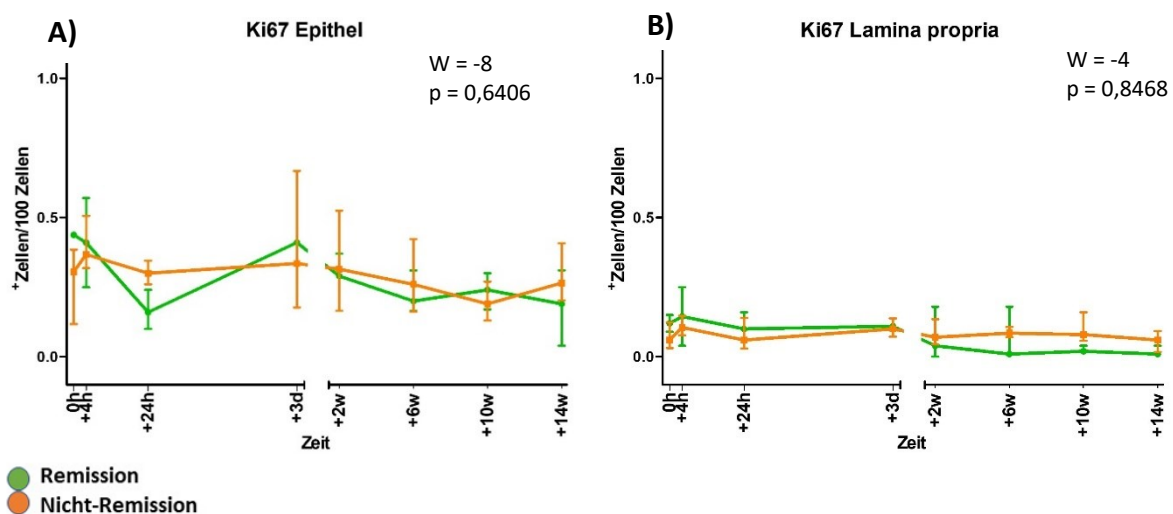


Abbildung 12: Ki-67-Expression über den Therapiezeitraum

Die Ki-67-Expression (A) im Epithel und (B) in der Lamina propria ist graphisch dargestellt (Medianwerte und Interquartilabstände). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben. Die Ki-67-Expression war in der Remissionsgruppe sowohl im Epithel als auch in der Lamina propria an 0 h erhöht. Epithelial zeigte sich vorerst ein schwankender Verlauf, insgesamt reduzierte sich Ki-67 stärker (nicht signifikant) in der Remissionsgruppe. In der Lamina propria wurde Ki-67 in der Remissionsgruppe deutlich, allerdings nicht signifikant stärker, reduziert.

Die Ki-67-Expression im Epithel war initial in der Remissionsgruppe höher als in der Nicht-Remissionsgruppe. Kurzfristig verlief die Ki-67-Expression in der Remissionsgruppe

schwankend und reduzierte sich langfristig um -57 %. In der Nicht-Remissionsgruppe stieg die Ki-67-Expression unmittelbar leicht an (+20 %) und reduzierte sich insgesamt leicht um -13 %. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor.

Somit scheint das epitheliale Proliferationsverhalten, welches u.a. mit Wundheilung einhergeht, gruppenübergreifend über mehrere Wochen nicht wesentlich durch Olamkicept beeinflusst worden zu sein. Erst verzögert zeigte sich in der Remissionsgruppe eine deutliche Abnahme der epithelialen Proliferation, was für stattgehabte Wundheilung sprechen könnte.

Die Ki-67-Expression in der Lamina propria war zu Beginn in der Remissionsgruppe doppelt so hoch wie in der Nicht-Remissionsgruppe. Unmittelbar stiegen die Expressionen in beiden Gruppen an, jedoch deutlich stärker in der Nicht-Remissionsgruppe (Remission +21 % vs. Nicht-Remission +75 %). Im kurzfristigen Zeitfenster präsentierte die Remissionsgruppe höhere Ki-67-Expressionswerte als die Nicht-Remissionsgruppe, was sich langfristig umkehrte. Insgesamt reduzierten sich die Werte in der Remissionsgruppe sehr stark, nämlich um -92 %. Dies ist zugleich die stärkste Reduktion aller immunhistochemischer Parameter. In der Nicht-Remissionsgruppe blieb die Expression von Ki-67 insgesamt konstant (+/- 0 %). Dies spricht für eine langfristig, effektive Reduktion der Zellproliferation in der Lamina propria bei Remissionsverhalten, auch wenn kein signifikanter Unterschied kalkuliert werden konnte.

3.6.3 Intestinales CD3

Um reduzierende Einflüsse auf die mukosale T-Zellzahl unter Olamkicept-Therapie zu beurteilen, wurde intestinales CD3 als Marker für T-Zellen quantifiziert. Der graphische Verlauf ist in Abbildung 13 zu sehen.

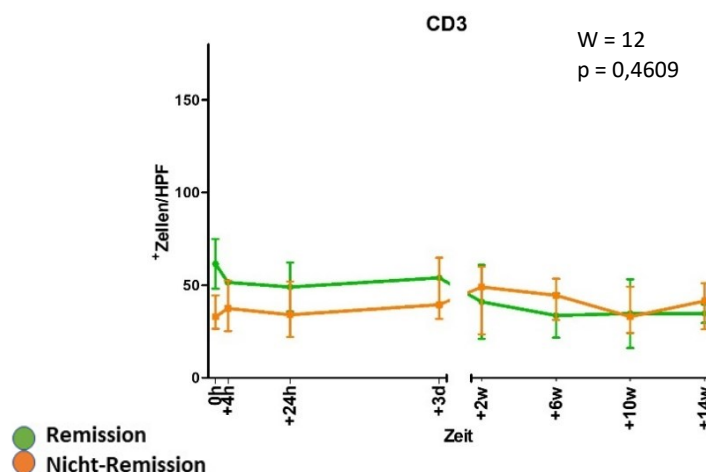


Abbildung 13: CD3-Expression über den Therapiezeitraum

Die CD3-Expression (T-Zellen) ist graphisch dargestellt (Medianwerte und Interquartilabstände). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben. Die T-Zellzahl reduzierte sich in der Remissionsgruppe aus initial nahezu doppelt so hoher Anzahl wie in der Nicht-Remissionsgruppe deutlich (nicht-signifikant), während sie in der Nicht-Remissionsgruppe stabil blieb.

Die CD3-Expression war zu Beginn in der Remissionsgruppe fast doppelt so hoch wie in der Nicht-Remissionsgruppe (61,5 vs. 33 Zellen/HPF). Zwischen 0 h und +4 h gab es in der Remissionsgruppe eine leichte Reduktion (-16 %) und in der Nicht-Remissionsgruppe einen leichten Anstieg (+14 %). Kurzfristig präsentierte die Remissionsgruppe höhere Werte als die Nicht-Remissionsgruppe, was sich langfristig umkehrte. Insgesamt kam es in der Remissionsgruppe zu einer Reduktion um -45 % und in der Nicht-Remissionsgruppe zu einem Anstieg um +26 %. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen kalkuliert werden.

Somit wird zum einen deutlich, dass die intestinale T-Zellzahl vor Therapiebeginn in der Remissionsgruppe erhöht war und zum anderen, dass Olamkicept einen reduzierenden Effekt auf die T-Zellanzahl in der Remissionsgruppe hatte, wohingegen die T-Zellanzahl in der Nicht-Remissionsgruppe anstieg.

3.6.4 Intestinales CD68

Um reduzierende Einflüsse auf die mukosale Anzahl der Makrophagen unter Olamkicept-Therapie zu beurteilen, wurde intestinales CD68 als Marker für Makrophagen quantifiziert.

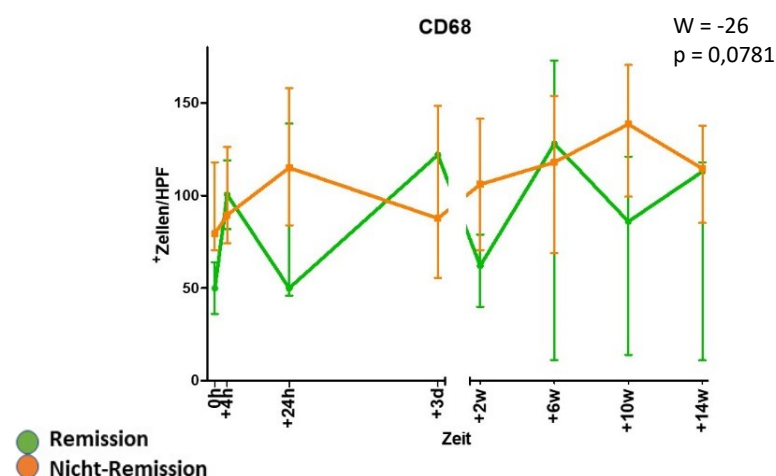


Abbildung 14: CD68-Expression über den Therapiezeitraum

Die CD68-Expression (Makrophagen) ist graphisch dargestellt (Medianwerte und Interquartilabstände). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben. Die Makrophagen-Anzahl verlief gruppenübergreifend unspezifisch schwankend.

Die CD68-Expression (Abbildung 14) präsentierte in beiden Gruppen im gesamten Verlauf große Schwankungen und Interquartilabstände. Insgesamt stieg die CD68-Expression in der Remissionsgruppe um +126 % und in der Nicht-Remissionsgruppe um +44 %. Da die CD68-Expressionen unspezifisch schwankend verliefen und obwohl der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test nahezu signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen errechnete ((W)=-26; p=0,0781), konnte keine sinnvolle Schlussfolgerung der Olamkicept-Wirkung auf Makrophagen nachvollzogen werden. Aus diesem Grund wird die CD68-Expression im Weiteren nur wenig Erwähnung finden.

3.6.5 Intestinales MPO

Um Einflüsse der Olamkicept-Therapie auf die mukosale Anzahl der Neutrophilen Granulozyten zu beurteilen, wurde intestinales, intrazelluläres MPO als Marker für Neutrophile Granulozyten quantifiziert. Der graphische Verlauf ist in Abbildung 15 zu sehen.

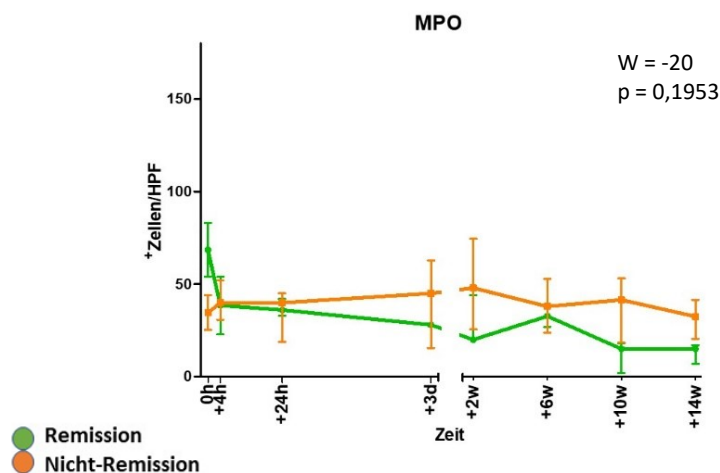


Abbildung 15: MPO-Expression über den Therapiezeitraum

Die MPO-Expression (Neutrophile Granulozyten) ist graphisch dargestellt (Medianwerte und Interquartilabstände). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests sind mit der Rangsumme (W) und dem p-Wert (p) angegeben. Die Neutrophilen Granulozyten lagen in der Remissionsgruppe in

doppelt so hoher Konzentration zum Zeitpunkt 0h vor. Sie reduzierten sich unmittelbar nach +4 h deutlich und stabil, während sie in der Nicht-Remissionsgruppe nahezu stabil blieben.

MPO war zu Beginn in der Remissionsgruppe doppelt so hoch exprimiert (Remission 68,5 vs. Nicht-Remission 34,5 positive Zellen/HPF). Die Expression fiel unmittelbar nach der ersten Olamkicept-Gabe um -44 % und lag ab diesem Punkt dauerhaft unterhalb der Werte der Nicht-Remissionsgruppe. Diese wiederum wies unmittelbar steigende Tendenzen auf (+16 %). Insgesamt reduzierte sich die Zellzahl in der Remissionsgruppe um -78 %, während sie in der Nicht-Remissionsgruppe nur unwesentlich sank, nämlich um -6 %. Auch wenn für die MPO-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen errechnet werden konnte, wird ein unmittelbarer und effektiver Einfluss von Olamkicept auf die MPO-Expression und damit auf das Bestehen und die Aktivität von Neutrophilen Granulozyten in der Remissionsgruppe deutlich. Zudem lag initial eine deutlich höhere Zellzahl und Aktivität von Neutrophilen Granulozyten in der Remissionsgruppe vor.

3.6.6 Fazit der immunhistochemischen Analyse

Beide Gruppen zeigten über den Therapiezeitraum Reduktionen der intestinalen, entzündlich assoziierten Moleküle. Dabei waren die Reduktionen in der Remissionsgruppe stets ausgeprägter und stabiler. Das STAT3-Signaling in der Lamina propria und die Anzahl an Neutrophilen Granulozyten reduzierten sich bereits sehr früh um mehr als -40 %; in der Nicht-Remissionsgruppe gab es keine vergleichbar frühen Reduktionen. Über den gesamten Studienzeitraum reduzierten sich in der Remissionsgruppe sechs Parameter um mehr als -45 %: Die Proliferationsrate in der Lamina propria (-92 %), die pSTAT3-Expression im Epithel (-91 %), die Anzahl von Neutrophilen (-78 %), die Proliferationsrate im Epithel (-57 %), die Expression von pSTAT3 in der Lamina propria (-47 %) und von T-Zellen (-45 %) verringerten sich deutlich. In der Nicht-Remissionsgruppe lag lediglich für die pSTAT3-Expression im Epithel eine starke Reduktion vor (-67 %). Insgesamt spricht dies für einen deutlich größeren antientzündlichen Effekt von Olamkicept in der Remissionsgruppe und damit für ein besseres Therapieansprechen.

Bislang zeigte nur die pSTAT3-Expression in der Lamina propria eine signifikant stärkere Reduktion in der Remissionsgruppe, was die Sonderstellung dieses Parameters hervorhebt. Es scheint, dass Olamkicept in (Immun) Zellen der Lamina propria STAT3-Signaling blockieren

konnte. Die pSTAT3-Expression in der Lamina propria scheint somit einen frühen und spezifischen Marker für Therapieansprechen darzustellen.

3.7 Korrelationen

Um Zusammenhänge zwischen klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen Parametern zu untersuchen, wurden Spearman-Rangkorrelationen berechnet. Mithilfe der Korrelationsanalyse soll die Validität der verschiedenen Entzündungsparameter unter der Therapie mit Olamkicept geprüft werden. Ziel war es herauszufinden, welche Entzündungsaktivitätsmarker sich unter der Therapie mit Olamkicept als besonders geeignete Parameter zur Beurteilung der Entzündungsaktivität und ggf. als frühe Marker für Therapieansprechen eignen.

Korrelationen messen den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen. Eine „positive Korrelation liegt vor, wenn zu einem hohen Wert des einen Merkmals tendenziell auch ein hoher Wert des zweiten Merkmals gehört; [eine] negative Korrelation [liegt vor], wenn zu einem hohen Wert des einen Merkmals tendenziell ein niedriger Wert des anderen Merkmals gehört“ (Prof. Dr. Udo Kamps (119)).

In einem ersten Schritt wurden die klinischen, biochemischen und histologischen Parameter mit den immunhistochemischen Ergebnissen korreliert. Hiermit wurde untersucht, inwieweit die Entzündungsparameter mit den tatsächlich ablaufenden, entzündlichen Prozessen in der Darmmukosa zusammenhängen. Im zweiten Schritt wurden Korrelationen zwischen der STAT3-Aktivierung in Blutzellen (PBMC) mit klinischen, biochemischen und histologischen sowie immunhistochemischen Parametern kalkuliert, um zu beurteilen, ob die STAT3-Aktivierung in Blutzellen mit den Entzündungsaktivitätsparametern in Beziehung steht.

3.7.1 Korrelationen der klinischen, biochemischen und histologischen Parameter mit den immunhistochemischen Parametern

Die klinischen, biochemischen und histologischen Parameter wurden mit den immunhistochemischen Ergebnissen korreliert, um zu untersuchen, inwiefern die untersuchten Entzündungsparameter mit den tatsächlich ablaufenden, entzündlichen Prozessen in der Darmmukosa zusammenhängen. In Tabelle 6 sind die vollständigen Ergebnisse dieser Korrelation dargestellt.

		pSTAT3 Epi	pSTAT3 LP	Ki-67 Epi	Ki-67 LP	CD3	CD68	MPO
CDAI	XY-Paare	22	22	22	22	22	22	21
	Spearman: r =	0,501	0,4168	-0,01131	0,6401	0,1985	0,1458	0,4471
	p-Wert: p =	0,0175	0,0537	0,9602	0,0013	0,3758	0,5175	0,0421
HBI	XY-Paare	21	21	21	21	21	21	20
	Spearman: r =	0,3776	0,2835	-0,09515	0,6268	0,0771	0,1239	0,2713
	p-Wert: p =	0,0915	0,2131	0,6816	0,0024	0,7397	0,5926	0,2472
Mayo-Score	XY-Paare	29	29	29	29	29	28	29
	Spearman: r =	0,6384	0,6016	0,3772	0,4131	0,223	-0,1961	0,4521
	p-Wert: p =	0,0002	0,0006	0,0437	0,0259	0,2449	0,3172	0,0138
CRP	XY-Paare	51	51	51	51	51	50	50
	Spearman: r =	0,4035	0,3835	0,04498	0,3478	0,04768	0,05879	0,3429
	p-Wert: p =	0,0033	0,0055	0,754	0,0124	0,7397	0,6851	0,0148
Calprotectin	XY-Paare	43	43	43	43	43	42	42
	Spearman: r =	0,306	0,5162	0,248	0,4911	0,3147	0,05998	0,5921
	p-Wert: p =	0,046	0,0004	0,1088	0,0008	0,0398	0,7059	< 0,0001
Leukozyten	XY-Paare	51	51	51	51	51	50	50
	Spearman: r =	0,1562	0,08556	-0,2598	0,345	0,05413	-0,1581	-0,153
	p-Wert: p =	0,2737	0,5505	0,0656	0,0132	0,706	0,2728	0,2887
IL-6	XY-Paare	18	18	18	18	18	18	18
	Spearman: r =	0,04649	0,2677	0,1384	-0,3245	-0,3044	0,1971	0,1631
	p-Wert: p =	0,8547	0,2828	0,584	0,1889	0,2193	0,4331	0,5178
Nancy-Index	XY-Paare	27	27	27	27	27	26	27
	Spearman: r =	0,2327	0,1774	-0,126	0,01071	-0,02522	0,08853	0,216
	p-Wert: p =	0,2429	0,3759	0,531	0,9577	0,9006	0,6671	0,2793

Tabelle 6: Ergebnisse der Korrelationen von klinischen, biochemischen und histologischen Parametern mit den immunhistochemischen Parametern

Tabellarisch dargestellt sind die Ergebnisse aus den Spearman-Korrelationen zwischen den klinischen, biochemischen und histologischen Parametern mit den immunhistochemischen Parametern. Angegeben werden die Summe der XY-Paare, die Stärke der Korrelation mit Spearman r und der p-Wert. Ein p-Wert <0,05 gilt als statistisch signifikant und ist dunkelgrau hinterlegt. CDAI, Mayo-Score, CRP und FC zeigten besonders viele signifikante Assoziationen und bestätigten sich somit als validierte Entzündungsaktivitäts-Indizes.

3.7.1.1 Korrelationen der klinischen Entzündungsparameter

Unter den klinischen Entzündungsparametern zeigten sich für den CDAI und für den Mayo-Score besonders viele signifikante Assoziationen mit den intestinalen Entzündungsmolekülen. Der CDAI korrelierte signifikant positiv mit epithelialem pSTAT3 ($r=0,501$; $p=0,0175$), mit Ki-67 in der Lamina propria ($r=0,6401$; $p=0,0013$) und mit MPO ($r=0,4471$; $p=0,0421$) sowie nahezu mit der pSTAT3-Expression in der Lamina propria ($r=0,4168$, $p=0,00537$). Der HBI als vereinfachter Index des CDAI korrelierte lediglich signifikant positiv mit der Expression von Ki-67 in der Lamina propria ($r=0,6268$; $p=0,0024$). Der Mayo-Score korrelierte mit denselben

Expressionen wie der CDAI und zusätzlich mit der pSTAT3-Expression in der Lamina propria und mit der epithelialen Ki-67-Expression (pSTAT3 Epithel ($r=0,6384$; $p=0,0002$), pSTAT3 Lamina propria ($r=0,6016$; $p=0,0006$), Ki-67 Epithel ($r=0,3772$; $p=0,0437$), Ki-67 Lamina propria ($r=0,4131$; $p=0,0259$) und MPO ($r=0,4521$; $p=0,0138$)). Beispielhaft interpretiert bedeuten diese Ergebnisse, dass ein hoher Index von CDAI oder vom Mayo-Score mit einer hohen STAT3-Aktivierung, einer hohen Zellproliferationsrate und einer hohen Anzahl von Neutrophilen einhergeht.

Somit kann festgehalten werden, dass sich besonders der CDAI für MC und der Mayo-Score für CU als valide klinische Parameter für die Einschätzung der intestinalen Entzündungsaktivität unter Olamkicept eignen.

3.7.1.2 Korrelationen der biochemischen Entzündungsparameter

Unter den biochemischen Entzündungsparametern zeigten CRP und fäkales Calprotectin signifikant positive Korrelationen mit den Expressionen von epitheliale pSTAT3 (CRP: $r=0,4035$; $p=0,0033$; FC: $r=0,306$; $p=0,046$), von pSTAT3 in der Lamina propria (CRP: $r=0,3865$; $p=0,0055$; FC: $r=0,5162$; $p=0,0004$), von Ki-67 in der Lamina propria (CRP: $r=0,3478$; $p=0,0124$; FC: $r=0,4911$; $p=0,0008$) und mit der Anzahl von Neutrophilen Granulozyten (CRP: $r=0,429$; $p=0,0148$; FC: $r=0,5921$, $p<0,0001$). Calprotectin korrelierte zusätzlich signifikant positiv mit der T-Zellanzahl ($r=0,3147$; $p=0,0398$). Somit gehen hohe Konzentrationen von CRP und/oder von FC mit hohen STAT3-Aktivierungen, Zellproliferationsraten in der Lamina propria und Anzahlen von Neutrophilen Granulozyten einher.

Die Leukozytenzahl stand in einem signifikant positiven Zusammenhang mit der Ki-67-Expression in der Lamina propria ($r=0,345$; $p=0,0132$). Dies bedeutet, dass die Leukozytenzahl mit der Proliferationsrate von mukosalen Zellen konkordant in Beziehung stand. Interessanterweise war die Zahl der Leukozyten im Blut unabhängig von der im Darmgewebe (keine Korrelation zwischen Leukozyten und der CD3-Expression). Die Leukozyten scheinen sich daher nicht besonders für die Beurteilung der intestinalen Entzündungsaktivität unter Olamkicept zu eignen.

IL-6 zeigte keine signifikanten Korrelationen mit den intestinalen Entzündungsmolekülen, was IL-6 als weniger guten Parameter für die intestinale Entzündungsaktivität darstellt. Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der IL-6 Konzentration und der intestinalen STAT3-Aktivierung. Beachtet werden sollte allerdings, dass in der Korrelationsanalyse mit IL-6

deutlich weniger Datenpunkte vorlagen als in den anderen Korrelationspaaren und daher möglicherweise erschwerte Bedingungen für signifikante Ergebnisse anzunehmen sind.

Somit kann festgehalten werden, dass sich CRP und FC als validierte Entzündungsmarker bestätigen, aus denen Rückschlüsse auf den Grad der intestinalen Entzündung gezogen werden kann. Leukozyten und IL-6 scheinen sich weniger als Entzündungsmarker unter der Therapie mit Olamkicept zu eignen.

3.7.1.3 Korrelation des histologischen Parameters

Der Nancy-Index zeigte keine signifikanten Korrelationen mit den intestinalen Entzündungsparametern. Unerwarteterweise korrelierte er weder mit der MPO- noch mit der CD3-Expression, obwohl die Infiltrationsrate von Neutrophilen ebenso wie das chronische entzündliche Infiltrat von Immunzellen Kriterien des Nancy-Index darstellen.

3.7.2 Korrelationen der STAT3-Aktivierung in PBMC mit klinischen, biochemischen, histologischen und immunhistochemischen Parametern

Die Korrelationen zwischen der STAT3-Aktivierung in Blutzellen und den Entzündungsaktivitätsparametern wurden kalkuliert, um zu beurteilen, ob die STAT3-Aktivierung in Blutzellen mit den im Körper ablaufenden, entzündlichen Prozessen in Beziehung steht. Die Ergebnisse der Korrelationen sind in Tabelle 7 zu sehen.

Signifikant schwach positive Assoziationen präsentierten sich zwischen der STAT3-Aktivierung in Immunzellen des Blutes mit CRP ($r=0,554$; $p=0,0061$), Leukozyten ($r=0,5514$; $p=0,0064$) und IL-6 ($r=0,5078$; $p=0,0188$). Damit zeigte sich, dass bspw. eine vermehrte STAT3-Aktivierung mit einer vermehrten Konzentration von CRP, Leukozyten und IL-6 einhergeht. Die Frequenz der STAT3-Aktivierung in PBMC steht demnach mit systemischen Entzündungsparametern in Beziehung.

Interessanterweise gab es in dieser Korrelationsanalyse nur signifikante Zusammenhänge zwischen Parametern des Kompartiments „Blut“ und keine Zusammenhänge mit klinischer, histologischer oder immunhistochemischer Entzündungsaktivität. Dies verdeutlicht, dass über die STAT3-Aktivierung in PBMC keine Aussagen über die Krankheitsaktivität im Darm getroffen werden kann. Insbesondere war die STAT3-Aktivierung in Immunzellen des Blutes unabhängig von der STAT3-Aktivierung in Immunzellen des Darms. Somit fällt die STAT3-Aktivierung in

PBMC als diagnostischer Wegweiser für den Grad einer intestinalen STAT3-Aktivierung weg. Es kann festgehalten werden, dass signifikante Assoziationen zwischen der STAT3-Aktivierung in PBMC mit den biochemischen Entzündungsparametern aus dem Kompartiment Blut vorlagen. Zwischen dem Grad der STAT3-Aktivierung in PBMC und dem Grad der Darmentzündung konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Insbesondere die pSTAT3-Expression in Blut und Darm war unabhängig voneinander, weshalb es nicht möglich ist, anhand der pSTAT3/STAT3-Expression in PBMC eine Aussage über stattfindende STAT3-Aktivierung in der Darmmukosa zu geben.

A)

		CDAI	HBI	Mayo	CRP	Calprotectin	Leukozyten	IL-6	Nancy
pSTAT3/STAT3	XY-Paare	9	8	13	23	22	23	21	11
	Spearman r	-0,1833	-0,602	0,2386	0,554	-0,007984	0,5514	0,5078	0
	p-Wert	ns	ns	0,4325	0,0061	0,9719	0,0064	0,0188	1,0105

B)

		pSTAT3 Epi	pSTAT3 LP	Ki-67 Epi	Ki-67 LP	CD3	CD68	MPO
pSTAT3/STAT3	XY-Paare	25	25	25	25	25	25	25
	Spearman: r =	-0,1933	0,05581	-0,172	-0,2622	0,07923	0,1486	-0,3007
	p-Wert: p =	0,3546	0,791	0,411	0,2055	0,7066	0,4785	0,1442

Tabelle 7: Ergebnisse der Korrelationen zwischen STAT3-Aktivierung in PBMC mit klinischen, biochemischen und histologischen sowie immunhistochemischen Parametern

Tabellarisch dargestellt werden die Korrelationsergebnisse zwischen dem Konzentrationsverhältnis pSTAT3/STAT3 in PBMC in A) mit den klinischen (CDAI, HBI, Mayo-Score), biochemischen (CRP, Calprotectin, Leukozyten, IL-6) und histologischen Parametern (Nancy-Index) und in B) mit den immunhistochemischen Parametern (pSTAT3 Epithel (Epi), pSTAT3 Lamina propria (LP) etc). Dabei werden die Anzahl der XY-Paare, der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) sowie der p-Wert (p) angegeben. Als statistisch signifikant wird $p < 0,05$ definiert. Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt. pSTAT3/STAT3 aus peripher monozytären Blutzellen (PBMC) korrelierte lediglich mit anderen Entzündungsparametern aus dem Blut signifikant und nicht mit intestinalen Parametern.

3.7.3 Fazit der Korrelationsergebnisse

Als Fazit soll betont werden, dass sich der CDAI, der Mayo-Score, CRP und FC als validierte Entzündungsmarker unter der Therapie mit Olamkicept zu eignen scheinen, denn sie zeigten mehrere signifikant positive Korrelationen mit den intestinalen Entzündungsparametern. Alle signifikant positiven Korrelationen hatten einen positiven Korrelationskoeffizienten $r < 0,65$, was bedeutet, dass schwach positive Zusammenhänge vorlagen.

4 Diskussion

In diesem Teil der Dissertation soll diskutiert werden, wie die geschilderten Ergebnisse im Hinblick auf den aktuellen Forschungsstand interpretiert und bewertet werden können.

4.1 Bewertung des Studienaufbaus

Diese Phase IIa Studie war als eine Open-Label Studie designt, was ein übliches Vorgehen in dieser Phase der Arzneimittelzulassung darstellt. Primäres Ziel von Phase IIa ist es, das Therapieprinzip und die Arzneimittelsicherheit zu testen. In Phase IIb Studien werden die Wirksamkeit, adäquate Dosierungen sowie die Sicherheit in größeren Kohortenstudien überprüft (96, 120–122). Von der vorliegenden Studie sollte dementsprechend keine Aussage über die tatsächliche Therapieeffektivität von Olamkicept erwartet werden.

Weitere erschwerende Voraussetzungen der vorliegenden Studie waren zum einem, dass die Teilnehmeranzahl ($n=16$) gering war und zum anderen, dass die Kohorte heterogen zusammengesetzt war, was sich bspw. in unterschiedlichen Erkrankungsdauern, Krankheitsverläufen und Vorbehandlungen spiegelte.

Kleine Stichprobenumfänge (und hier v.a. die geringe Remissionsprobandenanzahl $n=3$) haben den Nachteil, dass das Risiko höher ist, „einen tatsächlich vorhandenen Therapieunterschied nicht beweisen zu können (Fehler 2. Art)“ (Santis et al. (117)). Dennoch ist es in frühen Phasen der Arzneimittelzulassungsprüfung üblich mit kleinen Stichproben zu arbeiten (122), auch um die potentielle Gefährdung von Patienten gering zu halten.

Eine heterogen zusammengesetzte Kohorte hat den Vorteil, die Allgemeinbevölkerung gut zu repräsentieren, allerdings gilt: „Je heterogener die Studienpopulation, desto größer muss der Stichprobenumfang sein, um einen möglichen Unterschied (Behandlungseffekt) feststellen zu können“ (Santis et al. (117)). Somit stellt die Kombination aus „kleiner und heterogener“ Zusammensetzung der Kohorte eine erschwerende Ausgangslage der vorliegenden Studie dar.

Insgesamt spricht die Art der Studiendurchführung mit erstmaliger Verabreichung von Olamkicept an CED-Patienten für einen ethisch korrekten und hohen Sicherheitsstandard. Die Studie sollte jedoch vor dem Hintergrund der eben genannten Schwächen beurteilt werden, ebenso wie signifikante Ergebnisse in einer kleinen, heterogenen Kohorte einen besonderen Stellenwert zugeschrieben werden sollten.

4.2 Bewertung der Methodik und Statistik

An der Darmgewebeprobenentnahme aus dem Sigmoid kann bemängelt werden, dass diese besonders bei Morbus Crohn nur eingeschränkt aussagekräftig ist. Denn falls das Sigmoid nicht entzündlich befallen ist, bedeutet dies nicht, dass der gesamte GIT bei MC entzündungsfrei ist (3, 4). Dennoch muss diesem Argument entgegengehalten werden, dass eine zweiwöchentliche vollständige (Gastro-) Koloskopie für eine umfassendere Entzündungsuntersuchung als unzumutbar für die Patienten einzuschätzen ist.

Des Weiteren können menschliche Methodikfehler z.B. bei Laborarbeiten (Messfehler, Artefakte, Histologische Anfärbung etc.) oder bei der immunhistochemischen Auszählung nie ausgeschlossen werden. In der statistischen Analyse kann die Wahl des Medians anstelle des Mittelwerts hinterfragt werden. Bortz und Schuster schrieben: „Der Median wird im Gegensatz zum Mittelwert nicht oder zumindest nur wenig von Ausreißern beeinflusst“ (123). Durch die Einzeichnung der Interquartilabstände werde zudem die Variabilität ersichtlich gemacht (123). Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation Mediane und deren Interquartilabstände verwendet.

4.3 Bewertung des Therapieansprechen durch Olamkicept

Olamkicept induzierte bei 19 % der Probanden klinische Remission und bei 44 % ein Response-Verhalten. Die klinischen, laborchemischen, endoskopischen und immunhistochemischen Entzündungs- und Krankheitsaktivitäten reduzierten sich in Teilen der Kohorte deutlich und für mehrere Entzündungsparameter signifikant stärker in der Remissionsgruppe. Möglicherweise ist dies ein Hinweis dafür, dass IL-6 trans-signaling bei den Remissionsprobanden ein entscheidender, vermehrt aktivierter bzw. hyperaktivierter Signalweg ist, der in die Vermittlung und in die Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Prozesse involviert ist. Damit könnte erklärt werden, warum die Inhibition von IL-6 trans-signaling durch Olamkicept in einem Teil der Kohorte ein Remissionsverhalten induzieren konnte und in einem anderen Teil nicht. In der Nicht-Remissionsgruppe waren die antientzündlichen Effekte geringgradiger ausgeprägt, woraus zu schließen ist, dass IL-6 trans-signaling in ihnen eher eine untergeordnete Rolle für die entzündlichen Prozesse zu spielen schien. Marafini et al. beschrieben bereits, dass es viele Zytokine und deren zugehörigen Signalkaskaden gebe, welche zu den Entzündungsprozessen bei CED beitragen. Einige

Zytokine können dabei medikamentös so beeinflusst werden, dass die Patienten in Remission treten. Dennoch sprechen nicht alle Patienten auf alle Therapien an, was die Komplexität der Pathogenese von CED verdeutlicht (124).

Es scheint eine Subgruppe von CED-Patienten zu geben, welche therapeutisch besonders gut auf die Inhibition von IL-6 trans-signaling anspricht. IL-6 trans-signaling scheint in diesem Patientenkollektiv besonders stark in die Entzündungsvermittlung involviert zu sein.

In der vorliegenden Phase IIa Studie wurden weiterhin genetische Untersuchungen vorgenommen: Hierin konnte eine Olamkicept-spezifische Gensignatur in der entzündeten Darmmukosa nachgewiesen werden und diese Gensignatur unterschied sich von anderen Gensignaturen, welche durch andere remissionsinduzierende Biologika ausgelöst wurden. Somit konnten Olamkicept-spezifische genetische Veränderungen in der Remissionsgruppe nachgewiesen werden (118).

Ein etwas besseres therapeutisches Ansprechen von Olamkicept konnte in CU-Patienten beobachtet werden (Remission 22 % bei CU und 14 % bei MC; Response 56 % bei CU und 29 % bei MC). In der Phase IIb Studie im Zulassungsverfahren von Olamkicept wurde eine doppelblind-Placebo-kontrollierte Studie mit Colitis ulcerosa-Patienten (n=91) (NCT03235752) durchgeführt. Darin konnte in der Behandlungsgruppe eine signifikant stärkere Responseinduktion (58,6 % vs. 34,5 %) und Remissionsinduktion (20,7 % vs. 0 %) nachgewiesen werden (94). Für MC gibt es derzeit noch keine Studien über die Effektivität von Olamkicept.

Als Vergleichswerte sollen nun Remissionsraten von anderen Medikamenten und von Biologika in der CED-Therapie präsentiert werden. Steroide induzieren bei Erwachsenen im Schub bei 73 % Remission, die Enterale Ernährungstherapie bei 45 % (61). Tocilizumab induzierte Remission bei 27 % der Behandelten und bei 11 % in der Placebogruppe, konnte wegen schwerer Nebenwirkungen jedoch nicht für CED zugelassen werden. Vedolizumab führte zu einer signifikant stärkeren Remissionsinduktion in der Behandlungsgruppe bei MC (15 % vs. 7 %) (125). Tofacitinib führte bei MC dosisabhängig zu Remissionsraten von 14-31 % vs. 21 % in Placebogruppe (126) und bei CU zu signifikant unterschiedlichen Remissionsraten von 13-41 % vs. 10 % in Placebogruppe (127). Infliximab war in therapierefraktärer CU effektiver klinische und endoskopische Remission zu induzieren als Placebo (128). Demnach wird deutlich, dass die Remissionsraten von Biologika bei CED unterschiedlich sind, aber

Remissionsraten von >40 % kaum vorzufinden sind. Angemerkt werden soll weiterhin, dass die Vergleichsstudien mit größeren Probandenzahlen als die vorliegende Studie durchgeführt wurden und die effektive Dosierung des Medikaments im Gegensatz zur vorliegenden Studie schon herausgefunden bzw. getestet wurde.

Somit kann festgehalten werden, dass Olamkicept mit der selektiven IL-6 trans-signaling Hemmung einen vielversprechenden Therapieansatz in einer Subgruppe von CED-Patienten darstellt. In diesen konnten Olamkicept-spezifische Genexpressionsveränderungen bestätigt werden. Es bestehen Hinweise, dass Olamkicept ein etwas besseres Therapieansprechen bei CU hat.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das primäre Ziel in der Therapie von CED eine rasche Remissionsinduktion und ein langfristiger Remissionserhalt. Für die Beurteilung von antientzündlichen Effekten werden heutzutage Entzündungsaktivitätsmarker auf multimodalen Ebenen (z.B. klinisch, biochemisch, endoskopisch etc.) untersucht. Angestrebtes Ziel der personalisierten Präzisionsmedizin ist es, den CED-Patienten im Idealfall bereits vor Therapiebeginn effektiv wirksame Medikamente spezifisch zuordnen zu können. Damit soll eine möglichst frühe und zielgerichtete Remissionsinduktion erreicht werden. Für solch eine personalisierte Therapiezuordnung werden derzeit aussagekräftige und spezifische Biomarker gesucht, welche ein Therapieansprechen vorhersagen oder dieses möglichst frühzeitig nach Therapiebeginn erkennen können (7, 54, 129, 129, 130). So wurden auch in dieser Studie verschiedene Entzündungsmarker untersucht, um frühzeitige, spezifische und antientzündliche Veränderungen während der Behandlung mit Olamkicept zu detektieren. Dafür wurden klinische, biochemische, (endoskopische), histologische und immunhistochemische Entzündungsaktivitätsmarker untersucht. Weiterhin wurden die klinischen, biochemischen und histologischen Entzündungsaktivitätsmarker mit den mukosalen Entzündungsmolekülen aus der immunhistochemischen Auszählung korreliert. Damit sollte die Validität der Biomarker unter der Therapie mit Olamkicept geprüft und bewertet werden.

4.4 Klinische Entzündungsparameter und ihre Validität

Die Remissionsgruppe zeigte frühe, starke und stabile Reduktionen der klinischen Entzündungsaktivitätsmarker und langfristig reduzierten sich alle klinischen Scores um mehr

als -85 %. Trotz kleinem n=1 reduzierten sich der CDAI und der HBI als Parameter für MC in der Remissionsgruppe signifikant stärker als in der Nicht-Remissionsgruppe. Der Mayo-Score als Parameter für CU wurde nahezu signifikant stärker in der Remissionsgruppe reduziert. Somit konnte gezeigt werden, dass die klinischen Entzündungsaktivitäten in der Remissionsgruppe deutlich stärker reduziert wurden und klinische Remission in drei Probanden erreicht wurde.

Als valide klinische Entzündungsparameter stellten sich der CDAI für MC und der Mayo-Score für CU heraus: Der CDAI korrelierte mit drei (nahezu vier) immunhistochemischen Markern signifikant, der Mayo-Score mit fünf. Somit scheinen diese beiden Scores die tatsächliche intestinale Entzündungsaktivität unter Olamkicept-Therapie gut zu reflektieren, was bedeutet, dass sie sich für die Beurteilung der vorliegenden Krankheitsaktivität unter der Behandlung mit Olamkicept eignen.

In der Literatur wird der CDAI als Goldstandard für die Untersuchung der Entzündungsaktivität bezeichnet. Er wurde als valides Untersuchungsinstrument beschrieben, auch wenn dies nicht für jede Patientengruppe gelte (z.B. Kinder). Er wurde über Jahre verwendet, um therapeutische Effekte von z.B. Kortikosteroiden, Immunsuppressiva und Biologika zu beurteilen (35, 131). Der CDAI zeigte 1986 bei Gomes et al. keine signifikanten Korrelationen mit mukosalen Inflammationsmarkern. Es gab damals lediglich schwache Korrelationen zwischen CDAI und endoskopischen sowie mikroskopischen Untersuchungen. Dies reflektiere nach deren Interpretation, dass es Differenzen zwischen der klinischen Symptomatik und der tatsächlichen Darmentzündung gebe, weshalb regelmäßige makroskopische und mikroskopische Untersuchungen unverzichtbar seien (131, 132). Zugute gehalten muss dem CDAI, dass er in der Lage ist bei einer Erhöhung eine akute Exazerbation von MC zu erkennen (131).

Der HBI wurde 1980 als vereinfachter Parameter des CDAI entwickelt und korrelierte gut mit diesem (131, 133). In der vorliegenden Studie hatten der CDAI und dessen vereinfachte Unterform, der HBI, erstaunlicherweise kaum ähnliche signifikante Korrelationen mit den immunhistochemischen Parametern. Der HBI hatte lediglich eine signifikante Korrelation, während der CDAI drei (nahezu vier) vorwies. Demzufolge scheint der CDAI als Goldstandard

möglicherweise doch der geeignetere Parameter für die Beurteilung des intestinalen Entzündungsgeschehens zu sein.

Der Mayo-Score ist einer der meistverwendeten Krankheitsaktivitäts-Scores in Placebo-kontrollierten Studien von CED. Der Mayo-Score kann zwischen aktiver und inaktiver Krankheit unterscheiden und kann klinisches Therapieansprechen identifizieren. Der Mayo-Score präsentiert sich somit als valider Entzündungsaktivitätsparameter (134). Hervorgehoben werden soll in der vorliegenden Studie der signifikant positive Zusammenhang zwischen dem Mayo-Score und der STAT3-Aktivierung in der Lamina propria. Da die pSTAT3-Expression in der Lamina propria mutmaßlich einen frühen, spezifischen Marker für das Therapieansprechen von Olamkicept darstellt, würde der Mayo-Score damit als besonders valider Parameter unter Olamkicept-Therapie hervorstechen. Angemerkt werden sollte dazu, dass bei der Erhebung des Mayo-Scores endoskopische Kriterien miteinbezogen werden (134) und der Mayo-Score somit als ein etwas objektiverer Marker als der CDAI und der HBI zu bewerten ist.

Festgehalten werden soll, dass sich CDAI und Mayo-Score als valide Entzündungsaktivitätsparameter unter Olamkicept zu eigen scheinen.

4.5 Biochemische Entzündungsparameter und ihre Validität

Als biochemische Entzündungsparameter sollen nun die Verläufe und die Validität der biochemischen Biomarker CRP, FC sowie Leukozyten und IL-6 unter der Behandlung mit Olamkicept bewertet werden.

4.5.1 CRP und FC

CRP und FC sind die in der klinischen Anwendung am meist verbreiteten nicht-invasiven Biomarker bei CED (44). Die höheren Ausgangswerte von CRP und von FC in der Nicht-Remissionsgruppe sprachen für eine initial stärkere Entzündungsaktivität in dieser, verglichen mit der Remissionsgruppe. In beiden Gruppen reduzierten sich CRP und FC deutlich, frühzeitig und signifikant stärker, mit frühzeitigem Erreichen von normwertigen Konzentrationen und damit biochemischer Remission in der Remissionsgruppe. CRP und FC eignen sich somit eine frühzeitige biochemische Remission unter Olamkicept zu erkennen.

Mit der Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass CRP und FC die intestinale Entzündungsaktivität unter Olamkicept-Therapie gut abzubilden scheinen, denn CRP korrelierte mit vier und FC mit fünf von sieben mukosalen, immunhistochemischen Parametern signifikant positiv.

CRP und FC korrelierten erfreulicherweise signifikant positiv mit der Expression von Olamkicepts Zielmolekül pSTAT3 (sowohl epithelial als auch in der Lamina propria). Somit scheint der Grad der intestinalen STAT3-Aktivierung mit der Höhe von CRP und FC in Beziehung zu stehen. Damit wird ein direkter Zusammenhang zwischen biochemischer Entzündungsaktivität und intestinaler STAT3-Aktivierung belegt. Dies stellt ein Schlüsselergebnis dieser Dissertation dar, da somit wechselseitig die Parameter CRP, FC und intestinales pSTAT3 als valide Parameter für die Beurteilung der Krankheitsaktivität unter Olamkicept-Therapie eingestuft werden können.

Außerdem korrelierten CRP und FC mit der Anzahl der intestinalen Neutrophilen Granulozyten. Für FC wurde dies erwartet, da FC als Zytosolprotein von Neutrophilen Granulozyten einen direkten Bezug zur Anzahl der Neutrophilen Granulozyten hat. FC wird nämlich bei der Aktivierung oder beim Tod von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt (53). Zur tiefergehenden Validierung von CRP und FC soll nun auf die derzeitige Studienlage eingegangen werden.

4.5.1.1 CRP

CRP ist ein bewährter diagnostischer Marker bei CED, auch wenn er unspezifisch für CED ist (44). In der Literatur gibt es kontroverse Ergebnisse bezüglich der Korrelationen von CRP mit klinischen, endoskopischen und histologischen Parametern (135). In Changs Review wurde zusammengefasst, dass erhöhtes CRP positiv mit klinischer und endoskopischer Entzündungsaktivität korrelierte und erhöhtes CRP auf Krankheitsrezidive hinweisen könne. Daher fordere ein erhöhtes CRP stets weitere diagnostische Schritte. Andererseits könne CRP bei endoskopisch aktiver Entzündung auch falsch negativ sein (44) und habe dementsprechend einen schlechten negativ prädiktiven Wert (32). Kyle et al. beschrieben kürzlich, dass CRP nicht mit den Befunden aus histologischen Analysen korrelierte (136). Solem et al. bestätigten wiederum Assoziationen zwischen CRP und klinischer sowie endoskopischer Entzündung und bei MC zusätzlich mit schwerer histologischer Entzündung (137).

Nicht unterschlagen werden sollte, dass CRP bei globaler IL-6 Hemmung durch Tocilizumab bei Rheumatoider Arthritis ungeeignet ist, Krankheitsaktivität und die Schwere einer Infektion zu erkennen. Dies liege vermutlich an der globalen IL-6 Hemmung, welche die Produktion der Akuten Phase Proteine aus der Leber blockiert (138). Daher stellt sich die Frage, ob CRP unter selektiver IL-6 Inhibition verlässlich in der Beurteilung von Entzündungsaktivität ist. Garbers et al. beschrieben, dass körpereigenes sgp130 nicht nur IL-6 trans-signaling, sondern auch IL-6 classic signaling inhibieren könne. Dies sei bei Vorliegen von hohen sgp130-Konzentrationen möglich: Unter diesen Bedingungen könne sgp130 nämlich freies IL-6 in IL-6/IL-6R/sgp130-Komplexe binden, wodurch IL-6 classic signaling blockiert werde (139).

Möglicherweise könnte dieser Mechanismus, dass körpereigenes sgp130 classic signaling blockieren kann, auf Olamkicept übertragen werden. Damit würde die Produktion der Akuten Phase Proteine (u.a. CRP) in der Leber via IL-6 classic signaling blockiert werden und damit würden die Konzentrationen von CRP abnehmen. Dies würde die Aussagekraft von CRP unter Olamkicept einschränken. Interessanterweise wurde in der Nicht-Remissionsgruppe eine unerwartet starke und frühe Reduktion von CRP beobachtet, was dazu passen könnte, dass die CRP-Produktion in der Leber eingeschränkt worden sein könnte. Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um Mutmaßungen.

Ob sich CRP zukünftig als geeigneter Verlaufsparemeter unter Olamkicept Therapie eignet, muss weiter geprüft werden. Die Ergebnisse dieser Dissertation bestärken CRP jedoch als validen Entzündungsaktivitätsparameter unter selektiver IL-6 Hemmung.

4.5.1.2 FC

FC wird als sensitiver (93 %) und spezifischer (96 %) Entzündungsparameter für CED beschrieben. Auch bei FC handelt es sich um einen unspezifischen Entzündungsmarker für CED, da FC bei jeglicher Art von Darmentzündungen z.B. bei Infektion oder Divertikulitis erhöht sein kann. FC korreliert gut mit klinischen Befunden von CED und noch weitaus besser mit endoskopischen Befunden als CRP. Insgesamt stellt FC somit den verlässlicheren Biomonitoring-Parameter zur Beurteilung der Entzündungsaktivität und des Therapieansprechens bei CED dar (44, 136).

Somit zeigten sich CRP und FC als bewährte, gute und valide Biomarker für die Einschätzung der intestinalen Entzündungsaktivität und somit für das Therapiemanagement unter

Olamkicept. Anhand beider Parameter konnte biochemische Remission erkannt werden, sie unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen und zeigten mehrere signifikante Korrelationen mit anderen Entzündungsparametern. Insgesamt muss FC als überlegener Biomarker gegenüber CRP bestärkt werden.

Falls Olamkicept tatsächlich die CRP-Produktion über die Inhibition von IL-6 classic signaling beeinflussen sollte, dann sollte Vorsicht bei der Interpretation der CRP-Werte unter Olamkicept-Therapie geboten sein. Dennoch soll wiederholt werden, dass CRP entsprechend der Studienergebnisse einen guten und validen Biomarker für die Beurteilung der biochemischen Entzündungsaktivität darstellt, da er sich zum einen signifikant stärker in der Remissionsgruppe reduzierte und zudem mehrfach signifikant positive Korrelationen mit der intestinalen Zell- und Molekülzusammensetzung aufwies.

4.5.2 Leukozyten

Leukozyten setzten sich aus Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten zusammen (140). Obwohl die Anzahl der Leukozyten im Serum in der Remissionsgruppe signifikant stärker reduziert wurde, scheinen sie keinen guten Parameter für die Beurteilung der intestinalen Entzündungsaktivität unter Olamkicept darzustellen, denn sie korrelierte lediglich mit der Ki-67-Expression in der Lamina propria. Widererwarten korrelierte die Anzahl der Leukozyten weder mit der intestinalen T-Zell-Anzahl noch mit der Anzahl an Neutrophilen Granulozyten. Damit ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Immunzellen im Blut und der im Darm unwahrscheinlich. Die Immunzellen im Blut und die im Darm scheinen somit als zwei voneinander getrennte Kompartimente betrachtet werden zu müssen. Verglichen mit CRP und FC, hat die Leukozytenzahl im diagnostischen Algorithmus von CED derzeit einen geringen Stellenwert (7, 32). Kyle et al. zeigten kürzlich, dass die Leukozytenzahl nicht mit den Befunden aus Biopsien korrelierte (136). Dies passt gut mit den Studienergebnissen zusammen: Die Leukozyten scheinen zu unspezifisch für die Beurteilung der Entzündungsaktivität bei CED zu sein.

4.5.3 IL-6

Mehrere Studien zeigten bereits einen signifikanten Anstieg von zirkulierendem IL-6 und vom sIL-6R in CED-Patienten, v.a. bei Patienten mit aktiver CED. Das erhöhte IL-6 und sIL-6R korrelierten dabei mit den CRP-Konzentrationen (141). In der Studie war die

Ausgangskonzentration von IL-6 im Serum in der Remissionsgruppe deutlich gegenüber der Nicht-Remissionsgruppe erhöht. Zudem reduzierte sich IL-6 in der Remissionsgruppe stark, jedoch nicht signifikant stärker, auf frühzeitig normwertige IL-6 Konzentrationen. Kaiser et al. zeigten in einem Frakturmodell, dass sich zirkulierendes IL-6 in den ersten Stunden unter Olamkicepts Vorläufermodell sgp130-Fc signifikant reduzierte. Daraufhin stieg es jedoch wieder signifikant an (142). Einen Anstieg der IL-6 Konzentration konnten in dieser Studie nicht beobachtet werden. Gemeinsam bleibt die Reduktion von IL-6 unter IL-6 trans-signaling Inhibition. Diese Reduktion von IL-6 in der Remissionsgruppe könnte zum einen durch eine molekulare Bindung („Abfangen“) von IL-6 über den IL-6/sIL-6R-Komplex durch Olamkicept erklärt werden oder zum anderen als das Resultat einer geringeren Produktion von IL-6 im Rahmen von antientzündlichen Effekten erklärt werden.

Da IL-6 im Serum keine signifikanten Korrelationen mit der feinmolekularen Situation im Darm hatte, scheint IL-6 kein valider und aussagekräftiger Entzündungsaktivitätsparameter unter der Therapie von Olamkicept bei CED zu sein. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass IL-6 in dieser Studie an deutlich weniger Datenpunkten erhoben wurde als die anderen Parameter, was das Erreichen von statistischen Signifikanzen erschwert. Reinisch et al. zeigten beispielsweise, dass IL-6 im Serum mit der Entzündungsaktivität (CDAI) korrelierte (143).

Über die Aussagekraft von IL-6 als Marker für Entzündung gibt es in der derzeitigen Literatur viel Diskussionspotential. Als frühzeitiger Marker für eine hochakute Sepsis und einen septischen Schock eignet es sich gut (144). Für CED ist bekannt, dass IL-6 nur in einer Minderheit der CED-Patienten erhöht ist und dort allerdings mit einer erhöhten Krankheitsaktivität einhergeht (66). In der vorliegenden Studie kann ähnliches beobachtet werden, denn drei Probanden zeigten vor Therapiebeginn deutlich erhöhte IL-6 Werte (82-120 pg/ml) und gleichzeitig hohe klinische, biochemische und histologische Entzündungsaktivitäten, welche sich teilweise früh und deutlich reduzierten. Für weiterführende Aussagen reichen diese Ergebnisse nicht aus.

Da sich IL-6 in der Remissionsgruppe frühzeitig auf normwertige Konzentrationen reduzierte, könnte IL-6 möglicherweise ein diagnostischer Stellenwert zum Erkennen von Therapieansprechen zugeschrieben werden. Obwohl IL-6 weder eine signifikante Reduktion noch eine signifikante Korrelation mit der Immunhistochemie zeigte, wäre ein finaler

Ausschluss von IL-6 als diagnostischen Parameter unter der Therapie mit Olamkicept noch zu früh.

Eine weiterführende Studienidee wäre es, gezielt eine größere Fallgruppe von CED-Patienten mit erhöhten IL-6 Konzentrationen zu selektieren, deren Entzündungsaktivitäten zu monitoren und das Ansprechen auf Olamkicept zu untersuchen.

4.5.4 Fazit der biochemischen Entzündungsaktivitätsparameter

Es konnte bestätigt werden, dass sich CRP und FC als sehr gute, valide und objektive Biomarker für das Entzündungsaktivitätsmonitoring unter Olamkicept eignen. Sie markierten frühzeitig einen intestinalen Entzündungsrückgang, indem sie in der Remissionsgruppe normwertige Konzentrationen erreichten und haben zudem viele signifikante Beziehungen mit den intestinalen, feinmolekularen Entzündungsprozessen. FC scheint CRP dabei an Aussagekraft und Spezifität überlegen zu sein. Hingegen ist die Validität von Leukozyten und IL-6 als Entzündungsaktivitätsmarker eher als gering zu bewerten, wobei eine abschließende Untersuchung über die Eignung von IL-6 als Biomarker unter Olamkicept-Therapie abgewartet werden sollte. Bei Schoepfer et al. konnte FC als einziger Marker zwischen endoskopisch mild-aktiver und inaktiver Krankheitsaktivität unterscheiden. Die Detektionsrate von endoskopisch aktiver Entzündung lag für FC bei 87 %, für CRP bei 66 % und für Leukozyten bei 54 % und zum Vergleich mit klinischen Parameter für den CDAI bei 40 % (145).

4.6 Endoskopische und histologische Entzündungsparameter und ihre Validität

Ein deutlicher Abfall des SES-CD war zwischen 0h und +14 w ersichtlich, jedoch konnten aufgrund der wenigen Daten keine Korrelationen mit dem SES-CD berechnet werden, weshalb eine Validitätsprüfung nicht möglich war. Der SES-CD korrelierte bei Schoepfer et al. am besten mit FC, gefolgt von CRP, Leukozyten und CDAI (145).

Der Nancy-Index als histologischer Entzündungsaktivitätsscore für CU zeigte eine nahezu signifikant stärkere Reduktion in der Remissionsgruppe. Erstaunlicherweise zeigte der Nancy-Index keine einzige signifikante Korrelation mit den immunhistochemischen Parametern. Dies wäre zu erwarten gewesen, da der Nancy-Index und die Immunhistochemie auf den gleichen histologischen Präparaten beruhen. Verwunderlich ist dabei vor allem die fehlende signifikante Korrelation zwischen dem Nancy-Index und der Anzahl der Neutrophilen

Granulozyten, da deren Anzahl ein Kriterium des Nancy-Index darstellt. In der Literatur wurde der Nancy-Index als gut validierter Score für den intestinalen Entzündungsnachweis beschrieben und ihm wird eine hohe Inter- und Intraobserver-Reliabilität zugeschrieben, was ihn zu einem verlässlichen Beurteilungsscore macht (146). Warum der Nancy-Index bei uns keine signifikanten Korrelationen erbrachte, bleibt unklar.

4.7 Einfluss von Olamkicept auf intestinale Zellen und deren STAT3-Aktivierung

Die intestinale pSTAT3-Expression lag im besonderen Fokus dieser Dissertation, da untersucht werden sollte, ob die intestinale STAT3-Aktivierung durch Olamkicept reduziert werden konnte und IL-6 trans-signaling damit eine bedeutende Rolle für das mukosale Entzündungsgeschehen zugeschrieben werden kann.

4.7.1 Epitheliale pSTAT3-Expression

Die epitheliale pSTAT3-Expression reduzierte sich überraschenderweise in beiden Gruppen erst spät und stark und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei einer effizienten Inhibition von epithelialen IL-6 trans-signaling durch Olamkicept wäre eine frühere Reduktion der pSTAT3-Expression erwartet worden. Möglicherweise wurde epitheliales STAT3 nicht primär über IL-6 trans-signaling, sondern zum größeren Anteil über andere Signalwege aktiviert.

Epitheliales STAT3 in Darmzellen ist wichtig für Proliferation und für intestinale Wundheilung. Eine epitheliale STAT3-Defizienz führte zu schweren chronischen Entzündungen (71, 86, 147, 148). Eine medikamentöse, globale Hemmung aller IL-6 Signalwege (classic, trans-signaling und trans-presentation) führte in einer klinischen Studie bei CED-Probanden zu schweren intestinalen Wundheilungsstörungen (Abszesse, Perforation) (91, 92). Aden et al. zeigten in einem Colitis-Modell, dass IL-6 trans-signaling und IL-22 hauptverantwortlich für die epitheliale STAT3-Zielgenexpression in Darmzellen waren und damit wichtig für intestinale Wundheilung waren (83). Daher bestand bei Studienbeginn die Sorge, dass eine Hemmung von IL-6 trans-signaling zu Wundheilungsstörungen führen könnte. Erfreulicherweise konnten solche Effekte durch Olamkicept bisher sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der asiatischen Studie nicht beobachtet werden (94). Das epitheliale Proliferationsverhalten, abgebildet durch die epitheliale Ki-67-Expression, wurde in dieser Studie nicht durch

Olamkicept eingeschränkt. Kaiser et al. untersuchten in einem Frakturmodell globale (Tocilizumab) und selektive (sgp130-Fc) IL-6 Hemmung und ihren Einfluss auf die Knochenheilung. Sie zeigten, dass sich die Knochenheilung unter selektiver, jedoch nicht unter globaler IL-6 Hemmung verbesserte (142, 149). Dabei sollte beachtet werden, dass nicht von Knochenheilung auf intestinale Wundheilung geschlossen werden sollte.

Pickert et al. zeigten in einem Colitis-Mausmodell, dass die epitheliale STAT3-Aktivierung eher von IL-22 als von IL-6 abhängig war. Epitheliales STAT3 war wichtig für die gastrointestinale Homöostase, regulierte Stressantworten, das Apoptoseverhalten sowie mukosale Wundheilungsprozesse in Epithelzellen (148). Somit legten Pickert et al. die Bedeutung von IL-22 und epithelialer STAT3-Aktivierung für mukosale Wundheilung dar (148). Jiang et al. berichteten, dass in Darmgewebeproben von CU, verglichen mit Darmgewebeproben von Gesunden signifikant erhöhte IL-22 Konzentrationen vorlagen. Bei CU vermittele IL-22 über eine STAT3-Aktivierung Tumorstadium und eine Inhibition von Apoptose (150). Möglicherweise ist auch in humaner CED die epitheliale STAT3-Aktivierung eher IL-22 als IL-6 trans-signaling zuzuschreiben. Dies würde dazu passen, dass sich epitheliales pSTAT3 nicht frühzeitig nach Olamkicept-Gabe, sondern erst nach sechs Wochen remissionsunabhängig reduzierte. Möglicherweise sank die pSTAT3-Expression im Rahmen von allgemein antientzündlichen und wundheilungsfortgeschrittenen Prozessen.

Somit kann festgehalten werden, dass der Einfluss von Olamkicept auf die epitheliale STAT3-Aktivierung etwas unklar bleibt. Erfreulicherweise evozierte Olamkicept bislang keine schweren intestinalen Wundheilungsstörungen. Es scheint daher, dass die epitheliale Expression von pSTAT3 und die epitheliale Wundheilung weniger von IL-6 trans-signaling abhängig ist und eher von anderen Zytokinen wie möglicherweise IL-22 beeinflusst wird. In künftigen Studien mit Olamkicept sollte weiterhin besonders auf intestinale Wundheilungsstörungen geachtet werden.

Auch wenn epitheliales pSTAT3 möglicherweise nicht primär von IL-6 trans-signaling beeinflusst zu werden scheint, so spiegelt es dennoch gut die intestinale Entzündungsaktivität, da epitheliales pSTAT3 signifikant positiv mit mehreren validierten Entzündungsaktivitätsparametern korrelierte (CRP, FC, CDAI, Mayo-Score). Die STAT3-Aktivität in intestinalen Epithelzellen korrelierte bereits bei Pickert et al. mit dem intestinalen Entzündungsgrad (148). Somit bestätigte sich, dass die epitheliale pSTAT3-Expression in Bezug

mit intestinalen Entzündungsprozessen steht, jedoch nicht primär durch IL-6 trans-signaling induziert zu werden scheint.

4.7.2 pSTAT3-Expression in der Lamina propria

Während bei der epithelialen pSTAT3-Expression vermutlich eher kein direkter Einfluss durch die IL-6 trans-signaling Hemmung beobachtet wurde, so scheint dies bei der pSTAT3-Expression in der Lamina propria gegensätzlich zu sein. In der Lamina propria reduzierte sich die pSTAT3-Expression bereits früh und zudem signifikant stärker in der Remissionsgruppe. IL-6 trans-signaling schien in den Zellen der Lamina propria in der Remissionsgruppe vor Therapiebeginn vermehrt aktiviert gewesen zu sein. Daher konnte Olamkicept diese STAT3-Aktivierung frühzeitig und signifikant vermindern. Dies ist ein Schlüsselergebnis: Die Expression von pSTAT3 in der Lamina propria stellt einen frühen, spezifischen Marker für das Therapieansprechen von Olamkicept dar. Zudem scheint pSTAT3 in der Lamina propria ein valider Marker zu sein, da es mit drei wichtigen Entzündungsaktivitätsparametern korrelierte (CRP, FC, Mayo-Score). In der Transkriptomanalyse, einer Art genetischen Untersuchung, dieser Phase IIa Studie war die Olamkicept-induzierte Remission mit einer spezifischen Herunterregulation von STAT3-abhängigen Genen in der intestinalen Mukosa assoziiert (118). Somit wurde gezeigt, dass intestinales STAT3 entscheidend in den Wirkmechanismus von Olamkicept involviert ist und als früher spezifischer Marker für Therapieansprechen verwendet werden kann.

Die Lamina propria ist ein gut durchblutetes und zellreiches Bindegewebe. Viele freie Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, Dendritische Zellen und Lymphozyten sind in ihr enthalten (116). Dementsprechend liegt es nahe, dass in der Lamina propria vorwiegend Immunzellen durch Olamkicept in ihrem STAT3-Signaling beeinflusst worden sind. Es wurde nicht näher spezifiziert, in welcher Immunzellgruppe – ob in Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten oder in Makrophagen – die pSTAT3-Expression am stärksten reduziert worden ist und welche Zellgruppe daher am meisten von IL-6 trans-signaling beeinflusst wurde.

Musso et al. berichteten von einer STAT3-Aktivierung in T-Zellen und in Makrophagen der Lamina propria, wobei die STAT3-Aktivierung auf entzündete Darmareale begrenzt war (151). Auch Lovato et al. berichtete von einer vermehrten STAT3-Aktivierung in intestinalen T-Zellen

bei MC (88). Über die STAT3-Aktivierung in Neutrophilen Granulozyten bei CED war leider keine Literatur zu finden. Betont werden soll diesbezüglich, dass eine STAT3-Aktivierung nicht zwangsläufig durch IL-6 trans-signaling vermittelt wird.

Im Folgenden soll darauf eingegangen werden, welche Einflüsse die untersuchten Immunzellen der Lamina propria - T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten - auf IL-6 trans-signaling haben und zum anderen, was IL-6 trans-signaling in diesen Zellgruppen bewirkt.

4.7.3 Zellen der Lamina propria und IL-6 trans-signaling

Atreya und Neurath beschrieben, dass T-Helferzellen und Makrophagen einen Beitrag zur unkontrollierten Entzündung bei CED leisten, indem sie vermehrt IL-6 und den löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) freisetzen (152). Neutrophile Granulozyten spalten bei der Einwanderung ins entzündlich betroffene Gewebe ihren membranösen IL-6R ab und verstärken damit ebenfalls lokales IL-6 trans-signaling (70). Es ist bekannt, dass eine erhöhte Menge von sIL-6R mit dem Grad der Neutrophilen Infiltration korreliert. Die Verbreitung von gewebeständigen Neutrophilen Granulozyten bestimme den Grad von lokal stattfindendem IL-6 trans-signaling und darüber auch die Einwanderung von mononuklearen Zellen wie den T-Zellen (70, 153). In einer klassischen Entzündungsantwort wandern zu Beginn Neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein und initiieren dort IL-6 trans-signaling, indem sie ihren IL-6 Rezeptor abspalten. Mononukleare Zellen (T-Zellen, Makrophagen) werden wiederum über IL-6 trans-signaling zur Einwanderung ins Gewebe angeregt, während die Neutrophilen Granulozyten normalerweise zeitnah in Apoptose gehen. IL-6 trans-signaling löst also einen Shift von der akuten (Neutrophile Granulozyten) zur chronischen Entzündungsantwort (T-Zellen) aus (70, 153, 154). Somit leisten T-Zellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten ihren jeweiligen Beitrag zum IL-6 trans-signaling.

4.7.4 Intestinale T-Zellen (CD3)

Intestinale Lymphozyten stammen überwiegend aus der Gruppe der T-Helferzellen mit wiederum weiteren Untergruppen. T-Helferzellen sind wichtige Vermittler in der immunologischen Homöostase und in Entzündungsprozessen. Eine Akkumulation von T-Zellen stellt ein Schlüsselement in der Pathogenese von CED dar (155). IL-6 trans-signaling trage zur

Rekrutierung von T-Zellen und zum Erhalt ihrer Funktion bei. Dabei werden die T-Zellen u.a. durch Neutrophile Granulozyten und deren freigesetzten, proinflammatorische Mediatoren rekrutiert und aktiviert (70, 153, 156). IL-6 trans-signaling trägt demnach zur intestinalen Anzahl und Aktivität von T-Zellen bei. Dies könnte erklären, warum vor Therapiebeginn in der Remissionsgruppe, in der IL-6 trans-signaling möglicherweise vermehrt aktiviert war, eine deutlich höhere intestinale T-Zellpopulation (CD3) vorlag.

Des Weiteren ist bekannt, dass IL-6 trans-signaling in intestinalen T-Zellen eine Resistenz gegenüber dem natürlichen Zelltod (Apoptose) vermittelt und damit zur Aufrechterhaltung von CED beiträgt. IL-6 trans-signaling aktiviert nämlich in T-Zellen intrazelluläres STAT3, welches wiederum die anti-apoptotischen Faktoren bcl-2 und bcl-xl induziert. Mithilfe dieser entziehen sich die T-Zellen dem natürlichen Zelltod und überleben unphysiologisch lange Zeiträume. Durch den ausbleibenden Zelltod der T-Zellen trägt IL-6 trans-signaling zu einer Akkumulation von ihnen bei, wodurch entzündliche Prozesse gefördert werden. In einem in vivo Colitis-Tiermodell wurde nachgewiesen, dass Olamkicepts Vorläufermodell sgp130-Fc Apoptose in T-Helferzellen induzierte und gleichzeitig die Colitis-Aktivität senkte (90, 157). Diese Effekte können auf die Remissionsgruppe übertragen werden: Im Therapieverlauf reduzierte sich die Entzündungsaktivität und die T-Zellzahl nahm ab, während sie in der Nicht-Remissionsgruppe zunahm. Zudem reduzierte sich zusätzlich die pSTAT3-Expression in der Lamina propria signifikant, was theoretisch folgendermaßen zu erklären sein könnte: Durch die Inhibition von IL-6 trans-signaling wurde weniger STAT3 in den T-Zellen aktiviert und damit auch weniger anti-apoptotischen Faktoren. Dadurch gingen die T-Zellen vermehrt in den natürlichen Zelltod über, die T-Zellzahl nahm ab. Somit würde eine direkte, durch Olamkicept initiierte Kausalkette zum Zelltod der T-Zellen führen, wodurch die intestinale Entzündung abgeschwächt werden würde.

Im Kontrast zur Nicht-Remissionsgruppe wurde in der Remissionsgruppe sowohl eine unmittelbare (-16 %) als auch eine langfristige (-45 %) Reduktion der CD3-Zellzahl unter Olamkicept beobachtet. Es ist vor eben genanntem Hintergrund plausibel, dass die Inhibition von IL-6 trans-signaling zu einer Induktion von Apoptose in T-Zellen und/oder zu einer verminderten Rekrutierung von T-Zellen führte.

In der Nicht-Remissionsgruppe schien IL-6 trans-signaling hingegen eine untergeordnete Rolle

zu spielen, denn die CD3-Zellzahl stieg zunehmend an (insgesamt +25 %), was für ein IL-6 trans-signaling unabhängiges Entzündungsgeschehen in der Nicht-Remissionsgruppe spricht.

Da keine weitere Differenzierung von vorliegenden T-Zell Subgruppen (Treg, TH17 etc.) vorgenommen wurde, wäre es künftig interessant zu untersuchen, welche T-Zellgruppe besonders von IL-6 trans-signaling beeinflusst wird. Dies könnte zum Verständnis der ätiologischen Bedeutung von IL-6 trans-signaling und T-Zellen in CED beitragen.

Statistisch zeigte die CD3-Expression in dieser Studie trotz gegensätzlicher Verläufe (CD3-Reduktion in der Remissionsgruppe vs. CD3-Anstieg in der Nicht-Remissionsgruppe) unerwarteterweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dennoch könnte eine hohe CD3-Expression in der Lamina propria vor Therapiebeginn möglicherweise Hinweise auf ein Therapieansprechen auf Olamkicept geben. Die Validität der CD3-Expression muss allerdings bemängelt werden, da die CD3-Expression lediglich mit FC signifikant positiv korrelierte. Allerdings ist FC ein gut validierter Entzündungsaktivitätsparameter, weshalb die signifikante Korrelation zwischen der CD3-Expression und FC hervorgehoben werden sollte. Einem Ausschluss der CD3-Expression in der Diagnostik bei CED sollte noch abwartend gegenüberstehen, da eine IL-6 trans-signaling vermittelte Ätiopathogenese bei CED erforscht wurde und sich der Verlauf der T-Zellzahl deutlich zwischen Remissions- und Nicht-Remissionsgruppe unterschied.

Festgehalten werden kann, dass die intestinale CD3-Zellzahl in der Remissionsgruppe im Gegensatz zur Nicht-Remissionsgruppe durch Olamkicept deutlich, jedoch nicht signifikant, reduziert wurde. Dies könnte durch eine Apoptose Induktion in T-Zellen und durch eine reduzierte Einwanderung von T-Zellen in die Lamina propria evoziert worden sein.

4.7.5 Intestinale Makrophagen (CD68)

Intestinale Makrophagen (CD68) stellen die größte und eine heterogene Population von gewebeständigen mononukleären Phagozyten dar. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenerkennung und deren Eliminationen. Es ist bekannt, dass sie ebenfalls Funktionen im Erhalt der Gewebekomöostase einnehmen. Sie können einerseits Entzündungen durch antiinflammatorische Zytokine abmildern und andererseits können Störungen in der antiinflammatorischen Funktion chronisch entzündliche Darmerkrankungen bedingen. Zu der

Zellgruppe der Makrophagen zählen sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Untergruppen (158, 159). Eine STAT3-Aktivierung steht in Makrophagen für ein antiinflammatorisches Signal. Hillmer et al. zeigten, dass STAT3-defiziente Makrophagen bei einer Aktivierung von bestimmten Oberflächenrezeptoren vermehrt proinflammatorische Zytokine produzierten (160). Somit wird die Bedeutung einer STAT3-Aktivierung für antiinflammatorisch wirkende Makrophagen deutlich. In der vorliegenden Studie wurde nicht näher klassifiziert, zu welcher Untergruppe die Makrophagen in der Lamina propria vorwiegend zählten. Da die Expression von CD68 in beiden Gruppen stark schwankend und insgesamt ansteigend verlief, ist ein direkter Wirkeffekt von Olamkicept auf Makrophagen schwer nachvollzieh- und interpretierbar. Die direkten Einflüsse von IL-6 trans-signaling auf Makrophagen sind bislang noch unerforscht.

Da die erhobenen Entzündungsaktivitätsparameter nicht mit der CD68-Expression korrelierten, unterstreicht dies einmal mehr, dass die CD68-Expression keinen geeigneten Entzündungsaktivitätsparameter unter Olamkicept-Therapie darstellt.

4.7.6 Intestinale Neutrophile Granulozyten (MPO)

Es ist bekannt, dass Neutrophile Granulozyten als Immunzellen der ersten Abwehr einen Beitrag für CED leisten. In der Literatur gibt es viele Unklarheiten über den direkten Einfluss von IL-6 trans-signaling auf Neutrophile Granulozyten.

In der Remissionsgruppe war die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten vor Therapiebeginn deutlich gegenüber der Nicht-Remissionsgruppe erhöht und sie reduzierte sich bereits unmittelbar (-44 %) und langfristig (-78 %) am stärksten, was im Gegensatz zur Nicht-Remissionsgruppe steht (unmittelbar +16 % und insgesamt -5,8 %). Ein signifikanter Unterschied konnte trotz des gegensätzlichen Verlaufes nicht bestätigt werden. Die Neutrophilen Granulozyten präsentierten mehrere signifikant positive Korrelationen mit anerkannten Entzündungsparametern (CRP, Calprotectin, CDAI, Mayo-Score), was eine hohe Validität der MPO-Expression in der Lamina propria unter der Therapie mit Olamkicept untermauert.

Neutrophile Granulozyten sind zentrale Immunzellen der angeborenen Immunität. Sie vermitteln die erste Abwehrfunktion gegen eindringende Pathogene, indem sie zytotoxische

Moleküle ausschütten (Neutrophile Degranulation). Diese zytotoxischen Moleküle, die zwar gegen Pathogene gerichtet sind, schädigen auch das körpereigene Gewebe. Daher ist es wichtig, dass Neutrophile Granulozyten nach einer gewissen Zeit in den Zelltod übergehen (161). Es ist bekannt, dass eine Störung im Apoptoseverhalten von Neutrophilen Granulozyten durch eine Akkumulation am Entzündungsort zu chronischen Entzündungen führen kann (156, 161). Für CED ist bekannt, dass der natürliche Zelltod von Neutrophilen verzögert stattfindet. Außerdem wurde gezeigt, dass durch Neutrophile Granulozyten ausgelöste Gewebeschäden mit der Entwicklung von CED assoziiert sind (162).

In der Transkriptom-Analyse stachen sowohl im Blut als auch in der Mukosa herunterregulierte Gene und Transkriptionsfaktoren hervor, welche die Funktion, Aktivierung, Differenzierung und Degranulation von Neutrophilen Granulozyten modifizieren. Eine Olamkicept-spezifische Gensignatur wurde erkannt, welche die Modalitäten von Neutrophilen Granulozyten beeinflusst (118). Damit wird ein direkter Einfluss von Olamkicept auf Neutrophile Granulozyten deutlich, was einen entscheidenden Einfluss von IL-6 trans-signaling auf Neutrophile Granulozyten in einer Subgruppe von CED untermauert.

Dadurch, dass die Neutrophilen Granulozyten auf biochemischer (FC), immunhistochemischer (MPO) und transkriptioneller Ebene und durch die vielen signifikanten Korrelationen hervorstachen, wird deutlich, dass den Neutrophilen Granulozyten eine Sonderstellung in der Pathogenese von CED mit Therapieansprechen auf Olamkicept zukommt. Sie scheinen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von den entzündlichen Prozessen einzunehmen und in Verbindung mit IL-6 trans-signaling zu stehen.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind schubartig auftretende, lebenslang andauernde Erkrankungen, deren bestehenden Therapieoptionen unzureichend sind. So wurde das Medikament Olamkicept entwickelt, welches selektiv einen proinflammatorischen Signalweg von Interleukin-6 (IL-6), das IL-6 trans-signaling, inhibiert. IL-6 trans-signaling wird eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungen zugeschrieben.

Olamkicept wurde in dieser prospektiven 12-wöchigen Phase IIa Studie der Arzneimittelzulassung erstmals an 16 Probanden mit aktiven, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verabreicht. Die Beurteilung und Veränderungen der wurden in dieser Dissertation auf klinischer, biochemischer, endoskopischer, histologischer und immunhistochemischer Ebene untersucht und damit ein Therapieansprechen überprüft. Der Fokus lag auf der immunhistochemischen Auswertung von entzündlich assoziierten Molekülen im Darmgewebe. Die Validität der verschiedenen Entzündungsaktivitätsparameter wurde anschließend mit Korrelationsanalysen geprüft.

44 % der Probanden zeigten ein Response-Verhalten und 19 % erreichten klinische Remission mit endoskopischer Heilung. Der Wirkmechanismus von Olamkicept, die Inhibition von IL-6 trans-signaling, konnte remissionsunabhängig in vitro nachgewiesen werden.

Die klinischen und biochemischen Entzündungsparameter reduzierten sich zum Großteil signifikant stärker in der Remissionsgruppe. CRP, fäkales Calprotectin und zwei klinische Entzündungsaktivitätsindizes (CDAI, Mayo-Score) bestätigten sich als besonders valide Entzündungsaktivitätsparameter.

Die immunhistochemischen Parameter reduzierten sich insgesamt früher, stärker und stabiler in der Remissionsgruppe. Die Expression des Zielmoleküls von Olamkicept, der Transkriptionsfaktor pSTAT3, reduzierte sich in der Lamina propria früh und als einziger Parameter signifikant stärker in der Remissionsgruppe. Zudem korrelierte pSTAT3 in der Lamina propria signifikant positiv mit CRP, Calprotectin und dem Mayo-Score. Die pSTAT3-Expression in der Lamina propria stellt somit einen frühen und spezifischen Marker für das Therapieansprechen auf Olamkicept dar.

Des Weiteren war die Anzahl von intestinalen T-Zellen und Neutrophilen Granulozyten vor Therapiebeginn in der Remissionsgruppe deutlich erhöht. Sie reduzierten sich stark in der Remissionsgruppe, allerdings nicht signifikant stärker als in der Nicht-Remissionsgruppe. Die

Neutrophilen Granulozyten wiesen mehrere signifikante Korrelationen mit anerkannten Entzündungsparametern auf. Es scheint, dass Neutrophile Granulozyten einen besonderen Stellenwert in der Pathogenese von CED mit Therapieansprechen auf Olamkicept einnehmen. Zusammengefasst stellt Olamkicept in einer Subgruppe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einen vielversprechenden Therapieansatz dar. IL-6 trans-signaling scheint in diesen ein entscheidender Entzündungsvermittler zu sein, denn Olamkicept konnte in dieser Subgruppe multimodale, spezifische Veränderungen von Entzündungsmustern evozieren.

6 Literaturverzeichnis

1. De Souza, Heitor S. P., Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13(1):13–27.
2. Turse JC, Schuman BM, Tedesco FJ. Differentiating Crohn's colitis from ulcerative colitis. A rundown of likenesses and dissimilarities. *Postgrad Med*. 1988; 83(4):323–30.
3. Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol*. 2014; 26(1):75–9.
4. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(8):123-33.
5. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Vavricka BMP, Zeitz J et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(1):110-9.
6. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Review of the evidence. *Tech Coloproctol*. 2019; 23(1):3–13.
7. Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K et al. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa – Living Guideline. *Z Gastroenterol*. 2020; 58(12):e241-e326.
8. Zhao M, Gönczi L, Lakatos PL, Burisch J. The burden of inflammatory bowel disease in Europe in 2020. *J Crohns Colitis*. 2021; 15(9):1573–87.
9. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012; 142:46–54.
10. Kaplan GG. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12(12):720–7.
11. Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, Shin JI. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules: Review. *Autoimmun Rev*. 2017; 16(4):416–26.
12. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010; 42(12):1118–25.
13. De Souza, Heitor S. P., Fiocchi C, Iliopoulos D. The IBD interactome: An integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 14(12):739–49.
14. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Immunity*. 2019; 50(4):992–1006.
15. Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: Potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(1):410–22.
16. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020; 30(6):492–506.

17. Neurath MF. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat Immunol.* 2019; 20(8):970–9.
18. Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol.* 2012; 22(17):R733–R740.
19. Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell.* 2010; 140(6):771–6.
20. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015; 107(11):686–96.
21. Rutgeerts P, Vermeire S, van Assche G. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: Impossible ideal or therapeutic target? *Gut.* 2007; 56(4):453–5.
22. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: The role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(5):394–400.
23. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15:39–49.
24. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T et al.; Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in Japan. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: A multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11(2):154–63.
25. Ahluwalia TS, Prins BP, Abdollahi M, Armstrong NJ, Aslibekyan S, Bain L et al. Genome-wide association study of circulating interleukin 6 levels identifies novel loci. *Hum Mol Genet.* 2021; 30(5):393–409.
26. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 2006; 314(5804):1461–3.
27. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007; 39(2):207–11.
28. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015; 47(9):979–86.
29. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011; 43(3):246–52.
30. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012; 491(7422):119–24.

31. Nambu R, Muise AM. Advanced Understanding of monogenic inflammatory bowel disease. *Front Pediatr*. 2021; 8:618918.
32. Sturm A, Atreya R, Bettenworth D, Bokemeyer B, Dignaß A, Eehalt R et al. Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Thieme. 2022; 60:332-418.
33. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, JR. Development of a crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976; 70:439–44.
34. Sostegni R, Daperno M, Scaglione N, Lavagna A, Rocca R, Pera A. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17(2):11–7.
35. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Löfberg R, Modigliani R et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002; 122(2):512–30.
36. Bradshaw, R. F. Harvey J M. A simple index of crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980; 315(8167):514.
37. Daperno M, D'Haens G, van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004; 60(4):505–12.
38. Moskovitz DN, Daperno M, Assche G. Defining and validating cut-offs for the simple endoscopic score for crohn's disease. *Gastroenterology*. 2007; 132:S1097.
39. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987; 317(26):1625–9.
40. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005; 353(23):2462–76.
41. Dhanda AD, Creed TJ, Greenwood R, Sands BE, Probert CS. Can endoscopy be avoided in the assessment of ulcerative colitis in clinical trials? *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18(11):2056–62.
42. Marchal-Bressenot A, Scherl A, Salleron J, Peyrin-Biroulet L. A practical guide to assess the Nancy histological index for UC. *Gut*. 2016; 65(11):1919–20.
43. The Italian Group of Inflammatory Bowel Disease. IG-IBD scores: calculators in gastroenterology. [document on the Internet]. Firenze (I); 2021 [cited 2021 Aug 27]. Available from: URL: <https://www.igibdscores.it/en/info.html>.
44. Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(40):11246–59.
45. Grumm. Parameter CRP. [document on the Internet]. Charité - Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie. Berlin (DE); 2011 [cited 2021 Aug 26]. Available

from: URL:
https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/m_cc05/ilp/referenzdb/28958.htm.

46. Novak G, Parker CE, Pai RK, MacDonald JK, Feagan BG, Sandborn WJ et al. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 7(7):CD012351.
47. Darr U, Khan N. Treat to Target in Inflammatory Bowel Disease: An updated review of literature. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2017; 15(1):116–25.
48. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W, Bryant RV et al. Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): Determining therapeutic Goals for treat-to-target. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110(9):1324–38.
49. Colombel J-F, Panaccione R, Bossuyt P, Lukas M, Baert F, Vaňásek T et al. Effect of tight control management on Crohn's disease (CALM): A multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2017; 390(10114):2779–89.
50. Zallot C, Peyrin-Biroulet L. Deep remission in inflammatory bowel disease: Looking beyond symptoms. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013; 15(3):315.
51. Villablanca EJ, Selin K, Hedin CRH. Mechanisms of mucosal healing: Treating inflammatory bowel disease without immunosuppression? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022; 19(8):493–507.
52. Wu J-F. Therapeutic drug monitoring of biologics for patients with inflammatory bowel diseases: How, when, and for whom? *Gut Liver*. 2022; 16(4):515–24.
53. Klenske E, Bojarski C, Waldner M, Rath T, Neurath MF, Atreya R. Targeting mucosal healing in Crohn's disease: What the clinician needs to know. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019; 12:1756284819856865.
54. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T et al. ECCO guidelines on therapeutics in crohn's disease: Medical treatment. *J Crohns Colitis*. 2020; 14(1):4–22.
55. Noor NM, Sousa P, Paul S, Roblin X. Early diagnosis, early stratification, and early intervention to deliver precision medicine in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2021; 28(8):1254–1264.
56. Ehrhardt RO. New insights into the immunopathology of chronic inflammatory bowel disease. *Semin Gastrointest Dis*. 1996; 7(3):144–50.
57. Beaugerie L, Rahier J-F, Kirchgesner J. Predicting, preventing, and managing treatment-related complications in patients with inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020; 18(6):1324–1335.e2.
58. Paramsothy S, Rosenstein AK, Mehandru S, Colombel J-F. The current state of the art for biological therapies and new small molecules in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2018; 11(6):1558–70.
59. Berg DR, Colombel J-F, Ungaro R. The role of early biologic therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019; 25(12):1896–905.

60. Sandborn WJ, Feagan BG, D'Haens G, Wolf DC, Jovanovic I, Hanauer SB et al. Ozanimod as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2021; 385(14):1280–91.
61. Narula N, Dhillon A, Zhang D, Sherlock ME, Tondeur M, Zachos M. Enteral nutritional therapy for induction of remission in crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;4(4):CD000542.
62. Jansen-Winkel B, Lyros O, Lachky A, Teich N, Gockel I. Technik der laparoskopischen Proktokolektomie. *Chirurg*. 2017; 88(9):777–84.
63. Borg-Bartolo SP, Boyapati RK, Satsangi J, Kalla R. Precision medicine in inflammatory bowel disease: concept, progress and challenges. *F1000Res. Faculty Rev*-54. 2020; 9:F1000.
64. Sudhakar P, Verstockt B, Cremer J, Verstockt S, Sabino J, Ferrante M et al. Understanding the molecular drivers of disease heterogeneity in crohn's disease using multi-omic data integration and network analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2021; 27(6):870–86.
65. Takac B, Mihaljević S, Stefanić M, Glavas-Obrovac L, Kibel A, Samardzija M. Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Coll Antropol*. 2014; 38(2):659–64.
66. Nikolaus S, Waetzig GH, Butzin S, Ziolkiewicz M, Al-Massad N, Thieme F et al. Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases. *Int J of Colorectal Dis*. 2018; 33(7):927–36.
67. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*. 2010; 30(1):80–9.
68. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012; 8(9):1237–47.
69. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov*. 2018; 17(6):395–412.
70. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015; 16(5):448–57.
71. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009; 15(2):103–13.
72. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(5):878–88.
73. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2017; 18(1):74–85.
74. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(10):763–76.

75. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y et al. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2011; 186(1):32–40.
76. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13(7):399–409.
77. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med*. 2021; 53(7):1116–23.
78. Rose-John S. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced therapeutic options in inflammation. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 102(4):591–8.
79. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003; 24(1):25–9.
80. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001; 14(6):705–14.
81. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000; 6:583–8.
82. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M et al. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol*. 2010; 184(3):1543–51.
83. Aden K, Breuer A, Rehman A, Geese H, Tran F, Sommer J et al. Classic IL-6R signalling is dispensable for intestinal epithelial proliferation and repair. *Oncogenesis*. 2016; 5(11):e270.
84. Le Mao, A (2020). Untersuchung des klassischen und des trans-Signalweges von Interleukin-6 in der intestinalen epithelialen Wundheilung. *Med. Diss., Kiel*.
85. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: Recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol*. 2015; 34:75–82.
86. Li Y, Haar C de, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ. New insights into the role of STAT3 in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18(6):1177–83.
87. Nguyen PM, Putoczki TL, Ernst M. STAT3-Activating Cytokines: A therapeutic opportunity for inflammatory bowel disease? *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(5):340–50.
88. Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003; 278(19):16777–81.

89. Mitsuyama K, Matsumoto S, Rose-John S, Suzuki A, Hara T, Tomiyasu N et al. STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut*. 2006; 55(9):1263–9.
90. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000; 6(5):583–8.
91. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004; 126(4):989-96; discussion 947.
92. Danese S, Vermeire S, Hellstern P, Panaccione R, Rogler G, Fraser G et al. Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in crohn's disease (ANDANTE I and II). *Gut*. 2019; 68(1):40–8.
93. Rose-John S. Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling. *Cytokine*. 2021; 144:155577.
94. Chen B, Zhang S, Wang B, Chen H, Li Y, Cao Q et al. 775b Olamkicept, an IL-6 trans-signaling inhibitor, is effective for induction of response and remission in a randomized, placebo-controlled trial in moderate to severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2021; 161(2):e28-e29.
95. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg R-P, Dorsch M et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*. 2011; 39(6):1407–13.
96. Sedgwick P. What is an open label trial? *BMJ*. 2014; 348:g3434.
97. Kleiveland CR. (2015): Peripheral blood mononuclear cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I et al. (editors) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015. Chapter 15. PMID: 29787062.
98. Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Akbarzadeh M, Lamertz L, Huber HJ et al. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem*. 2018; 293(18):6762–75.
99. Overview of ELISA: What is an ELISA. [document on the Internet]. Thermo Fisher Scientific, editor. Waltham (US); 2022 [cited 2022 Jan 4]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.
100. Krüger S, Leiterin des Labors im Institut für Pathologie UKSH, Kiel [Mündliches Zitat]; 2019, Jan 18.
101. Lang G. Immunhistochemie. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 269–304.
102. Graefe C, Eichhorn L, Wurst P, Kleiner J, Heine A, Panetas I et al. Optimized Ki-67 staining in murine cells: A tool to determine cell proliferation. *Mol Biol Rep*. 2019; 46(4):4631–43.

103. Safferling K, Sütterlin T, Grabe N. Wie Wunden heilen: Systembiologie klärt nach 40 Jahren den Mechanismus der Wundheilung auf. *Systembiologie.de*. 2015; 09:8–12.
104. Herwig MC, Holz FG, Loeffler KU. Distribution and presumed proliferation of macrophages in inflammatory diseases of the ocular adnexae. *Curr Eye Res*. 2015; 40(6):604–10.
105. Renz H, Gierten B. CD3. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 540.
106. Hauri-Hohl M, Trück J. Physiologie der B- und T-Lymphozyten. In: Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger J, Zepp F, Berner R, editors. *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. p. 975–85.
107. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017; 97(1):4–13.
108. Baum H. Makrophagen. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1566–7.
109. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018; 640:47–52.
110. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984; 87(6):1344–50.
111. Marcinkiewicz J, Walczewska M. Neutrophils as sentinel cells of the immune system: a role of the MPO-halide-system in innate and adaptive immunity. *Curr Med Chem*. 2020; 27(17):2840–51.
112. Leica Biosystems. Bond Polymer Refine Detection; Catalog No: DS9800. [document on the Internet]. Newcastle Upon Tyne (UK); 2019 [cited 2019 Sep 6]. Available from: URL: https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/ds9800.pdf.
113. Radović S, Vukobrat-Bijedić Z, Selak I, Babić M. Expression of p53, bcl-2, and Ki-67 proteins in the inflammatory regenerative and dysplastic epithelial lesions of flat colonic mucosa. *Bosn J Basic Med Sci*. 2006; 6(1):39–45.
114. Bleiberg H, Mainguet P, Galand P, Chretien J, Dupont-Mairesse N. Cell Renewal in the Human Rectum: In vitro autoradiographic study on active ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1970; 58(6):851–5.
115. Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res*. 2011; 343(1):5–12.
116. Speiseröhre und Magen-Darm-Kanal. In: Lüllmann-Rauch R, Paulsen F, editors. *Taschenlehrbuch Histologie*. Lüllmann-Rauch, Paulsen F, editors. 4.th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2012;p 386.

117. Santis M de, Steninger T. Monozentrische Studie. In: Lenk, Christian, Duttge G, Fangerau H, editors. Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen: Springer-Verlag; 2014. p. 613–6.
118. Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, Conrad C, Tran F, Höper H et al. Therapeutic Interleukin-6 trans-signaling inhibition by olamkicept (sgp130Fc) in patients with active inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2021; 160(7):2354-2366.e11.
119. Prof. Dr. Udo Kamps. Korrelation: Ausführliche Definition im Online-Lexikon [document of the Internet]. Bonn (DE); 2018 [cited 2022 Sep 22]. Available from: URL: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/korrelation-40362/version-263748>.
120. Sedgwick P. Phases of clinical trials. *BMJ*. 2011; 343:d6068.
121. Yuan J, Pang H, Tong T, Xi D, Guo W, Mesenbrink P. Seamless phase IIa/IIb and enhanced dose-finding adaptive design. *J Biopharm Stat*. 2016; 26(5):912–23.
122. Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Studienphasen. [document of the Internet]. Bonn (DE); 2022 [cited 2022 Sep 22]. Available from: URL: <https://www.dimdi.de/dynamic/de/glossar/glossareintrag/Studienphasen/>.
123. Statistische Kennwerte. In: Bortz J, Schuster C, editors. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler: Limitierte Sonderausgabe. 7th. ed. Heidelberg: Springer; 2010. p. 28.
124. Marafini I, Sedda S, Dinallo V, Monteleone G. Inflammatory cytokines: From discoveries to therapies in IBD. *Expert Opin Biol Ther*. 2019; 19(11):1207–17.
125. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2013; 369(8):711–21.
126. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Wang W, Niezychowski W. A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014; 12(9):1485-93.e2.
127. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S et al. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2012; 367(7):616–24.
128. Lawson MM, Thomas AG, Akobeng AK. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(3):CD005112.
129. Agrawal M, Spencer EA, Colombel J-F, Ungaro RC. Approach to the management of recently diagnosed inflammatory bowel disease patients: A user's guide for adult and pediatric gastroenterologists. *Gastroenterology*. 2021; 161(1):47–65.
130. Elemento O. The future of precision medicine: Towards a more predictive personalized medicine. *Emerg Top Life Sci*. 2020; 4(2):175–7.
131. Yoshida EM. The crohn's disease activity index, its derivatives and the inflammatory bowel disease questionnaire: a review of instruments to assess crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 1999; 13(1):65–73.

132. Gomes P, Du Boulay C, Smith CL, Holdstock G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1986; 27(1):92–5.
133. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010; 8(4):357–63.
134. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14(12):1660–6.
135. Rodrigues BL, Mazzaro MC, Nagasako CK, Ayrizono MdLS, Fagundes JJ, Leal RF. Assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases: Non-invasive biomarkers and endoscopic scores. *World J Gastrointest Endosc*. 2020; 12(12):504–20.
136. Kyle BD, Agbor TA, Sharif S, Chauhan U, Marshall J, Halder SLS et al. Fecal calprotectin, CRP and Leucocytes in IBD patients: comparison of biomarkers with biopsy results. *J Can Assoc Gastroenterol*. 2021; 4(2):84–90.
137. Solem CA, Loftus EV, JR, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11(8):707–12.
138. Ogata A, Kato Y, Higa S, Yoshizaki K. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review. *Mod Rheumatol*. 2019; 29(2):258–67.
139. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guilhot F et al. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*. 2011; 286(50):42959–70.
140. Gutenberg E. Leukozyten. In: Hoffbrand AV, Pettit JE, editors. *Grundlagen der Hämatologie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg; 1986. p. 105–29.
141. Giraldez MD, Carneros D, Garbers C, Rose-John S, Bustos M. New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021; 18(11):787–803.
142. Kaiser K, Prystaz K, Vikman A, Haffner-Luntzer M, Bergdolt S, Strauss G et al. Pharmacological inhibition of IL-6 trans-signaling improves compromised fracture healing after severe trauma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018; 391(5):523–36.
143. Reinisch W, Gasché C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M et al. Clinical relevance of serum interleukin-6 in crohn's disease: Single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94(8):2156–64.
144. Song J, Park DW, Moon S, Cho H-J, Park JH, Seok H et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: A prospective controlled study according to the sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis*. 2019; 19(1):968.

145. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummeler M, Vavricka SR, Bruegger LE et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105(1):162–9.
146. Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C, Bastien C, Cahn V, Cadiot G et al. Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut.* 2017; 66(1):43–9.
147. Willson TA, Jurickova I, Collins M, Denson LA. Deletion of intestinal epithelial cell STAT3 promotes T-lymphocyte STAT3 activation and chronic colitis following acute dextran sodium sulfate injury in mice. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19(3):512–25.
148. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 2009; 206(7):1465–72.
149. Prystaz K, Kaiser K, Kovtun A, Haffner-Luntzer M, Fischer V, Rapp AE et al. Distinct effects of IL-6 classic and trans-signaling in bone fracture healing. *Am J Pathol.* 2018; 188(2):474–90.
150. Jiang R, Wang H, Deng L, Hou J, Shi R, Yao M et al. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer.* 2013; 13(1):59.
151. Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A et al. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: An essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11(2):91–8.
152. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005; 28(3):187–96.
153. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol.* 2005; 175(6):3463.
154. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS et al. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest.* 2003; 112(4):598–607.
155. Shale M, Schiering C, Powrie F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 2013; 252(1):164–82.
156. Brostjan C, Oehler R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* 2020; 6:26.
157. Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(8):1016–23.
158. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 2008; 118(6):2269–80.
159. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(12):953–64.

160. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 31:1–15.
161. Hampson P, Hazeldine J, Lord JM. Neutrophil apoptosis and its induction as a potential treatment for chronic inflammatory disease. *Curr Opin Hematol.* 2013; 20(1):10–5.
162. Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM et al. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock.* 2000; 13(5):361–6.
163. Khanna R, Nelson SA, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Zou GY et al. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(8):CD010642.
164. Studiendokument: DRKS-ID der Studie: DRKS00010101. Available from: URL: https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00010101.

7 Anhang

Anhang 1: Krankheitsaktivitäts-Indizes für Morbus Crohn (A-C) und Colitis ulcerosa (D-E)

1 A) Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (33, 34, 43)

Parameter	Anzahl/Score	Gewichtung
P1. Anzahl flüssiger oder weicher Stühle pro Woche	Anzahl, maximal 2 Punkte	2
P2. Tage mit Bauchschmerzen pro Woche	0=keine, 1=mild, 2=moderat, 4=schwer	5
P3. Wohlbefinden des Patienten pro Woche	0=sehr gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich	7
P4. Komplikationen	0=keine, 1=Ja (pro Komplikation einen Punkt) <ul style="list-style-type: none"> Gelenkschmerzen /-entzündung Iritis/Uveitis Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Aphten Fissuren, Anale Abszesse oder Fisteln Andere Fisteln Fieber während der letzten Woche 	20
P5. Nutzung von Anti-Diarrhoe-Medikation	0=Nein, 1=Ja	30
P6. Abdominale Resistenz	0=keine, 1=zweifelhaft, 1=präsent	10
P7. Abweichung des Hämatokrits (m/w)	Differenz zur Norm in Prozentpunkten (max. 2)	6
P8. Abweichung des Körpergewichts vom Standardgewicht	Standardgewicht (kg) über Keys-Formel. % Abweichung des Gewichts vom Standardgewicht.	1

Kalkulationsformel:

$$\text{CDAI} = (P1 \times 2) + (P2 \times 5) + (P3 \times 7) + (P4 \times 20) + (P5 \times 30) + (P6 \times 10) + (P7 \times 6) + P8$$

Score	Bedeutung
≤150	Remission
151-219	Milde Aktivität
220-450	Moderate Aktivität
>450	Schwere oder sehr schwere Aktivität

1 B) Harvey Bradshaw Index (HBI) (35, 36, 43)

Parameter	Anzahl/Score
P1. Wohlbefinden am Vortag	0=sehr gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich
P2. Bauchschmerz am Vortag	0=keine, 1=mild, 2=moderat, 3=schwer
P3. Anzahl von flüssigen oder weichen Stühlen am Vortag	Anzahl von 1-25
P4. Abdominale Resistenz	0=keine, 1=zweifelhaft, 2=sicher, 3=sicher und schmerzhaft
P5. Komplikationen	0=Nein, 1=Ja (pro Komplikation 1 Punkt) Arthralgie, Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Analfissur, neue Fistel, Abszess
<u>Kalkulationsformel:</u> Summe aller Scores der 5 Parameter	
Score	Bedeutung
<5	Remission
5 bis 7	Milde Aktivität
8 bis 16	Moderate Aktivität
>16	Schwere Aktivität

1 C) Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) (37, 43, 163)

Parameter	Ileum	Colon ascendens	Colon transversum	Colon descendens	Rectum	Total
Ulzerationen 0=keine 1=aphtös 2=groß (0,5-2 cm) 3=sehr groß (>2cm)	____ +	____ +	____ +	____ +	____ =	____ +
Entzündlich-betroffene Oberfläche 0=0%, 1= <50%, 2=50-75%, 3= >75%	____ +	____ +	____ +	____ +	____ =	____ +
Ausdehnung Ulzerationen 0=0%, 1=<10%, 2=10-30%	____ +	____ +	____ +	____ +	____ =	____ +
Stenosen 0=keine 1=eine, passierbar 2=multiple, passierbar 3=nicht passierbar	____ +	____ +	____ +	____ +	____ =	____ +

= SES-CD

Score	Bedeutung
0-2	Remission (wenn kein Subscore 2 Punkte hat)
3 bis 6	Milde Aktivität
7 bis 15	Moderate Aktivität
>15	Schwere Aktivität

1 D) Mayo-Score (39–41, 43)

Parameter	Klinische Bewertung
1. Stuhlfrequenz pro Tag	0=normale Stuhlfrequenz 1= 1-2 mehr als normal 2= 3-4 mehr als normal 3= ≥ 5 als normal
2. Rektale Blutungen	0=keine 1=Blutstreifen bei weniger als 50% der Stühle 2=meistens deutliche Blutbeimengungen 3=auch Blut ohne Stuhl
3. Endoskopischer Befund	0=normaler Befund oder inaktive Erkrankung 1=milde Colitis (Erythem, leicht spröde Schleimhaut) 2=moderate Colitis (deutliches Erythem, Erosionen, Gefäßmuster verschwunden) 3=schwere Colitis (Ulzerationen, spontane Blutungen)
4. Globale Beurteilung des Arztes	0=normal 1=milde Erkrankung 2=moderate Erkrankung 3=schwere Erkrankung

Score	Bedeutung
0 bis 2	Remission (wenn kein Subscore 2 Punkte hat)
3 bis 5	Milde Aktivität
6 bis 10	Moderate Aktivität
>10	Schwere Aktivität

1 E) Nancy-Index (42, 43)

Histologische Kriterien:	
1. Mukosale Ulzerationen	Grad 4 = schwer aktive Erkrankung
2. Neutrophile Invasion	
a. Grad 3	Moderat bis schwer: leicht erkennbare neutrophile Infiltrate in Lamina propria und Epithel
b. Grad 2	wenig oder schwer erkennbares neutrophiles Infiltrat
c.	Abwesenheit von Neutrophilen Infiltration
3. Chronisch inflammatorisches Bild	(Lymphozyten, Plasmazyten, Eosinophile in der Lamina propria)
a. Grad 1	moderat bis schwer: erhöhte Anzahl von chronisch inflammatorischen Zellen, welche leicht erkennbar sind
b.	Keine oder wenige chronisch entzündliche Zellen

Anhang 2: Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme

anhand des Studiendokuments des Deutschen Register Klinischer Studien: DRKS-ID der Studie: DRKS00010101 (164)

Einschlusskriterien:

- Geschlecht: Beide, männlich und weiblich
- Mindestalter: 18 Jahre
- Höchstalter: kein Höchstalter
- Der Patient ist einwilligungsfähig und freiwillig bereit an der Studie teilzunehmen und die Einwilligungserklärung zu unterzeichnen.
- 18 Jahre oder älter
- Negativer QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test bis zu 3 Monate vor Studieneinschluss
- CED Diagnose >3 Monate vor Visite 2
- Aktive CED bestätigt durch CRP ≥ 5 mg/L und/oder Calprotectin 250 mg/kg
- Vorherige Behandlung für CED mit konventionellen, nicht-biologischen Medikamenten für mindestens 3 Monate, die bis zu 14 Tagen vor Visite 2 nicht verändert wurde (Dosisänderung).
- Koloskopie mit Serien-Biopsie ohne Anzeichen eines Malignoms während des Screenings

Ausschlusskriterien:

- Fulminanter Krankheitsverlauf mit absehbarer Hospitalisierung Unterbrechung der Einnahme von AZA, 6-MP oder MTX innerhalb von 28 Tagen vor Visite 2
- Bedarf parenteraler Therapie (Ausnahme: Eisen Infusionen)
- Behandlung mit mehr als zwei verschiedenen Biologika oder einem Biologikum mit Ausnahme von anti-TNF Molekülen oder Vedolizumab
- Behandlung mit einem Biologikum innerhalb von 30 Tagen oder 5 Halbwertszeiten vor Visite 2 (abhängig davon, welcher Zeitraum länger ist)
- Behandlung mit Cyclosporin, Tacrolimus, oder Mycophenolat mofetil innerhalb von 30 Tagen vor Visite 2
- Behandlung mit i.v. Kortikosteroiden innerhalb von 14 Tagen vor Screening oder während der Screening Periode
- Mehr als 20 mg (Prednisolon Äquivalent) oraler Kortikosteroide innerhalb der letzten 28 Tage oder Dosisschwankungen innerhalb von 14 Tagen vor Visite 2
- Infektionen (einschließlich Divertikulitis), die mit i.v. Antibiotika, i.v. antiviralen Medikamenten oder i.v. Antimykotika innerhalb von 60 Tagen vor Visite 2 oder mit oralen Antibiotika, oralen antiviralen Medikamenten oder oralen Antimykotika innerhalb von 14 Tagen vor Visite 2 behandelt wurden
- Die Erkrankung beschränkt sich auf das Rektum und erstreckt sich < 15 cm weiter als der Analring
- Subtotale Kolektomie mit Ileorektostomie oder Kolektomie mit ileoanaler Pouch, Koch Pouch oder Ileostomie bei CU in der medizinischen Vorgeschichte oder geplanter Darmchirurgie
- Moderate bis schwerwiegende Anämie (HB <9g/dL)
- Klinisch signifikanter Drogen- oder Alkoholmissbrauch innerhalb des letzten Jahres, bewertet durch den Prüfer
- Behandlung mit einem weiteren Prüfpräparat (IMP) innerhalb von 30 Tagen oder 5 Halbwertszeiten vor Visite 2 (abhängig davon, welcher Zeitraum länger ist)
- Frauen in gebärfähigem Alter mit positiven Schwangerschaftstest
- Stillende oder laktierende Frauen
- Bekannte Empfindlichkeit auf einen oder mehrere Komponenten, die in FE 999301 enthalten sind

Anhang 3: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Primäre monoklonale Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer	Vorbehandlung	Inkubationszeit
CD3 (monoklonal)	Kaninchen	1 zu 150	Thermo Scientific	RM-9107-S, S1, S0	10 mM pH 6 Citratpuffer, 10-20 min	30 min bei RT
CD68 Novacastra Liquid (monoklonal)	Maus	1 zu 100	Leica Biosystems	NCL-L-CD68	Novacastra Epitope Retrieval Solution pH9, 10-20 min	25 min bei RT
Ki-67 (monoklonal)	Kaninchen	1:100 bis 1:200	Thermo Scientific	RM-9106-S, S1, S0	10 mM pH6 Citratpuffer, 10-20 min	30 min bei RT
MPO (polyklonal)	Kaninchen	1:300 bis 1:600	Dako Cytomation	A 0398	10 mM pH6 Citratpuffer, 20 min	30 min bei RT
phosphoSTAT3; (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	1:200 mit SignalStain® Antibody Diluent #8112	Cell Signaling Technology	#9145	EDTA	30 min bei RT

Sekundäre Antikörper

Post-Primar-IgG-Linker-Reagenz	lokalisiert primäre Maus-AK	nicht nötig, enthalten im BOND-Polymer Refine Red Detection (Bestellnr. DS9390)	Leica Biosystems	BOND-Polymer Refine Red Detection DS9390	nicht nötig
Poly-HRP-IgG-Reagenz	lokalisiert primäre Kaninchen-AK				

Anhang 4: Ergebnisse

4 A) pSTAT3/STAT3 - Assay

		0h	4h	4w	14w
nativ pSTAT3/STAT3	Remission	0,407	0,5124	0,458	0,41
	Nicht-Remission	0,41	0,372	0,464	0,527
hIL-6 pSTAT3/STAT3	Remission	3,253	0,455	2,532	1,368
	Nicht-Remission	2,378	0,363	1,37	1,269

4 B) Klinische, biochemische, endoskopische, histologische Ergebnisse

	Normwert		0h	2w	% 0h-2w	4w	% 0h-4w	6w	8w	10w	12w	14w	% 0h-14w
CDAI	≤ 150	Rem	330	81	-75,45	108		66	69	57	20	21	-93,63
		NRem	286,5	253,5	-11,51	299,5		274	325	297	299,5	303	5,76
		Σ Rem	1	1		1		1	1	1	1	1	
		Σ NRem	6	6		6		5	5	5	4	3	
HBI	< 5	Rem	9	1	-88,89	0		0	0	1	3	0	-100
		NRem	10	5,5	-45	7,5		8	8	9	6	6,5	-35
		Σ Rem	1	1		1		1	1	1	1	1	
		Σ NRem	6	6		6		6	5	4	2	2	
Mayo	≤ 2	Rem	7,5	7	-6,67			3		3		1	-86,67
		NRem	11	9	-18,18			6		4,5		4	-63,63
		Σ Rem	2	2		0		2	0	2	0	2	
		Σ NRem	7	7		0		6	0	4	0	3	
CRP	< 5 mg/l	Rem	16,3	2,02	-87,61	1,09		1,71	2,5	1,63	2,12	1,72	-89,45
		NRem	29,6	10,8	-63,51	15,2		15,85	13	14	11,4	19,9	-163,51
		Σ Rem	3	3		3		3	3	3	3	3	
		Σ NRem	13	13		12		11	10	9	7	7	
Calprotectin	< 50 mg/g	Rem	903	91	-89,92	15		21	299,5	184,85	60,1	15	-98,34
		NRem	3000	1225	-59,17	2054		2286	1359,5	2122	2070	725	-75,83
		Σ Rem	3	3		3		3	2	2	2	3	
		Σ NRem	12	11		11		9	8	7	7	6	
Leukozyten	4 - 10 /nl	Rem	10,43	7,41	-28,95	6,64		8,6	7	6,83	7,24	6,73	-35,47
		NRem	9,62	9,6	-0,02	8,96		9,76	9,05	9,12	7,95	6,55	-31,91
		Σ Rem	3	3		3		3	3	3	3	3	
		Σ NRem	13	13		12		11	10	9	7	7	
IL-6	ca. 1 pg/ml bis 1000 bei Sepsis	Rem	20,1			4,15	-79,35					1,8	-91,04
		NRem	14,8	14,85		15,5	4,72					15	1,35
		Σ Rem	3	1		2		0	0	0	0	3	
		Σ NRem	13	4		11		0	0	0	0	7	
SES-CD	≤ 2	Rem	24									0	-100
		NRem	19									15	-78,95
		Σ Rem	1	0		0		0	0	0	0	1	
		Σ NRem	6	0		0		0	0	0	0	4	
Nancy	0	Rem	2,5	2	-20			1		1		1	-60
		NRem	4	4	0			3,5		3,5		4	0
		Σ Rem	2	2		0		2	0	2	0	2	
		Σ NRem	7	7		0		6	0	4	0	3	

4 C) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test klinische, biochemische, histologische Parameter

Parameter	W	p
Pharmkokinetik	-2	0,9375
pSTAT3/STAT3 nativ	2	0,875
pSTAT3/STAT3 stimuliert	10	0,125
CDAI	-34	0,0156
HBI	-36	0,0078
Mayo-Score	-15	0,0625
CRP	-36	0,0078
Calprotectin	-36	0,0078
Leukozyten	-30	0,0391
IL-6	-4	0,5
Nancy-Index	-15	0,0625

4 D) Medianwerte aus der immunhistochemischen Auszählung

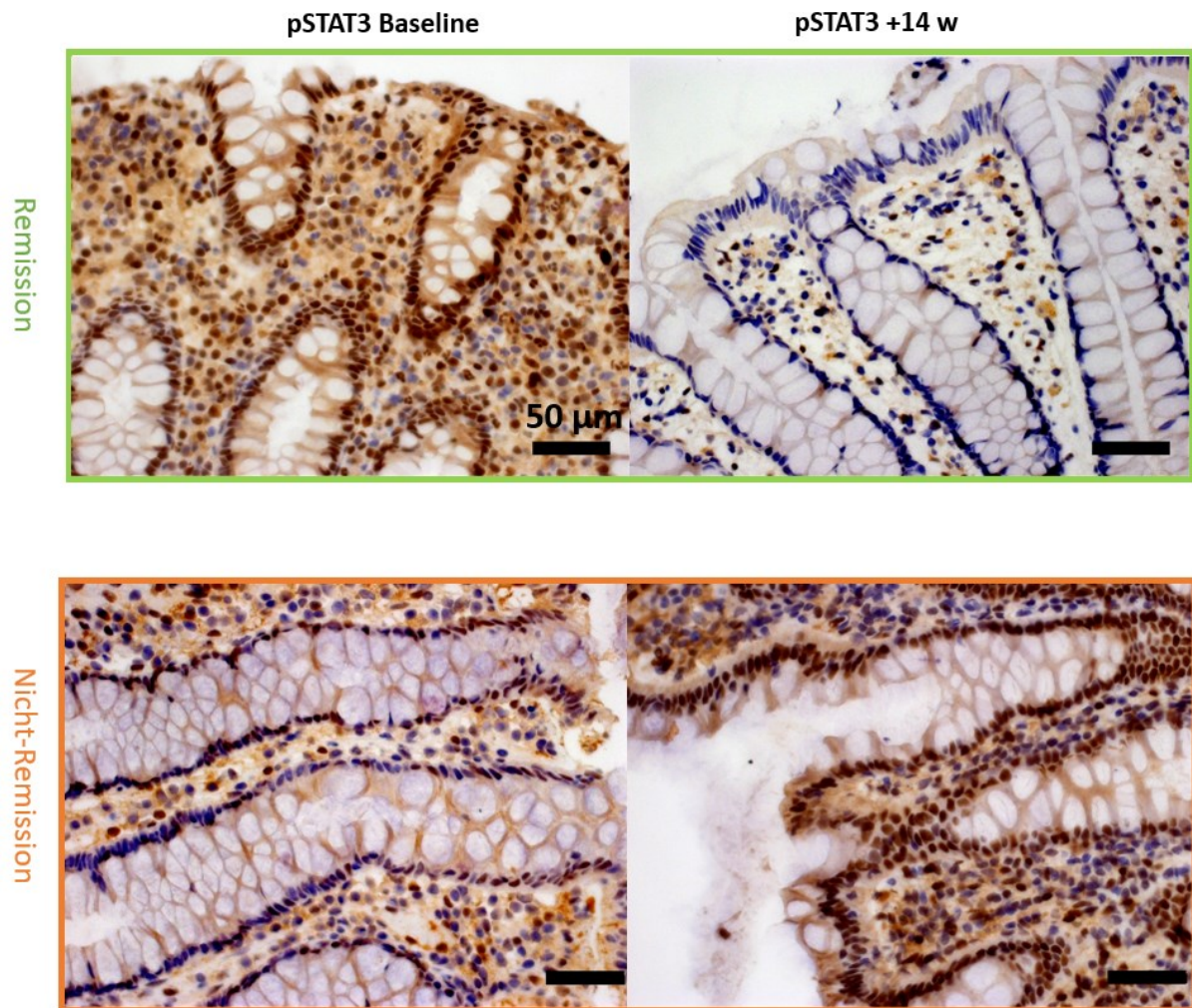
		Screen	V1	0h	4h	24h	3d	2w	6w	10w	14w
pST Epi	Rem	0,485	0,615	0,755	0,715	0,84	0,88	0,74	0,19	0,02	0,07
	NRem	0,73	0,855	0,75	0,83	0,71	0,87	0,8	0,77	0,645	0,245
pST LP	Rem	0,285	0,35	0,465	0,22	0,333	0,23	0,29	0,31	0,18	0,245
	NRem	0,46	0,485	0,46	0,295	0,45	0,42	0,44	0,425	0,305	0,345
Ki Epi	Rem	0,352	0,205	0,438	0,28	0,16	0,41	0,29	0,2	0,24	0,19
	NRem	0,25	0,24	0,305	0,37	0,33	0,335	0,315	0,26	0,205	0,265
Ki LP	Rem	0,14	0,1	0,12	0,06	0,1	0,11	0,04	0,01	0,02	0,01
	NRem	0,08	0,093	0,06	0,1	0,06	0,1	0,07	0,085	0,08	0,06
CD3	Rem	64,25	28,5	61,5	51,5	50	54	52	30	37	34
	NRem	53	50	33	37,5	115	39,5	49	44,5	33	41,5
CD68	Rem	63	50,5	50	133	44	122	62	128	86	113
	NRem	137	120,5	79,5	40	34	87,75	106	118	138,5	114,5
MPO	Rem	28,25	50	68,5	38,5	36	28	20	32,75	15	15
	NRem	25	32,5	34,5	40	40	45	48	38	41,5	32,5
Σ	$\Sigma(\text{Rem})$	2	2	2	2	3	1	3	2 oder 3	3	3
	$\Sigma(\text{NRem})$	11	10	6	8	11	6	6	12	6	6

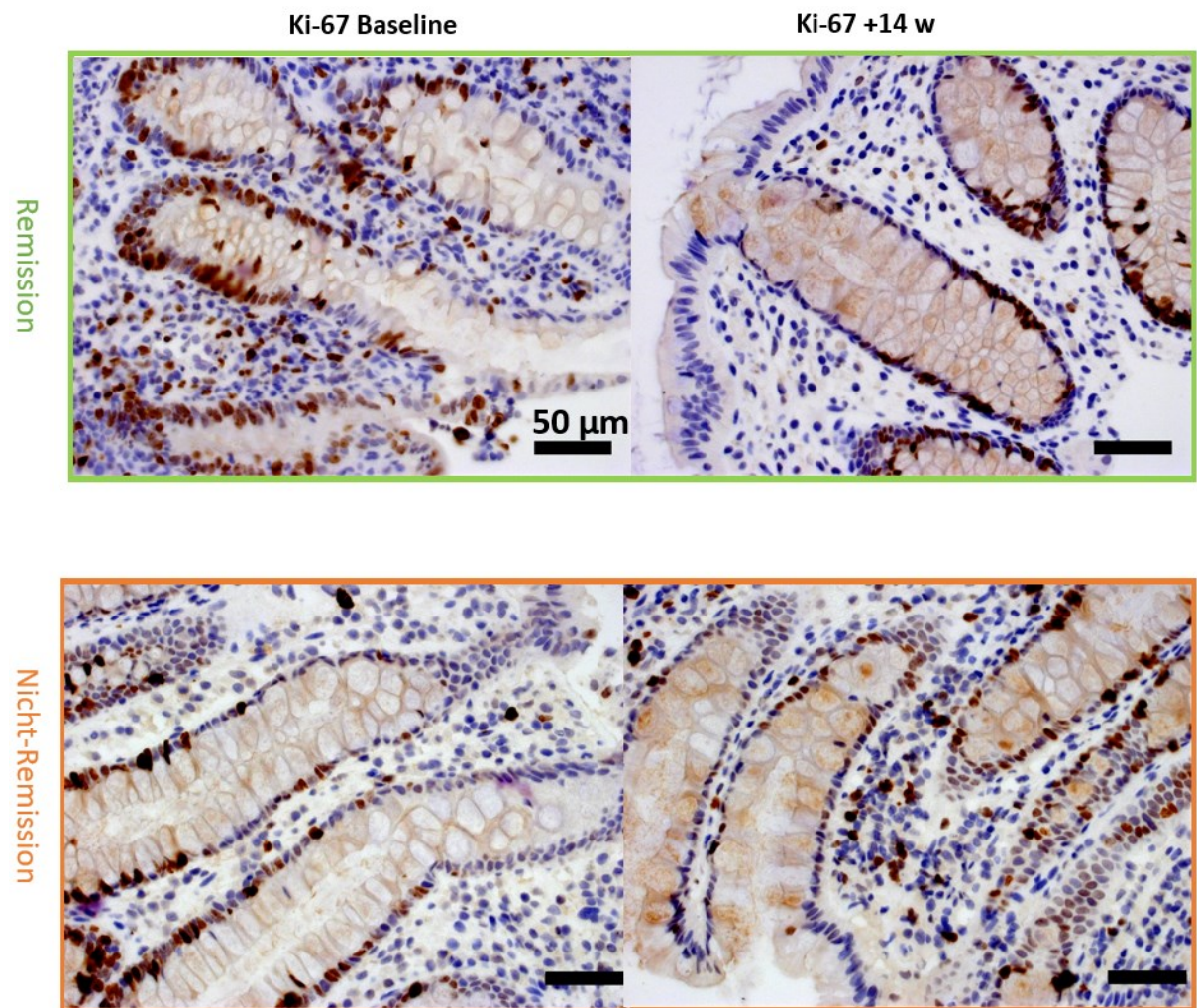
4 E) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests der Immunhistochemie (Baseline I-III)

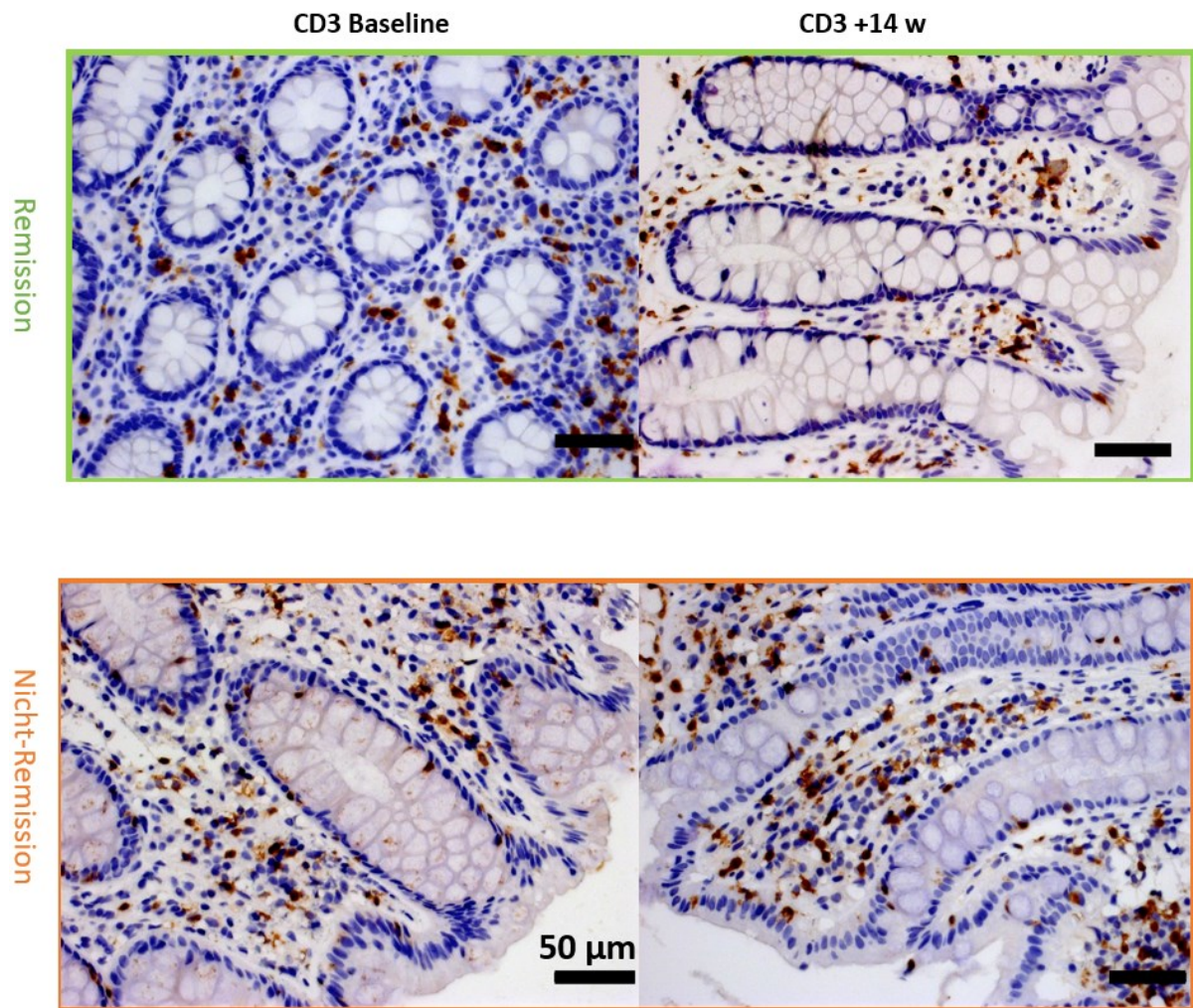
(I): V2.1 als alleinige Baseline; Σ 2 Rem, 6 NRem		
	W	p
pSTAT3 Epi	-16	0,3125
pSTAT3 LP	-36	0,0078
Ki-67 Epi	-8	0,6406
Ki-67 LP	-4	0,8438
CD3	12	0,4609
CD68	-26	0,0781
MPO	-20	0,1953

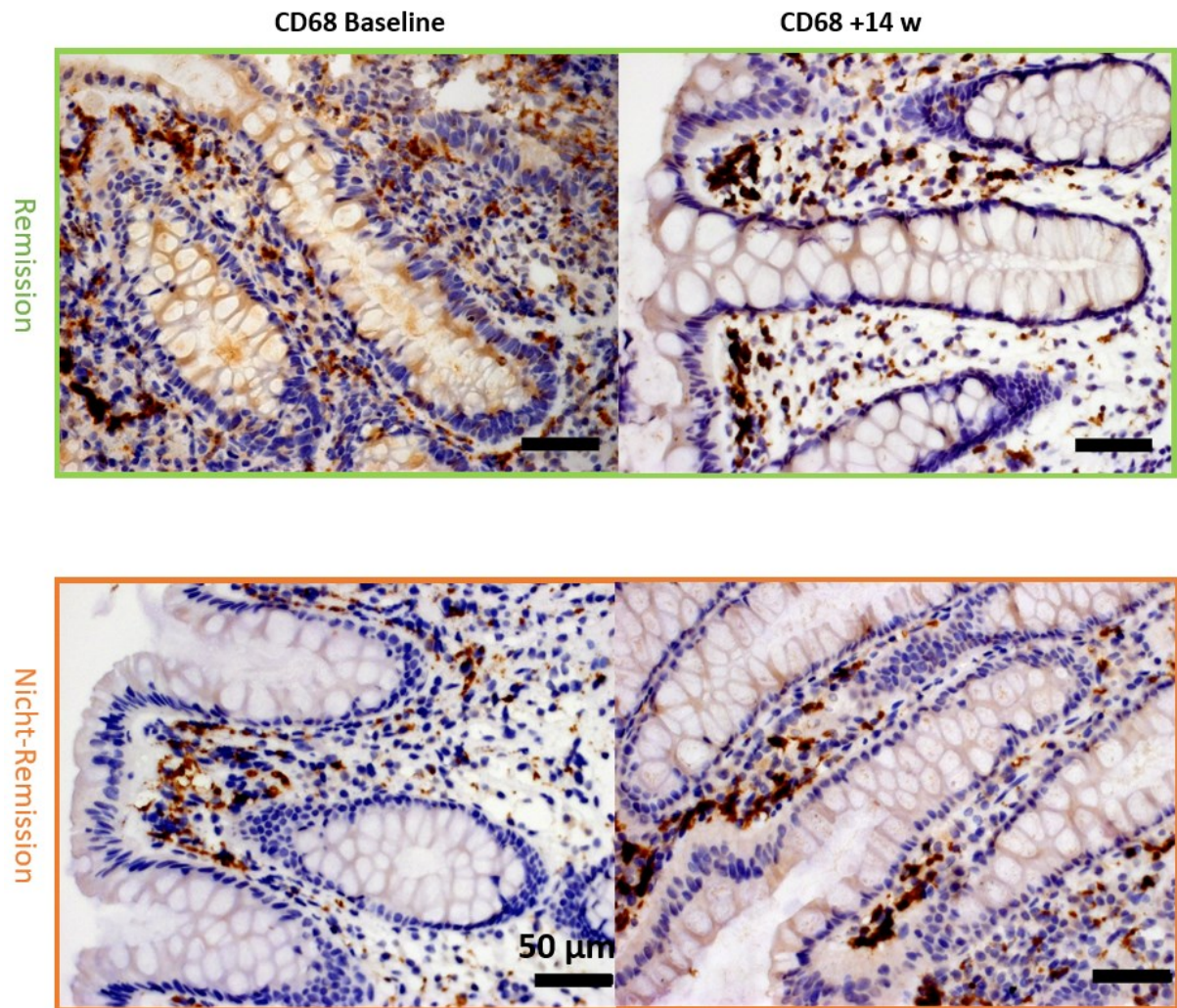
(II): mit V2.1 & V1 als Baseline; Σ 2 Rem, 10 NRem			(III): mit V2.1 & V1 & Screening als Baseline Σ 2 Rem, 12 NRem		
	W	p		W	p
pSTAT3 Epi	-20	0,1953	pSTAT3 Epi	-20	0,1953
pSTAT3 LP	-36	0,0078	pSTAT3 LP	-36	0,0078
Ki-67 Epi	-8	0,6406	Ki-67 Epi	-10	0,5469
Ki-67 LP	-8	0,6406	Ki-67 LP	-8	0,6406
CD3	12	0,4609	CD3	12	0,4609
CD68	-26	0,0781	CD68	-26	0,0781
MPO	-22	0,1484	MPO	-20	0,1953

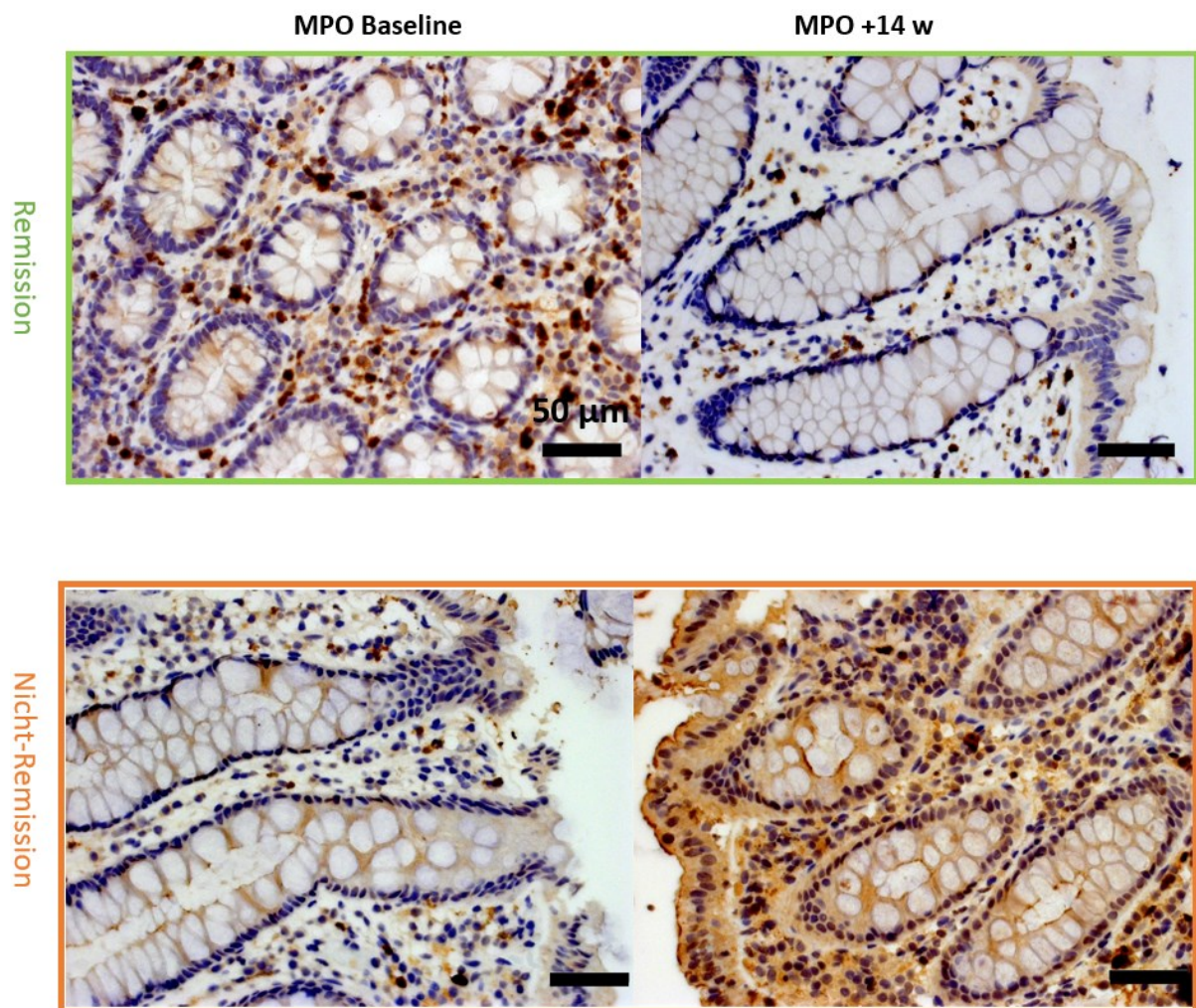
Anhang 5: Immunhistochemische Bilder











7.1 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei den lieben Menschen bedanken, die mich auf dem Weg des Projektes Doktorarbeit begleitet, verstanden und unterstützt haben.

Das erste Dankeschön geht an Prof. Dr. med. S. Schreiber, Prof. Dr. med. P. Rosenstiel und Prof. Dr. rer. nat. A. Franke für die Ermöglichung der Dissertation am IKMB.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Konrad Aden für die Ermöglichung der Dissertation und für seine Betreuung. Sein strukturiertes Vorgehen, seine Erklärungen und Ratschläge und sein Gesamtüberblick haben mir viel geholfen. Ich musste mich keiner Frage scheuen, was sehr wertvoll ist.

Dr. med. Florian Tran möchte ich für die Einarbeitung im Institut und die tiefere Einführung in die Thematik danken. Ein großes Danke muss für die 24/7-Erreichbarkeit, die unmittelbare Antwort- und große Hilfsbereitschaft ausgesprochen werden. Das war phänomenal!

Dr. Joana Pimenta Bernades möchte ich für die mentale und tatkräftige Unterstützung bei den statistischen Auswertungen danken.

Den Korrekturlesenden, insbesondere Johanna und Reimer, möchte ich einen besonderen Dank aussprechen und Anni für technischen Support.

Meiner Familie möchte ich für ihr tiefes Vertrauen und ihren Glauben an mich danken. Ihr habt nicht eine Sekunde an meinen Fähigkeiten gezweifelt, euch mein Zetern angehört und stets aufbauende Worte gefunden.

Abschließend möchte ich Magnus danken. Ich glaube, dafür gibt es keine Worte; du weißt genau, wovon ich spreche und ich danke dir, dass du dieses Projekt geduldig und aufbauend mit mir getragen hast.

7.2 Publikationen und wissenschaftliche Vorträge

7.2.1 Publikationen

Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, Conrad C, Tran F, Höper H, Volk V, Mishra N, Blase JJ, Nikolaus S, Bethge J, Kühbacher T, Röcken C, Chen M, Cottingham I, Petri N, Rasmussen BB, Lokau J, Lenk L, Garbers C, Feuerhake F, Rose-John S, Waetzig GH, Rosenstiel P. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2021 Jun;160(7):2354-2366.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2021.02.062. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667488

7.2.2 Wissenschaftliche Vorträge

Geplanter Posterbeitrag von:

Hanna Höper; Claudio Conrad; Joana Pimenta Bernardes; Florian Tran; Ateequr Rehman; Felix Sommer; Susanna Nikolaus; Stefan Rose-John; Christoph Röcken; Georg H. Waetzig; Philip Rosenstiel; Konrad Aden; Stefan Schreiber. Mukosale STAT3 Phosphorylierung ist ein früher und spezifischer Marker der Therapieantwort auf IL-6 Transsignalling Inhibition bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Internist 2020 April; 61 (Suppl 1): S17. DOI 10.1007/s00108-020-0787-z. Epub Apr 9. 2020

auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., geplant für 25. – 28. April 2021, Wiesbaden, Deutschland.

Aufgrund der Covid-19 Pandemie nicht stattgefunden. DGVS Reisestipendium.

7.3 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Hanna Höper, an Eides statt, dass

- meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorliegt.
- Veröffentlichungen nach den Richtlinien über Benotung von Dissertationen erfolgt sind.
- ich bis zum heutigen Tage 16 Semester an der Christian-Albrechts-Universität studiert habe.
- die Leiter des Instituts für klinische Molekularbiologie Kiel einverstanden sind, dass die Dissertation an deren Einrichtung geschrieben wurde.
- für die Nutzung von Arbeitsmöglichkeiten der wissenschaftlichen Einrichtung durch mich das Einverständnis der Leitung der Einrichtung vorliegt.

Ich erkläre, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Sundhagen, den 10.03.2022

Hanna Höper