



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Klinikum rechts der Isar

Entwicklung eines Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensors zum Nachweis von Faktor-VIII-Hemmkörpern in Plasma von angeborenen und erworbenen Hämophilie-A-Patienten

Carmen Kocot

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grads eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Michael Schuster
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. apl. Prof. Dr. Peter B. Lippa

Die Dissertation wurde am 28.08.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Chemie am 23.09.2015 angenommen.

DANKSAGUNG

Eine Dissertation ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deswegen möchte ich mich jetzt bei allen bedanken, die mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. B. Luppä für das Überlassen des sehr interessanten Themas, die finanzielle Unterstützung und das Ermöglichen der vielen Konferenz- und Schulungsbesuche während meiner Arbeit. Zudem danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen sowie für das entgegengebrachte Vertrauen. Ich bin froh und zu tiefst dankbar, von einem solch außerordentlich guten Doktorvater betreut worden zu sein.

Herrn Prof. Dr. R. Nießner möchte ich für die Übernahme der Betreuung an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München danken sowie für die Möglichkeit, meine Ergebnisse im Rahmen seiner Institutsseminare zu präsentieren und mit einem Fachpublikum kritisch zu diskutieren.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. M. Spannagl für die Bereitstellung der Patientenproben und seine grundlegenden Anregungen bezüglich des Biosensors. Auch Herrn Dr. W. Miesbach und Frau Dr. K. Kurnik möchte ich für ihr Vertrauen und die zusätzlich zur Verfügung gestellten Patientenproben danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Kollegin und Freundin Aline Schindler aussprechen, die mir jederzeit fachlich und persönlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Die vielen fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen im Labor sowie beim Schreiben haben entscheidend zum Gelingen dieses Werks beigetragen. Ich wünsche ihr für die Zukunft nur das Beste.

Herrn Dr. G. Mößmer gilt ebenfalls großer Dank für die spannende Zusammenarbeit an dem *Case Report* und die lehrreichen Gespräche über Hämostaseologie.

Meinem Kollegen Michael Schmalenberg möchte ich für die Hilfe bei der Literaturrecherche danken, Dr. Alice Schlichtiger für wegweisende Ratschläge zu Beginn der Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich bei vielen Kollegen für die freundliche Atmosphäre bedanken, besonders bei Dr. Heike Bittersohl, Dr. Alexander Le Blanc, Dr. Markus Thaler und Ludwig Bulst.

Nicht zu vergessen sind meine Studenten Mareike Mentzel und Torben Gehring, die viele Versuche eigenständig durchgeführt und verbessert sowie mich mit ihrer Wissbegierde immer wieder gefordert und dabei stets motiviert haben.

Viele wichtige Ideen entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. A. Calatzis, Herrn Dr. E. Gedig, Frau Dr. A. Drescher und Herrn Dr. F. Sonntag, die ich im Laufe der Zeit besser kennenlernen und ihre fachliche Kompetenz schätzen durfte.

Besonders danken möchte ich meinem guten Freund Dr. Torsten Sehl für das hervorragende Korrekturlesen der Arbeit.

Der wichtigste Dank jedoch geht an meine liebe Familie, die immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg unterstützt hat. Besonders dankbar bin ich meinem Freund Markus Mayer, der durch sein stets kreatives und konstruktives Denken zusammen mit mir Problemlösungen gefunden und mich so unglaublich inspiriert, gleichzeitig gestützt und nach vorne gebracht hat – tausend Mal Danke dafür!

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht

C. Kocot, A. Schindler, A. Le Blanc, M. Schmalenberg, W. Miesbach, M. Spannagl, P.B. Luppá. Biomimetic biosensor to distinguish between inhibitory and non-inhibitory Factor VIII antibodies. *Anal Bioanal Chem.* 2015 (Epub ahead of print)

Schindler AR, Bleher O, Thaler MA, Kocot CJ, Steigerwald U, Proll G, Gauglitz G, Luppá PB. Diagnostic performance study of an antigen microarray for the detection of antiphospholipid antibodies in human serum. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53(5): 801-808.

Für meine Liebsten

als Dank für die wunderbare Unterstützung und das grenzenlose Vertrauen

Maria und Erik Kocot, Markus Mayer

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Motivation	1
2 Theorie	4
2.1 Geschichte, Gegenwart und Zukunft der Hämophilie-Therapie	4
2.1.1 Geschichte der Hämophilie	4
2.1.2 Etablierung der Hämophilie-Behandlung	6
2.1.3 Die Zukunft der Hämophilie-Behandlung	6
2.2 Das zellbasierte Gerinnungssystem der primären und sekundären Hämostase	9
2.2.1 Der Faktor VIII	14
2.2.1.1 FVIII-Synthese	16
2.2.1.2 Physiologische Anbindung an den von-Willebrand-Faktor im Blut	17
2.2.2 Der von-Willebrand-Faktor	18
2.2.2.1 vWF-Domänenstruktur	18
2.2.2.2 Klassifikation des von-Willebrand-Syndroms	19
2.3 Das Immunsystem und die Entwicklung von FVIII-Antikörpern	20
2.4 Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	23
2.4.1 Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung von Proteinen auf Gold	29
2.4.2 Immobilisierungsschemie zur Kopplung von Proteinen an einen SPR-Chip	30
2.5 Bestimmung kinetischer Konstanten mit Hilfe des Biacore®-Geräts	31
3 Material und Methoden	33
3.1 Material	33
3.1.1 Chemikalien	33
3.1.2 Proteine	34
3.1.3 Blutseren und Blutplasmen	35
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	38
3.1.5 Geräte	39
3.1.6 Software	39

3.2 Methoden	40
3.2.1 Biochemische Methoden	40
3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	40
3.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.2.1.3 Färben und Entfärben von SDS Gelen	41
3.2.1.4 Western Blot	42
3.2.1.5 Ponceau S Färbung	43
3.2.1.6 Antikörperisolierung aus humanem Serum oder Plasma	44
3.2.1.7 Spezifische FVIII-Antikörperisolierung aus Antikörper-Pool	45
3.2.2 Bindungsstudien und Biosensorik	46
3.2.2.1 <i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i> (ELISA) zur anti-FVIII-Detektion in Plasma und Serum	46
3.2.2.2 Messungen am Biacore® X	48
4 Ergebnisse und Diskussion	55
4.1 Pilot-Messungen: Entwicklung eines Biosensor-Bestimmungsformats zur Detektion und kinetischen Charakterisierung von FVIII-Inhibitoren	57
4.1.1 Etablierung der FVIII-Oberfläche für die Detektion kommerzieller Faktor VIII-Antikörper	57
4.1.2 Optimierung der Regenerations- und Laufmittelbedingungen	59
4.1.3 Detektion humaner anti-FVIII-Antikörper in Serum auf der SAM-Oberfläche	61
4.1.4 Western Blot als alternativer Nachweis von von anti-FVIII-Ak und anti-vWF-Ak aus Serum	63
4.1.5 Evaluierung eines geeigneten FVIII-Präparates mittels selbst entwickeltem ELISA	64
4.1.6 Etablierung der FVIII-Immobilisierung auf der HC (<i>Hydrogel Coating</i>)-Polycarboxylat-Oberfläche	67
4.1.7 SPR-Messungen von Patientenplasmen auf der Polycarboxylat-Oberfläche	68
4.1.8 Immobilisierung des <i>full-length</i> (FL) FVIII (Kogenate®) auf der Polycarboxylat-Oberfläche	69

4.1.9 Stabilitätsoptimierung mittels Abspaltlösung und Laufpuffer des immobilisierten FL-Faktor VIII	71
4.1.10 Erster <i>Screen</i> mit 13 Hemmkörperplasmen unter optimierten Assay-Bedingungen	73
4.2 Untersuchung der im Plasma vorliegenden Bindungspartner von FVIII - Überprüfung auf nichtinhibitorische Antikörper	74
4.2.1 Überprüfung der Tenasekomplex-Faktoren mittels Mangelplasmen auf dem FVIII-Chip	75
4.2.2 Antikörperisolierung aus humanen Plasmen mittels Protein-A/G-Säulen	78
4.2.3 Inkubation der Protein-A/G-Säulen in Ethanolamin zur Minimierung unspezifischer Anbindungen	78
4.3 Validierung der Protein-A/G-Säulen für die Antikörperisolierung	80
4.3.1 Entwicklung eines anti-FVIII-Biosensors für die Validierung von kinetischen Parametern der Patientenantikörper	83
4.3.2 Kinetische Bestimmungen für zwei Patientenplasmen	85
4.4 Klinische Validierung des SPR-Biosensors	89
4.4.1 Antikörperbestimmung mittels GTI-ELISA	89
4.4.2 FVIII-Antikörperdetektion mit vier verschiedenen FVIII-Präparaten auf einer Polycarboxylat-Oberfläche	90
4.4.3 Reproduzierbarkeit der Messungen auf dem FL-FVIII- und BDD-FVIII-Sensorchip	93
4.4.4 Einordnung der Patienten nach RU-Signalen an die FVIII-Proteine	95
4.5 Etablierung eines biomimetischen FVIII-Biosensors	97
4.5.1 Vorversuche mit einer Mischung aus Gerinnungsfaktoren (Cofact®)	97
4.5.2 Erweiterung des anti-FVIII-Assays mit FIX und FXa Injektion	99
5 Zusammenfassung	103
6 Summary	106
7 Abkürzungsverzeichnis	108
8 Literaturverzeichnis	110

1 Einleitung und Motivation

Die Blutgerinnung ist ein komplexer Schutzmechanismus des Organismus, um bei Verletzungen der Blutgefäße Blutungen zu stoppen und den Wundverschluss zu ermöglichen. An diesem in mehreren Phasen ablaufenden Prozess bis zur Entstehung eines stabilen Gerinnsels sind viele Gerinnungsfaktoren involviert.

Ist der Ablauf gestört, kann es zu unkontrollierbaren Blutungen kommen. Wenn ein Defekt im Gerinnungsfaktor VIII vorliegt, wird die Krankheit als Hämophilie A diagnostiziert. Von Hämophilie B spricht man, wenn der Faktor IX betroffen ist. Die zugehörigen Gene werden auf dem X-Chromosom codiert. Folglich ist die Hämophilie eine vererbte Diathese und tritt, da sie rezessiv vererbt wird, in den allermeisten Fällen bei Jungen auf¹.

Die Prävalenz für Hämophilie A liegt bei ca. 1 von 5.000 männlichen Neugeborenen und bei 1 von 30.000 für Hämophilie B^{2,3}. In Deutschland leiden ca. 5.000 Menschen an Hämophilie A und weltweit geschätzt bis zu 400.000 Menschen⁴. In den meisten Fällen wird ein defektes Gen maternal an den Hämophilie-A-Patienten vererbt. In ca. 30 % der Neuerkrankungen tritt eine so genannte spontane Mutation im Erbgut auf⁵.

Für die Behandlung der Patienten stehen seit den 70er Jahren Medikamente zur Verfügung, welche den fehlenden endogenen Faktor substituieren⁶. Die Behandlungskosten für Hämophilie A belaufen sich im Durchschnitt auf ca. 1 US Dollar pro Faktor-VIII-Einheit⁷. Da bei einem 50 kg Patienten ca. 1.000 Einheiten pro Injektion verabreicht werden, belaufen sich die Behandlungskosten in Deutschland auf ca. 40.000 - 120.000 €/Jahr/Patient⁸. Hämophilie kann daher oft nur in Industrieländern adäquat behandelt werden. Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit ca. 300.000 Menschen keinen Zugang zu einer soliden Therapie erhalten⁴.

Solange ein Patient keine Immunantwort gegen das Medikament entwickelt, kann er heutzutage ein nahezu normales Leben führen. Da Hämophilie auf einer Genmutation basiert, sind die Betroffenen schon ab Geburt erkrankt. Aus diesem Grund wird meistens schon vor dem zweiten Lebensjahr mit der Therapie begonnen⁶. Ca. 20-30 % der Kleinkinder mit Hämophilie entwickeln Antikörper gegen ihr Medikament⁹, was zu einer Inaktivierung des Wirkstoffs führt und schwere, lebensgefährliche Blutungen nach sich zieht. Um die betroffenen Patienten an das Medikament zu gewöhnen, wird eine Immuntoleranztherapie durchgeführt. Im Durchschnitt werden ca. 14 Monate lang die 10fache

Menge an Faktor-VIII-Einheiten verabreicht (> 200 Einheiten/kg/Tag)¹⁰. Diese Therapie ist aufgrund der vielen Injektionen, insbesondere für Kleinkinder, sehr unangenehm und kompliziert. Zudem entstehen sehr hohe Therapiekosten. Deswegen ist die FVIII-Antikörper-Forschung ein sehr aktuelles Gebiet. Auf der einen Seite wird nach gut verträglichen Präparaten gesucht und auf der anderen Seite ist eine bessere Diagnostik wünschenswert.

Die Labormedizin bedient sich heutzutage eines breiten Analytikspektrums, mit dem die unterschiedlichsten Proteine, Hormone oder Elektrolytkonzentrationen in Körperflüssigkeiten exakt und reproduzierbar bestimmt werden können. Im Gegensatz dazu, ist die Gerinnungsdiagnostik eher altmodisch, da sie mit ihren 2 Globaltests nicht die Aktivität der einzelnen Faktoren nachweist, sondern die Summe der Faktoren aus dem intrinsischen Gerinnungsweg (aPTT-Wert) oder dem extrinsischen (Quick-Wert) widerspiegelt. Die Gerinnung wird mit unterschiedlichen Aktivatoren gestartet und die Zeit bis zum Entstehen eines Gerinnsels bzw. von Fibrinfäden gemessen. Im Falle eines Faktor-VIII-Mangels ist die Gerinnungszeit stark verlängert¹¹. Diese funktionalen Tests haben den Nachteil, dass die Ergebnisse stark von den eingesetzten Reagenzien abhängen und infolgedessen stark variieren¹².

Mittels eines funktionalen Tests wird im Rahmen der Immuntoleranztherapie der Rückgang des Inhibitors überprüft, um den Therapieerfolg belegen zu können. Der Antikörper wird nachgewiesen, indem der Faktor VIII zum Patientenplasma hinzugegeben wird, die Gerinnungszeit aber trotzdem verlängert bleibt. Diese Methode wird als Bethesda-Assay bezeichnet und wurde 1973 von vielen Experten im Konsens festgelegt¹³. Der Bethesda-Assay zusammen mit dem Nijmegen-Assay¹⁴, einer verbesserten Variante des Bethesda-Assays, ist bis heute die einzige routinemäßig durchgeführte Bestimmungsmethode, um Gerinnungshemmkörper wie anti-FVIII-Antikörper im Plasma nachzuweisen. Ein Nachteil des Tests ist die mangelnde Sensitivität. Viele Patienten, die als Hemmkörper-negativ gelten, weisen trotzdem überdurchschnittlich viele Blutungen auf. Des Weiteren ist der Assay nicht ausreichend standardisiert und kann nicht vollautomatisiert durchgeführt werden. Dazu kommt die lange Inkubationszeit von 2 h und die vielen manuellen Einzelschritte, die den Test sehr zeitaufwendig und fehleranfällig (Inter-Assay-Abweichung von rund 40 - 60 %)¹⁵ machen. Somit sind die Ergebnisse des Bethesda-Assays unterschiedlicher Labore kaum vergleichbar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das vorhandene Methodenspektrum um ein solides Testsystem zur Detektion von FVIII-Antikörpern zu ergänzen. Hierzu sollte eine hoch sensitive Methode entwickelt werden, die standardisiert werden kann und einfach zu handhaben ist. Darüber hinaus sollte zur Kosten- und Zeitersparnis neben einer Quantifizierung auch eine zeitgleiche

Charakterisierung der Antikörper erfolgen können. Diese hohen Ansprüche an ein neuartiges Untersuchungsverfahren sollen zukünftig der Verbesserung der Hämophilie-Behandlung dienen. Um möglichst nahe an den medizinisch realistischen Anforderungen zu arbeiten, sollte die generelle Umsetzbarkeit an Hand von humanen Blutproben überprüft werden. Eine verbesserte Charakterisierung der Hemmkörper soll dazu beitragen, zielgerichtete Medikamente entwickeln und eine personalisierte Medizin für die betroffenen Hämophilie-A-Patienten anbieten zu können.

2 Theorie

2.1 Geschichte, Gegenwart und Zukunft der Hämophilie-Therapie

2.1.1 Geschichte der Hämophilie

Hämophilie wurde schon in der Antike (1.200 v. Chr.- 600 n. Chr.) erstmals erwähnt. Im Talmud, einer Sammlung jüdischer Schriften, ist festgehalten, dass das dritte männliche Baby nicht beschnitten werden sollte, wenn zuvor zwei ältere Brüder aufgrund übermäßiger Blutungen verstorben waren³. Im 12. Jahrhundert beschrieb der arabische Arzt Albucasis eine Familie mit Männern, die von Blutungen nach trivialen Verletzungen starben³. Es dauerte aber bis 1803, dass der Arzt John Conrad Otto aus Philadelphia die erste moderne Beschreibung der familiären Blutungsneigung veröffentlichte. Die betroffene Familiengeschichte verfolgte er in Archiven bis 1720 und zeigte, dass Frauen die Überträgerinnen der Erkrankung (Konduktorinnen) sind ohne sie phänotypisch auszuprägen, Männer im Gegensatz dazu aufgrund der Disposition erkranken¹⁶. Die erste wissenschaftliche Benennung, Haemorrhaphilie („Liebe/Neigung zur Blutung“), erfolgte 1822 in der Doktorarbeit von Friedrich Hopff. Er verkürzte diese später auf Hämophilie, wie die Krankheit bis heute bezeichnet wird³.

In den 20er Jahren wurde angenommen, dass Hämophilie mit einer Fragilität der Blutgefäße zu begründen sei. Einige Jahre später wurden defekte Blutplättchen als Ursache vermutet³. Im Jahre 1937 fanden Patek und Taylor heraus, dass sie die Gerinnungsstörung des Blutes durch Zugabe des Plasmaproteins anti-Hämophilie-Globulin behoben werden konnte¹⁷. Zehn Jahre später zeigte Pavlovsky, dass Blut von einem Bluter die Gerinnungsstörung eines anderen Blutlers nicht beheben konnte¹⁸. Er hatte bei zwei Patienten einen Mangel an unterschiedlichen Proteinen identifiziert: einen Patienten mit Faktor-VIII-Mangel (Hämophilie A) und einen anderen Patienten mit Faktor-IX-Mangel (Hämophilie B)¹⁹. Das Fehlen bzw. die Inaktivität dieser an der Blutgerinnung beteiligten Proteine führt zum Auftreten von Hämophilie. Je nachdem, welches Protein betroffen ist, unterscheidet man die Subtypen A (Faktor VIII) und B (Faktor IX).

Heutzutage ist bekannt, dass Hämophilie A und B gonosomal, also über die Geschlechtschromosomen, vererbt werden²⁰. Da das mutierte, pathogene Gen rezessiv ist, kann es durch ein gesundes Allel ausgeglichen werden. Das Vererbungsschema kann am Beispiel einer

Stammbaumanalyse von zwei Familien nachvollzogen werden (Abbildung 1). Vererbt die phänotypisch gesunde Mutter ihr defektes X-Chromosom an ihren Sohn, prägt er die Krankheit aus, da das Y-Chromosom die Mutation nicht kompensieren kann. Erhält die Tochter das mutierte Chromosom, wird sie selbst zur Konduktorin, bleibt jedoch gesund. Im Falle der Vererbung des gesunden X-Chromosoms sind die Kinder gesund, sofern keine spontane Mutation auftritt. Bei einer genotypisch erkrankten Mutter liegt somit die Wahrscheinlichkeit, ein phänotypisch an Hämophilie erkranktes Kind zu gebären, bei 25 %. Falls der Vater an Hämophilie erkrankt ist und die Mutter genotypisch gesund ist, sind die Söhne gesund, aber die Töchter Konduktorinnen.

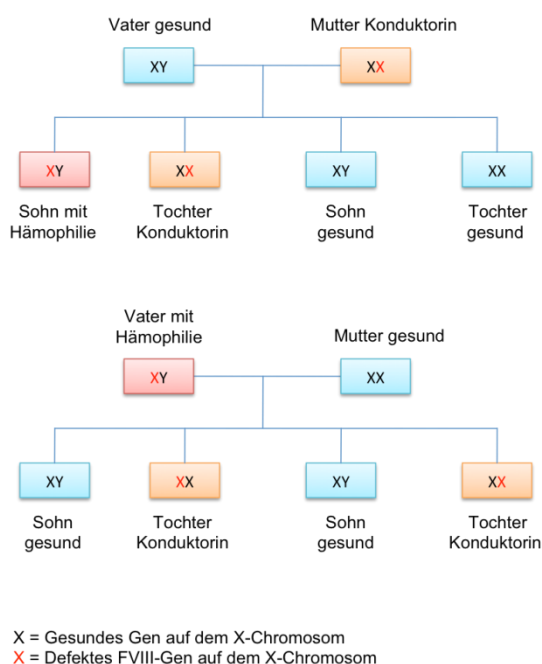


Abbildung 1: Vererbungsschema bei Hämophilie A und B²¹. Blau unterlegt: gesunde Personen; orange: Konduktorinnen, die sind phänotypisch unauffällig; rot: phänotypisch an Hämophilie erkrankter Mann.

Die Schwere der Krankheit für Hämophilie A wird abhängig von der FVIII-Restaktivität in 3 Gruppen eingeteilt. Bei einer Restaktivität unter 1 % spricht man von schwerer Hämophilie. Eine Restaktivität von 2 - 5 % verweist auf eine mittelschwere und eine von 5 - 40 % auf eine leichte Hämophilie. Hämophilie-A-Patienten mit unter < 1 % FVIII-Aktivität, leiden an Gelenk- und Muskelblutungen, die zu schweren körperlichen Einschränkungen führen können²¹.

2.1.2 Etablierung der Hämophilie-Behandlung

Die Vollbluttransfusion wurde 1840 im „*Lancet*“ als Therapieoption postuliert²². Zu diesem Zeitpunkt waren die verschiedenen Blutgruppen nicht bekannt, und aufgrund der Unverträglichkeiten setzte sich die Therapie nicht durch. Ein anderes Problem der Vollbluttransfusionen ist die zu niedrige Konzentration der notwendigen Faktoren, um eine Blutung zu stoppen. Etwas erfolgreicher war die Heimtherapie mit Plasmapräparaten, die von Nielsson (1958) etabliert wurde. Erst im Jahr 1964 entdeckte Pool, dass kryopräzipitiertes (mittels Kälte ausgefälltes) Plasma große Mengen an FVIII enthielt²³. Zum ersten Mal war ausreichend FVIII vorhanden, um schwere Blutungen zu kontrollieren²⁴. Seit 1968 sind lyophilisierte Gerinnungspräparate kommerziell erwerbbar.

Während der späten 1970er und frühen 1980er Jahre kam es zu der sogenannten „internationalen Katastrophe“. Die Gerinnungsfaktorpräparate waren aus gepoolten Plasmaspenden von über 2.000 Personen ohne vorherige Virusinaktivierung hergestellt worden²⁵. Dies hatte zur Folge, dass in Europa und den USA ca. 60 - 70 % der Hämophilen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV)²⁶ und wahrscheinlich 80 % mit Hepatitis C²⁵ infiziert wurden. Heimburger entwickelte 1981 ein Verfahren, um die Viren abzutöten, ohne dabei den FVIII zu inaktivieren. Dieses umfasste eine Kombination aus dem Einsatz von Detergenzien, Belichtung, Nanofiltration und Hitzeinaktivierung²⁵. Trotz der sehr hohen Effektivität dieses Verfahrens können die sehr temperaturresistenten Parvoviren B19 nicht eliminiert werden. Bei Erwachsenen, die mit plasmatischen Faktoren gut eingestellt sind, wird diese Infektionsgefahr in Kauf genommen, da die Risiken überschaubar sind²⁷. Für Neugeborene werden heutzutage hauptsächlich sichere, rekombinante Produkte, die seit 1992 auf dem Markt sind, verschrieben²³.

2.1.3 Die Zukunft der Hämophilie-Behandlung

Die Zukunft der Hämophilie-Behandlung liegt zum einen in der Gentherapie und zum anderen in Präparaten mit einer verlängerten Halbwertszeit, wie z.B. einem bispezifischen Antikörper, der FVIII imitiert.

Für die Gentherapie sind Hämophilie A und B als monogenetische Erkrankungen prädestiniert. Überwiegend wird die Gentherapie im Bereich der Onkologie (64,4 % aller Gentherapien) eingesetzt, um Chemotherapien zu verbessern²⁸. Insgesamt listeten Ginn und Alexander (2013) 1800 Studien in 31 Ländern auf 5 Kontinenten auf und gaben an, dass jedes Jahr knapp 100 neue Studien

hinzukommen²⁸. In der Hämophilie-Forschung werden seit über zwei Dekaden virale und nicht virale Vektorsysteme entwickelt. Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Lentiviren sind aktuell die vielversprechendsten Vektoren²⁹. Virale Vektoren werden *in vitro* in Stammzellen eingefügt und dem Patienten anschließend intravenös verabreicht. In anderen Ansätzen werden die Viren nicht in Stammzellen, sondern in operativ entfernte Leberzellen injiziert. Die transduzierten Leberzellen werden anschließend per Infusion in die *Vena portae* oder *Arteria hepatica* retransplantiert³⁰. Für Hämophilie A sind Leberzellen und Muskelzellen am geeignetsten, da der FVIII in der Leber gebildet wird und Muskelzellen leicht zugänglich sind.

Retrovirale Vektoren können sich in das Chromosom integrieren und über die Lebensdauer der Zelle stabil exprimiert werden. Allerdings besteht die Gefahr einer Insertionsmutagenese. Im Gegensatz dazu integrieren AAV und adenovirale Vektoren in der Regel nicht. Sie sind meist in nichtteilenden Zellen enthalten und wirken somit kurzzeitig³¹. Die Alternative zu viralen Plasmiden sind DNA-Vektoren, die über zwei verschiedene Techniken in die Zellen eingebracht werden: i) die sogenannte „nackte DNA-Verabreichung“ mittels physikalischer Verfahren, wie Elektroporation oder Genkanone und ii) die Einbringung über einen chemischen Träger, z. B. kationische Polymere oder Lipide³². DNA-Vektoren werden häufig als sicherer wahrgenommen, obwohl auch sie eine Insertionsmutagenese verursachen können.

Zum Einsatz von Gentherapie bei Hämophilie wurden viele Studien an Tieren oder mit Menschen publiziert³³. Prinzipiell ist Gentherapie bei Hämophilie B einfacher umzusetzen, da sich das für Faktor IX kodierende Gen aus nur ca. 1.500 Basen zusammensetzt, während das Gen für FVIII aus rund 7.000 Basen besteht. Kleinere Gene sind einfacher in Plasmide zu integrieren, was die Therapie-Effizienz signifikant erhöht³⁴.

Im *New England Journal of Medicine* wurden bisweilen die vielversprechendsten Ergebnisse für eine Gentherapie von Hämophilie B publiziert³⁵. Die Forscher hatten einen AAV-FIX-Vektor unter der Kontrolle eines auf die Leber beschränkten Promotors intravenös in Muskelzellen eingebracht. Bei sechs erwachsenen Männern mit schwerer Hämophilie B lag die Aktivität des FIX im Bereich von 1 - 6 % über einen Zeitraum von 70 Wochen (fast 1,5 Jahre). Vier dieser Patienten konnten ihre Prophylaxe einzustellen und waren weitgehend frei von spontanen Blutungen. Zwei Patienten konnten die Frequenz der FIX-Infusionen reduzieren. Dies bestätigte die Ergebnisse, die zuvor mit an Hämophilie B erkrankten Hunden, die mit dem gleichen Ansatz behandelt wurden, erzielt wurden³⁶.

Für Hämophilie A liegen noch keine wegweisenden Forschungsergebnisse im Bereich der Gentherapie vor. Burton et al. (1999) verwendeten zwei AAV-Vektoren, um die leichte und schwere

Kette des FVIII separat zu exprimieren, da sie nicht auf einen Vektor passten³⁸. Chao et al. gelang es, den *B-domain-deleted*-FVIII in einen Vektor zu klonieren und mit dessen Hilfe die Blutungsneigung bei Mäusen zu korrigieren³⁹. Die ersten Studien an größeren Tieren, an 9 Hunden, wurden 2010 publiziert. Unter Verwendung zweier verschiedener AAV-Viren zeigte sich eine FVIII-Aktivität von bis zu 10 %. Bei einem Hund wurde jedoch eine Immunantwort gegen FVIII beobachtet⁴⁰. Ein vielversprechender Ansatz ist die neuartige 5,2-kb-Expressionskassette im AAV-Virus (rAAV-HLP-codop-h-V3) mit einem Hybrid-Leber-spezifischen Promotor⁴¹. Das Genkonstrukt vermittelt höhere FVIII-Expressionen in Mäusen und nicht-menschlichen Primaten als mit anderen FVIII-Varianten. Somit bestehen gute Aussichten auf einen sicheren und wirksamen Gentransfer für Hämophilie-A-Patienten.

Die zwei großen Nachteile der Genterapie sind weiterhin die häufig zu beobachtende Immunantwort auf die Viren und die unkontrollierte Integration des Vektors im Genom. Dadurch können andere Gene zerstört und andere Krankheiten ausgelöst werden.

Die andere, zuvor erwähnte Alternative ist der humanisierte, bispezifische Antikörper, über den Kitazawa et al. 2012 in *Nature Medicine* berichteten⁴². Dieser Antikörper bringt den FIXa und FX im richtigen Abstand zusammen. Das ist essentiell, um den FX zu aktivieren. Der entstandene Komplex nennt sich, vom Englischen abgeleitet, Tenasekomplex. (Abbildung 2).

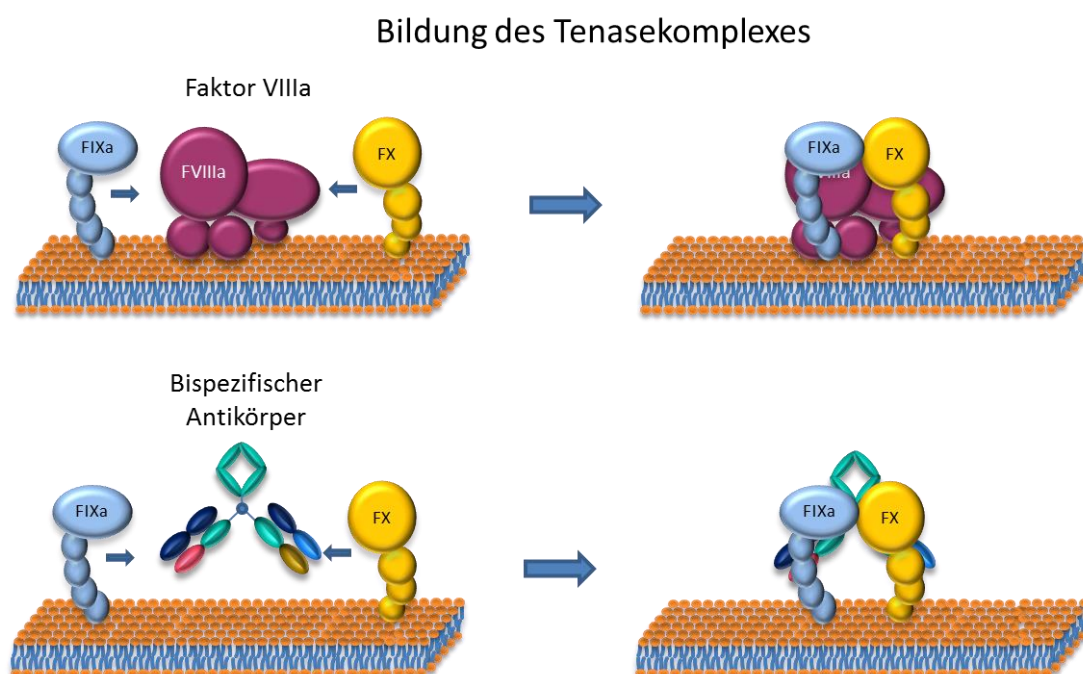


Abbildung 2: Bildung des Tenasekomplexes: klassisch über den FVIII (oben) und mittels dem neuen bispezifischen Antikörper (unten). Dargestellt nach Kitazawa et al.⁴²

Folglich erzeugt der bispezifische Antikörper im FVIII-defizienten-Plasma eine normale partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Für *in vivo* Versuche standen hämophile, nicht humane Primaten nicht zur Verfügung, sodass ein neutralisierender Antikörper generiert wurde, der Affen-FVIII neutralisiert, aber nicht Schweine-FVIII. Auf diese Weise konnten Vergleichsversuche zum Antikörper mit Schweine-FVIII durchgeführt werden. Mit Hilfe des anti-Affen-FVIII-Antikörper wurde eine erworbene Hämophilie im Primaten simuliert und die *in vivo* Aktivität des bispezifischen Antikörpers überprüft. Eine Aktivität von 10 % wurde gemessen. Im Vergleich dazu erreicht die klassische Hämophilie-Therapie bei schwerer Hämophilie nur eine 1 - 5 %ige FVIII-Aktivität. Jedoch ist die katalytische Aktivität des FVIII 14fach besser als die des Antikörpers. Sie ist Bestandteil aktueller Forschung. Ein weiterer Vorteil der bispezifischen Antikörper liegt in der hohen Halbwertszeit im Plasma mit über 2 Wochen. Im Vergleich dazu, weist der FVIII eine Stabilität von einem halben Tag auf. Darüber hinaus können diese bispezifischen Antikörper subkutan verabreicht werden, sodass das für den Patienten kompliziertere und unangenehmere intravenöse Spritzen umgangen werden kann. Zusammengefasst ist der bispezifische Antikörper eine hoch interessante und vielversprechende Alternative zum FVIII⁴². Im Jahr 2014 wurde von der gleichen Arbeitsgruppe ein verbesserter bispezifischer Antikörper entwickelt⁴³. Er hat eine Bioverfügbarkeit von 100 % und ist bis zu 3 Wochen *in vivo* stabil. Das bedeutet, dass nur einmal im Monat das Medikament gespritzt werden müsste. Momentan wird die klinische Phase III von der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz, geplant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass seit 1964, vom ersten FVIII-Präparat bis heute sehr große Fortschritte für die Therapie gemacht wurden, obwohl die Blutgerinnung eines der kompliziertesten Systeme in unserem Körper ist.

2.2 Das zellbasierte Gerinnungssystem der primären und sekundären Hämostase

Das Gerinnungssystem des Blutes befindet sich im ständigen Wechsel zwischen antikoagulatorischen Aufgaben, um das Blut ständig fließen zu lassen, und der Gerinnselbildung, um Gefäßverletzungen schnell zu verschließen.

Aufgrund der Komplexität war die Hämostase lange Zeit ein nicht verstandener Mechanismus. Der erste Gerinnungsfaktor, der identifiziert wurde, war Fibrin. Im Jahr 1666 gelang es Marcelo Malphagi den Faktor Ia (F1a) nach Waschungen eines Thrombus als klebrigen Stoff zu erkennen⁴⁴. Ungefähr 150 Jahre später wurde Thrombin (F1a) und die Rolle von Calcium-Ionen vom Physiologen Alexander

Schmidt entdeckt⁴⁴. Er nahm an, dass ein unbekannter Stoff Prothrombin zu Thrombin umwandelte und damit die Gerinnung auslöste. Im 18. Jahrhundert wurden zwei Theorien zum Wundverschluss vertreten. Die Theorie des Franzosen Jean-Luis Petit beinhaltete die Bildung eines Blutpfropfs. Die andere These, von Sauveur François Morand postuliert, favorisierte ein mechanisches Zusammenziehen der Gefäßwand⁴⁵. Der große Durchbruch zum Verständnis der Koagulation, gelang erst 1964. Zwei Arbeitsgruppen postulierten fast simultan den kaskadenartigen Verlauf der Blutgerinnung^{46,47}. Sie gingen davon aus, dass jeder der Gerinnungsfaktoren ein Proenzym ist und aktiviert werden kann. Später kam die Erkenntnis, dass Proenzyme und Cofaktoren existieren. Bis heute wird die Gerinnungskaskade so gelehrt, wie sie in Abbildung 3 dargestellt ist.

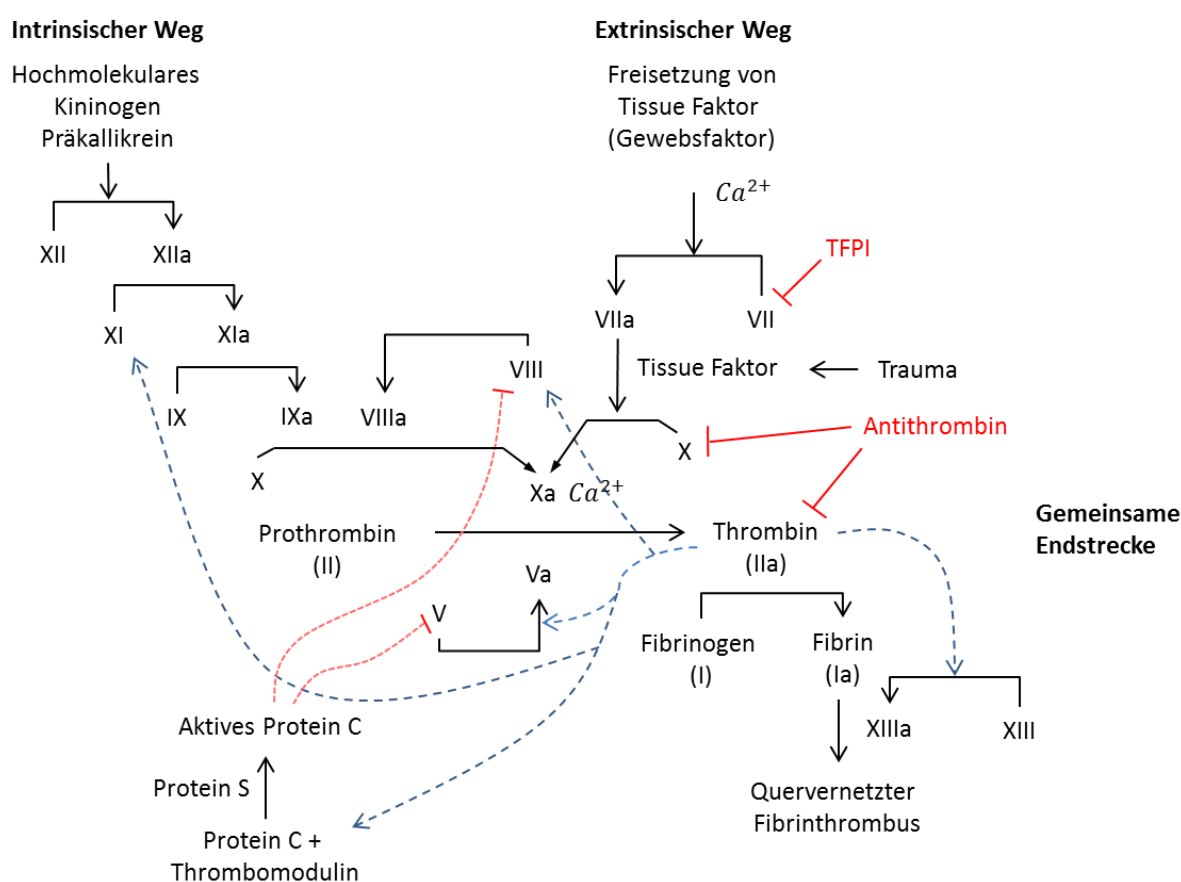


Abbildung 3: Humorale Gerinnungskaskade. Die römischen Zahlen stehen für die Gerinnungsfaktoren. Das „a“ steht für die aktive Form des Gerinnungsfaktors. Der intrinsischen Weg kann mit Hilfe des aPPT-Tests und der extrinsische Weg mittels des Quick-Tests überprüft werden. Die roten Linien stellen die Inaktivierungsschritte dar, die blauen Pfeile die positive Feedback-Schleife von Thrombin. Angelehnt dargestellt nach Adams et al.⁴⁸

Meistens wird das Gerinnungssystem als y-förmiges Schema dargestellt mit zwei separaten Kaskaden, dem intrinsischen (endogen angeregten) und dem extrinsischen (durch äußere Faktoren

angeregten) Weg. In den verwendeten Global-Gerinnungslabortests werden diese Wege zur Diagnostik herangezogen. Der sogenannte Quick-Test⁴⁹ (auch Prothrombin-Zeit genannt) verfolgt den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade und kann einen Mangel des FII, FV, FVII und FX durch eine verlängerte Gerinnungszeit bestimmen. Die Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)⁵⁰ entspricht dem intrinsischen Weg und weist einen Mangel an FVIII, FIX, FXI und FXII nach²¹.

Mit beiden Tests kann das klinische Blutungsrisiko nicht vorhergesagt werden, da nicht jeder Faktormangel gleich starke Blutungen verursacht⁵¹. So ist das Fehlen von FXI und XII klinisch kaum auffällig, wohingegen ein FVIII-Mangel und ein FIX-Mangel zu starken Blutungen führt⁵¹. Das bedeutet dieses Modell entspricht nicht der Situation *in vivo*, sondern nur einem *in vitro* Verlauf.

Dass der *Tissue-Faktor* (TF) auch den FIX aktiviert, gilt als Schlüsselbeobachtung und zeigt eine Verknüpfung des extrinsischen und intrinsischen Weges⁵². Der TF wird in den Endothelzellen und in glatter Muskulatur exprimiert und ist der Initiator der Gerinnung. Unklar ist, warum ein intakter extrinsischer Weg, ein FVIII- oder FIX-Leiden nicht kompensieren kann. Das Kaskaden-Modell ist aufgrund dessen nicht hinfällig, doch es wurde, vornehmlich von Hoffman und Monroe sowie anderen Forschern, durch eine Interaktion mit Zellen erweitert^{51,53-55}. In ihrem zellbasierten Gerinnungsmodell wird die Gerinnungsbildung nicht in einer Kaskade, sondern in 3 überlappenden Schritten erklärt⁵³ (Abbildung 4):

- 1) Initialisierung der Gerinnung findet auf *Tissue-Faktor* tragenden Zellen statt;
- 2) Amplifikation mittels Gerinnungsfaktoren, um eine große Menge an Thrombin zu generieren;
- 3) Propagation (Kettenreaktion), in der eine große Menge an Thrombin auf der Thrombozyten-Oberfläche generiert wird.

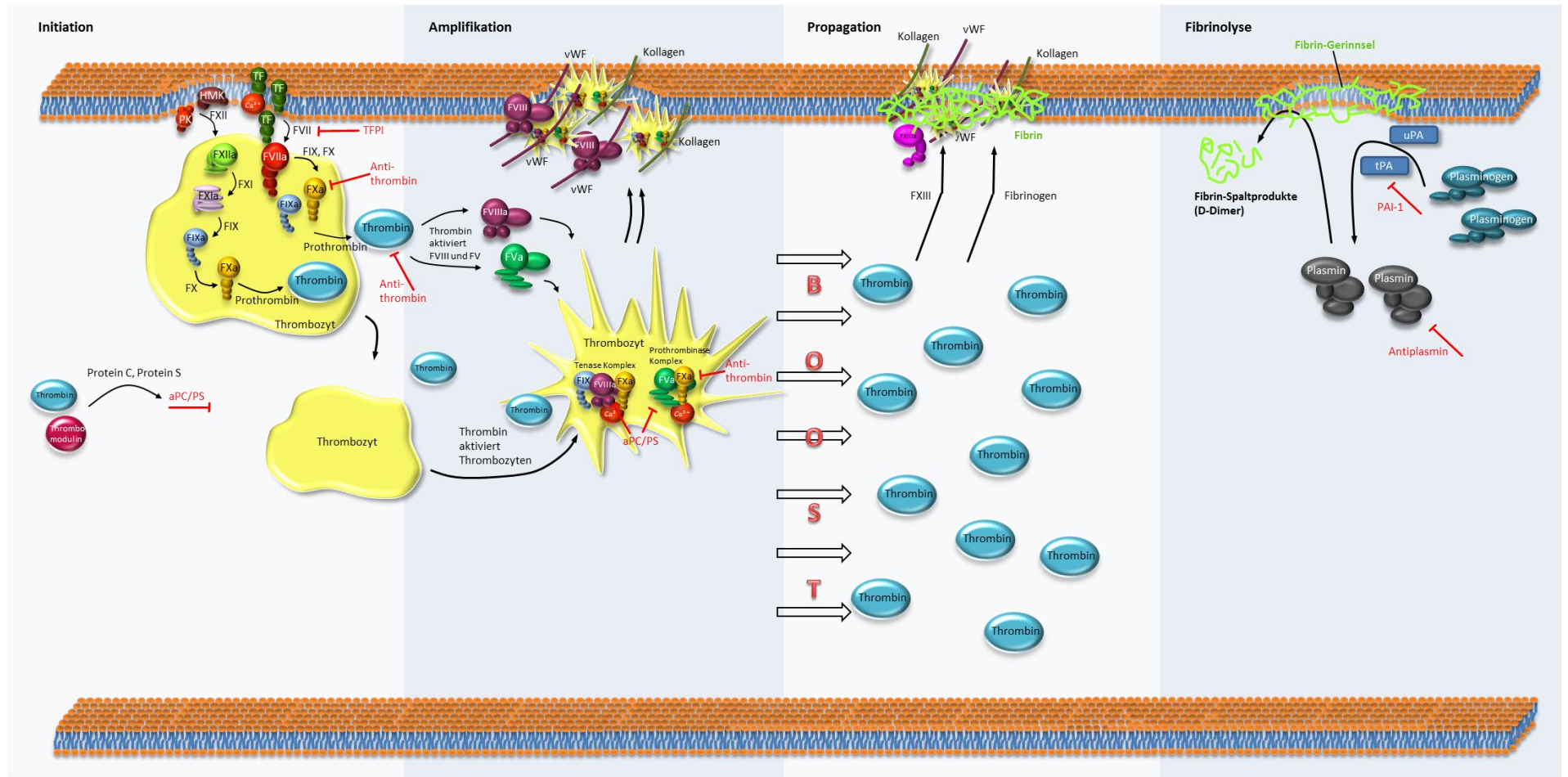


Abbildung 4: Zellbasiertes Gerinnungsmodell mit Fibrinolyse (dargestellt nach ⁵⁶). Der Prozess ist in 4 Phasen unterteilt (von links nach rechts): 1. Initiierung des Gerinnungsprozesses mit Freisetzung des *Tissue-Factors*; 2. Amplifikation von aktivierten Thrombozyten und Generierung von Thrombin; 3. Prolongation mit Thrombin-Boost und Wundverschluss mit Hilfe von Fibrin, FXIII, vWF sowie Kollagen; 4. Fibrinolyse mit der Aktivierung von Plasminogen durch Umsetzung in Plasmin, dessen Zersetzung des Fibringerinnsels zu Spaltprodukten und Auflösung des Thrombus.

Im Detail laufen folgende Schritte ab: Der Gerinnungsprozess wird in Gang gesetzt, wenn TF-exprimierende Zellen in der Gefäßwand aufgrund einer Verletzung mit Blut in Kontakt treten^{57,58}. Der TF ist ein Transmembranprotein und ein Cofaktor für FVII, der ihn gleichzeitig aktiviert. Der Aktivierungsmechanismus ist noch nicht gänzlich verstanden⁵⁹. Der entstandene Komplex aktiviert FX und FIX⁵². Die zwei Gerinnungsproteine haben unterschiedliche Aufgaben. Der FXa interagiert mit seinem Cofaktor FVa, um den Prothrombinase-Komplex zu formen⁶⁰. Damit wird eine kleine Menge Thrombin auf den Endothelzellen, wie den Thrombozyten, produziert⁵¹. FIX interagiert mit FVIII zum Tenasekomplex, um FX zu aktivieren (Abbildung 2 A). Jeder aktivierte FXa, der von der TF-tragenden Zelle abdissoziiert, wird schnell von *Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor* (TFPI) und Antithrombin III inhibiert. Das gewährleistet die begrenzte Lokalisation der Thrombin-Generierung. Zudem kann der FXa nicht von einer Zelle zu einer anderen Zelle wandern. Im Gegensatz dazu kann sich der Faktor IXa an nahe gelegenen Blutplättchen oder an andere Zelloberflächen anhaften. Begründet ist das damit, dass der FIXa nicht durch TFPI gehemmt wird, sondern über Antithrombin III. Dieser Prozess ist jedoch viel langsamer⁵⁴. Antithrombin III ist der Hauptinaktivator in der Gerinnung. Er hemmt auch FXa und Thrombin.

Thrombin wurde im ersten Schritt nur in geringer Menge produziert, hat aber im zweiten Schritt mehrere wichtige Funktionen⁶¹. Zunächst einmal aktiviert Thrombin mehr Thrombozyten. Wenn Thrombozyten aktiviert werden, verändern sie ihre Form. Sie werden von scheibenförmigen Plättchen zu Kugeln mit langen Pseudopodien. Dies ermöglicht ihnen, die Läsion besser zu verschließen und mehr Oberfläche für die Gerinnungsfaktoren bereitzustellen. Außerdem aktiviert Thrombin die wichtigen Cofaktoren V und VIII auf der Thrombozyten-Oberfläche⁶². Bei der Aktivierung dissoziiert der von-Willebrand-Faktor (vWF) vom FVIII ab⁶³, wodurch der vWF zusätzliche Thrombozyten-Adhäsion und später auch die Thrombozyten-Aggregation an dieser Stelle vermittelt. In dieser Phase wird durch die geringe Thrombin-Konzentration auch der Faktor XI zu XIa aktiviert⁶⁴. Der FXIa aktiviert zudem FIX, welcher essentiell für den sogenannten Thrombin-Boost ist, da er im Tenasekomplex zusammen mit FVIII das meiste Thrombin generiert.

Im dritten Schritt findet der Thrombin-Boost statt⁵¹. Dafür ist eine große Menge von Thrombozyten notwendig, da die Reaktionen auf ihrer aktivierten Oberfläche stattfinden. Aktiviert werden die Thrombozyten außer vom Thrombin besonders durch das freigelegte Kollagen und dem vWF⁶⁵. Der Thrombin-Boost wird aufgrund der Prothrombinase- (Ca^{2+} , Phospholipide, FVa und FXa) und Tenasekomplexe (Ca^{2+} , Phospholipide, FXa, FIXa und FVIIIa) erzeugt. Der Tenasekomplex katalysiert die FXa-Bildung um das 200.000fache und macht so die Gerinnung höchst effizient⁶⁶. Da die Reaktion nur auf aktivierten Thrombozyten stattfinden kann, ist der Gerinnungsprozess lokal stark eingegrenzt und verhindert Thromben in intakten Blutgefäßen. Die hohe Thrombin-Konzentration ermöglicht ein

stabiles Fibringerinnsel. Für die Synthese müssen Fibrinmonomere quervernetzt werden. Der Faktor XIII wird durch Thrombin zu FXIIIa aktiviert. Dieser vernetzt Fibrinmonomere über die γ -Module der Fibrinketten zu einem stabilen und festen Gerinnsel⁶⁷. Die Quervernetzung der Fibrinmoleküle schützt vor dem hydrolytischen Abbau durch Plasmin^{68,69}. Freier Sauerstoff bzw. oxidative Lösungen können die Fibrinbildung beschleunigen.

Jedes Gerinnsel muss auch wieder abgebaut werden. Bei unverletzten Gefäßwänden, wirken Thrombomodulin, Protein C-Rezeptor, Protein S, Antithrombin und *Tissue-Plasminogen-Activator* (tPA) im Endothel anti-koagulatorisch⁷⁰. Im Heilungsprozess einer Verletzung muss das Fibringebilde entfernt werden. Das erfolgt mittels Plasmin. Die inaktive Vorstufe von Plasmin ist Plasminogen, das von dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und tPA aktiviert wird⁵¹. Schon bei der ersten Fibrinbildung wird Fibrin durch Plasmin in lösliche Abbauprodukte, die sogenannten D-Dimere, gespalten⁷¹. Plasmin setzt an den C-terminalen Lysinenden an und lysiert das polymerisierte Fibrin. Die Regulation der Fibrinolyse über den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) verhindert einen vorzeitigen Abbau des Gerinnsels.

Zusammengefasst funktioniert das Gerinnungssystem, indem durch eine Verletzung der TF-exprimierenden Endothelzellen die Gerinnung ausgelöst und dadurch eine geringe Menge Thrombin generiert wird. Aufgrund der katalytischen Effektivität des Prothrombinase- sowie des Tenasekomplexes entsteht eine große Menge Thrombin auf den aktivierten Thrombozyten. Dieses ermöglicht die Bildung von Fibrin. Erst nach Quervernetzung des Fibrins mittels FXIIIa entsteht ein stabiles Gerinnsel. Damit das Gerinnsel wieder abgebaut werden kann, wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert, was die Quervernetzungen und das Fibrin wieder löst.

2.2.1 Der Faktor VIII

Der FVIII ist eines der kompliziertesten und größten Proteine⁷² (Abbildung 5). Erst 1984 gelang es zwei Arbeitsgruppen, die Primärstruktur des humanen FVIII anhand der cDNA-Sequenz abzuleiten^{73,74}. Lokalisiert ist das Gen auf der Spitze des langen X-Chromosoms⁷³. Das FVIII-Gen ist eines der größten bekannten Gene und erstreckt sich über 186.000 Basenpaare mit 26 Exons. FVIII ist aus insgesamt 2351 Aminosäuren aufgebaut⁷⁵.

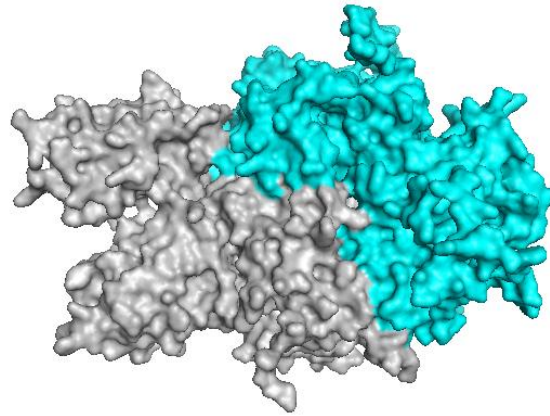


Abbildung 5: Faktor VIII in seiner Kristallstruktur. Die schwere Kette ohne B-Domäne ist in grau dargestellt und die leichte Kette in türkis. Nach dem PDB 3CDZ erstellt mit Pymol™.

Nach der Verarbeitung des Signalpeptids wird das FVIII-Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 264.763 Da sezerniert (Abbildung 6). In der Literatur schwanken die FVIII-Molekülgrößen von 260-330 kDa, da auf einem SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen unterschiedliche Größen beobachtet wurden⁷². Ein Grund dafür ist die umfangreiche Glykosylierung. Basierend auf der Homologie-Analyse wird die FVIII-Sequenz in drei A-, zwei C- und einer großen B-Domäne unterteilt⁷⁴. Die drei A-Domänen sind durch drei kurze Platzhalter $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ verbunden. Somit ist eine detaillierte Beschreibung der FVIII-Sequenz $\text{NH}_2\text{-A1-}\alpha 1\text{-A2-}\alpha 2\text{-B-A3-}\alpha 3\text{-C1-C2-COOH}$. Die A und C Domänen zeigen Homologien zu dem Kupfer-bindenden Protein Coeruloplasmin und dem Faktor V⁷⁶. Nur die B-Domäne hat keine Homologie mit bekannten Proteinen⁷⁷.

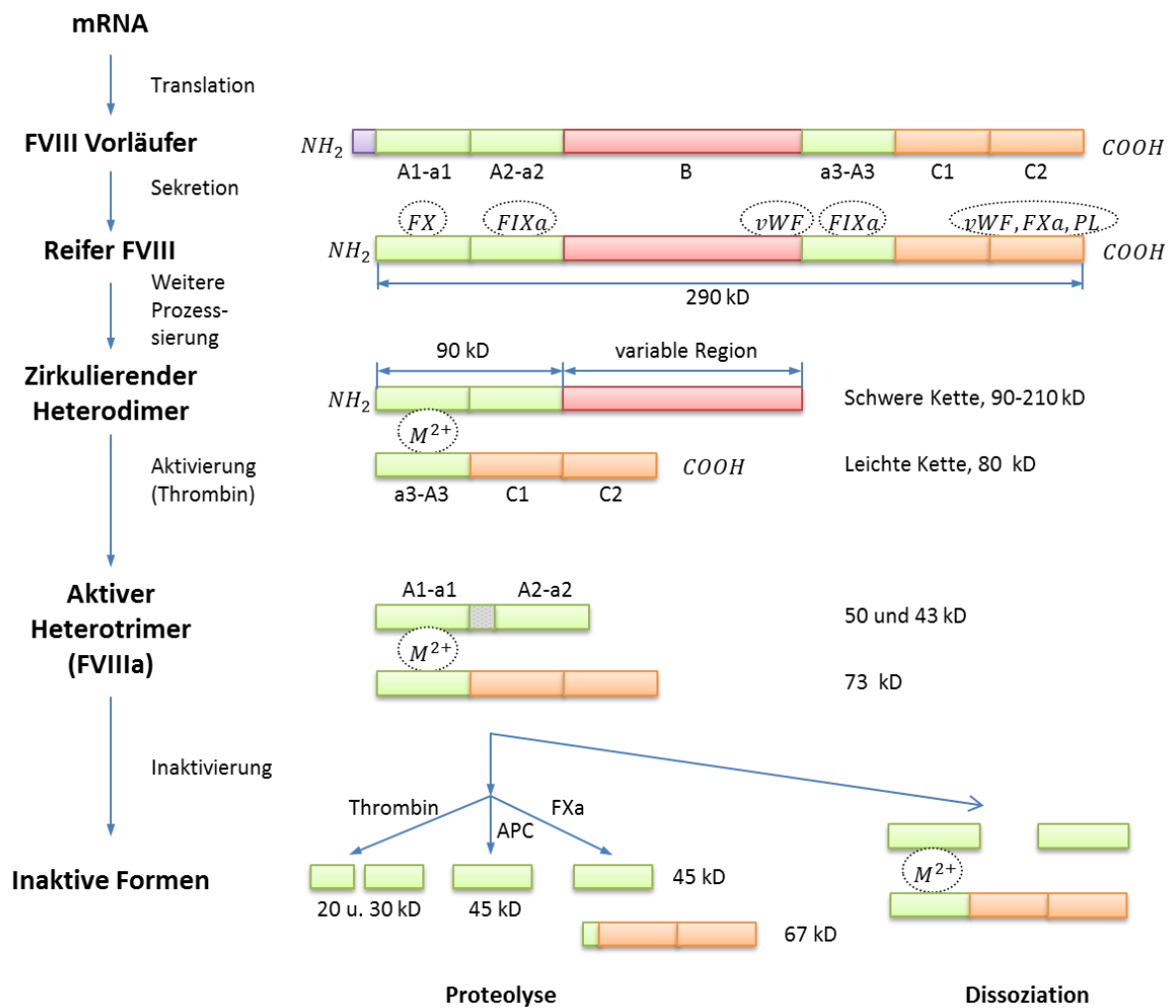


Abbildung 6: Darstellung der Faktor-VIII-Struktur, -Funktion und -Prozessierung. Die Bereiche der FVIII-Wechselwirkung mit anderen Gerinnungsfaktoren, vWF, Phospholipide (PL) und Metallionen (M^{2+}) sind durch Kreise dargestellt. APC= aktiviertes Protein C. Die Zeichnung ist angelehnt an Wang *et al.*⁷².

Aufgrund der Komplexität und der umfangreichen Glykosylierung konnte auch der isoelektrische Punkt (pI) der schweren Kette noch nicht bestimmt werden. Der pI der leichten Kette liegt bei 6,5⁷⁸.

2.2.1.1 FVIII-Synthese

Mehrere Gewebe haben das Potenzial das Faktor-VIII-Gen zu exprimieren. Die mRNA ist in einer Vielzahl von Geweben einschließlich der Milz, Lymphknoten, Leber und Niere zu finden^{79,80}. Abgeleitet von Leberperfusionsergebnissen^{81,82} und Lebertransplantationsstudien^{83,84} ist die Leber die Hauptquelle für FVIII.

Es gibt viele technische Schwierigkeiten, den Gerinnungsfaktor *in vitro* in Zellkultur zu exprimieren. Die Expressionsraten sind aufgrund einer niedrigen mRNA-Menge und einer ineffizienten Sekretion sehr gering. Das hat mehrere Gründe: Zum einem ist das Gen sehr groß und zum anderen sind an der Biosynthese viele Proteine, wie Chaperone, beteiligt⁸⁵. Dadurch ist der Transport vom Endoplasmatischen Retikulum in den Golgi Apparat erschwert⁸⁶. Die aufwändige *in vitro* Expression lässt die hohen Kosten (ca. 1\$ / 1 FVIII-Einheit⁸⁷) für die rFVIII-Präparate erklären.

Der FVIII wird nichtkovalent über die A1- und A3-Domäne der leichten und schweren Kette durch ein Metallion verbunden⁸⁸. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Tatsache, dass EDTA zu einem Gerinnungsaktivitätsverlust führt, da das Heterodimer dissoziiert⁷⁸. Die genaue Anzahl und Funktion der Metallionen im FVIII ist noch umstritten. Eine frühe Untersuchung von Mikaelsson et al. zeigte die Gegenwart von Calcium ein 1:1 Verhältnis im hochgereinigten FVIII, während andere Metalle, wie Mangan, Strontium, Zink, Aluminium, Magnesium, Kupfer und Eisen, nicht vorhanden waren⁸⁹. Auf der anderen Seite gibt es eine große Anzahl an Publikationen, die von einwertigen Kupfer-Ionen berichten^{90,91}. Basierend auf Rekonstitutionsstudien mit isolierten FVIII-Ketten, ist Kupfer allein unzureichend, die Cofaktor-Aktivität zu erzeugen. Rekombinanter FVIII wird in Puffern mit Ca^{2+} oder Mn^{2+} versetzt, um die FVIII-Aktivität zu gewährleisten. Diese Ionen tragen nicht zur Affinität zu anderen Faktoren bei, sondern fördern die Cofaktor-Aktivität durch Modulieren der Konformation des Heterodimers⁸⁸. Unabhängig von dem genauen Mechanismus dienen Metallionen der Aufrechterhaltung der heterodimeren Struktur des FVIII. Dessen ungeachtet ist, aufgrund der Heterogenität und Komplexität, bisher noch keine komplette, hochauflösende, dreidimensionale Kristallstruktur des FVIII bestimmt worden⁷².

2.2.1.2 Physiologische Anbindung an den von-Willebrand-Faktor im Blut

Unmittelbar nach dem Eintreten in den Blutkreislauf wird der FVIII von seinem Trägerprotein, dem vWF, mit einer festen, aber nichtkovalenten Bindung komplexiert⁷⁷. Prinzipiell ist jedes multimeres vWF-Protein in der Lage, ein FVIII-Molekül mit hoher Affinität ($K_d > 0,22 \text{ nmol/l}$) zu binden. Aufgrund der niedrigen FVIII-Konzentration ist das Verhältnis zwischen FVIII und vWF 1:50⁹². Die Affinität zu vWF ist 100fach stärker als zu FIX⁹³.

Eine Funktion der Komplexbildung zwischen vWF und FVIII ist die Hemmung der verfrühten Bindung an FX und FIXa, also der Bildung des Tenasekomplexes⁹⁴. Es wird als unwahrscheinlich erachtet, dass vWF mit FIXa konkurriert⁷⁷. Eine weitere, sehr entscheidende Aufgabe des vWF ist die Verlängerung der Halbwertszeit des FVIII von 1 bis 2 h auf 10 bis 12 h⁹⁵. Somit wird die Proteolyse zwar durch Plasmaenzyme unterdrückt, die Aktivierung von Thrombin aber durch den vWF nicht gehemmt.

Thrombin und FXa aktivieren den FVIII⁷⁴. Beide spalten das Molekül in der schweren Kette am Arg 372 und Arg 740 sowie in der leichten Kette am Arg 1689. FXa spaltet noch an einer zusätzlichen Position, am Arg 1721. Nach dem zellbasierten Gerinnungsmodell sind Phospholipide entscheidend für die effiziente Proteolyse von FVIII durch FXa⁹⁶. Der vWF hemmt wahrscheinlich diese Bindung. Aber auch in Gegenwart von vWF kann eine Fraktion der FVIII-Moleküle mit Phospholipiden assoziieren, da FVIII mit vergleichbar starker Affinität an vWF und Phospholipide bindet⁹⁷.

Der FVIII selbst hat eine sehr geringe bis gar keine nachweisbare prokoagulatorische Aktivität. Der aktivierte FVIII (FVIIIa) bindet an FIXa im Molverhältnis 1:1⁹⁴ und bildet zusammen mit Ca²⁺ und Phospholipiden den Tenasekomplex, um den FX zu aktivieren.

2.2.2 Der von-Willebrand-Faktor

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein adhäsiv wirkendes Glykoprotein⁹⁸. Die Größe variiert von 500 kDa (Dimer) bis zu 20.000 kDa (Multimer)⁹⁹. Somit gilt er als das größte Protein im Körper. Er wird von Endothelzellen¹⁰⁰ und Megakaryozyten synthetisiert. Nachweisbar liegt er gelöst im Plasma sowie in Zellen der Basalmembran, in Endothelzellen und Thrombozyten vor. Zu seinen physiologisch wichtigsten Aufgaben gehören zum einen die Bindung an die Thrombozyten-Rezeptoren Glykoprotein Ib und IIb/IIIa¹⁰¹ bei Gefäßverletzungen und zum anderen der Schutz des FVIII vor Proteolyse.

2.2.2.1 vWF-Domänenstruktur

vWF-Multimere sind im Elektronenmikroskop als unverzweigte, locker aufgerollte Proteine sichtbar. Unter Einwirkung hydrodynamischer Scherkräfte entrollt sich das Protein und bildet lange Fäden¹⁰². Das hat den Vorteil, dass der vWF nur bei hohen Scherkräften, somit im Falle einer Verletzung, aktiviert wird. Die 1-3 µm langen Multimere besitzen so eine ähnliche Größe wie Thrombozyten. Ein Protein besteht aus 178 Kilobasenpaare mit über 52 Exons und Introns. Das Gen enthält mehrere, sich wiederholende homologe Regionen, die durch Genreplikation entstanden sind. Das Protein lässt sich in folgende Regionen unterteilen: D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, D4, B, C1, C2 (Abbildung 7).

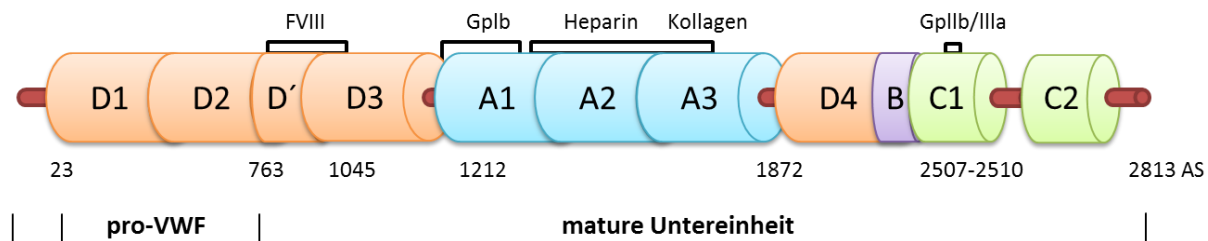


Abbildung 7: Struktur des von-Willebrand-Faktors (vWF) mit Bindungsstellen der Rezeptoren, für Kollagen oder Proteine. Darstellung angelehnt an Schneppenheim¹⁰³.

2.2.2.2 Klassifikation des von-Willebrand-Syndroms

Der vWF wurde nach dem finnischen Internisten Dr. Erich Adolf von Willebrand benannt, der ihn im Jahr 1926 beschrieben hat. Er bemerkte eine Störung der Blutgerinnung, die sich von Hämophilie unterschied¹⁰⁴. Erst später wurde das Protein identifiziert und die Krankheit mit der verminderten Synthese oder mit Defekten des vWF in Verbindung gebracht¹⁰⁵. Dafür waren Arbeiten von Rudolf Jürgens um 1930 entscheidend. Deswegen wird im deutschsprachigen Raum die Krankheit oft von-Willebrand-Jürgens-Syndrom genannt.

Das von-Willebrand-Faktor-Syndrom (vWS) ist schwierig zu diagnostizieren, was einerseits mit den heterogenen klinischen Symptomen zusammenhängt und andererseits daran liegt, dass es keinen Labortest gibt, der alle Typen auf einmal erkennt¹⁰⁶. Zudem können die Laborwerte z.B. durch Alter, Geschlecht, Blutgruppe und/oder hormonelle Schwankungen beeinflusst werden. Prinzipiell werden 3 Haupttypen unterschieden. Typ 1 enthält quantitative Defekte des vWF. Der Typ 2 ist sehr heterogen, da hier sämtliche qualitativen Defekte des vWF eingeschlossen sind. Er wird in viele Subtypen aufgeteilt^{105,106}. Typ 3 ist durch völliges Fehlen des vWF in den Thrombozyten und im Plasma charakterisiert.

Wie auch bei der Hämophilie gibt es ein erworbenes von-Willebrand-Syndrom (englisch *acquired*, avWS). Dieses resultiert aus quantitativen und/oder qualitativen Mängeln. Die Häufigkeit vom avWS ist nicht eindeutig bekannt, aber es wurden ca. 300 Fälle publiziert¹⁰⁷. Die Blutungen werden meistens mit Desmopressin oder FVIII/vWF-Konzentraten, behandelt. Basierend auf den Daten der internationalen Registrierung scheint es, dass avWS besonders häufig bei lympho- oder myeloproliferativen Erkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorkommt¹⁰⁸.

Das Gen des vWF ist am distalen Ende des kurzen Arms vom Chromosom 12 lokalisiert, sodass das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom autosomal und dominant vererbt wird. Das hat zur Folge, dass die

Krankheit in ihrer milden Form mit einer Frequenz von 0,8 % die häufigste erbliche Blutgerinnungsstörung beim Menschen ist¹⁰⁹, die schwere Typ III Form tritt bei ca. 1:1.000.000 Menschen auf¹⁰⁶.

2.3 Das Immunsystem und die Entwicklung von FVIII-Antikörpern

Die prinzipielle Entdeckung des Immunsystems geht bis ins Jahr 430 v. Chr. zurück, da bereits im antiken Griechenland bekannt war, dass Menschen, die die Pest überstanden hatten, andere Pestkranke pflegen konnten, ohne sich erneut anzustecken¹¹⁰. Doch erst im 18. Jahrhundert erkannte Louis Pasteur mit seinen Impfversuchen an Mäusen die erworbene Immunität. 1891 bewies Robert Koch, dass Mikroorganismen die Ursache der Infektionskrankheit sind¹¹¹. Heute zählt es zum Basiswissen der Immunologie, dass die Verabreichung von Viren oder Bakterien in einer nicht letalen Dosis in einem höheren Organismus zur Bildung von Antikörpern gegen das fremde Protein führt¹¹².

Das Immunsystem kann in das angeborene Abwehrsystem und das erworbene, oder auch adaptive, Immunsystem unterteilt werden. Die humorale Immunantwort basiert auf der Bildung von Antikörpern. Der Mensch hat 5 verschiedene Antikörper-Isotypen: IgA (Immunglobulin A), IgD, IgE, IgG und IgM. IgA ist das am meisten produzierte Immunglobulin. Der Anteil im Plasma beträgt aber nur 15 %, da es hauptsächlich auf Schleimhäuten lokalisiert ist. IgM ist mit 970 kDa der größte Antikörper. Seine Hauptaufgabe besteht in der ersten Abwehrreaktion und wird von den B-Zellen produziert, die zu der Gruppe der Lymphozyten gehören¹¹³.

Die IgG sind die am häufigsten vorkommenden Antikörper in Plasma. Ihre Grundstruktur besteht aus zwei identischen schweren (50 kDa) und zwei leichten (24 kDa) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken in der Triangelregion kovalent miteinander verbunden sind. Jeder Antikörper besitzt zwei Bereiche: der artspezifische, konservative Bereich, der sogenannte F_c -Teil, und der hoch variable F_{ab} -Bereich (Abbildung 8). Im F_{ab} -Bereich sind die Komplementarität-bestimmenden-Regionen (*complementary determining regions* (CDR)) für die Antigenbindung verantwortlich. Der Großteil der synthetisch erzeugten menschlichen Antikörperbibliotheken konzentriert sich auf die Randomisierung der CDR-3 Regionen, um so verschiedenste Antigene zu erkennen¹¹⁴.

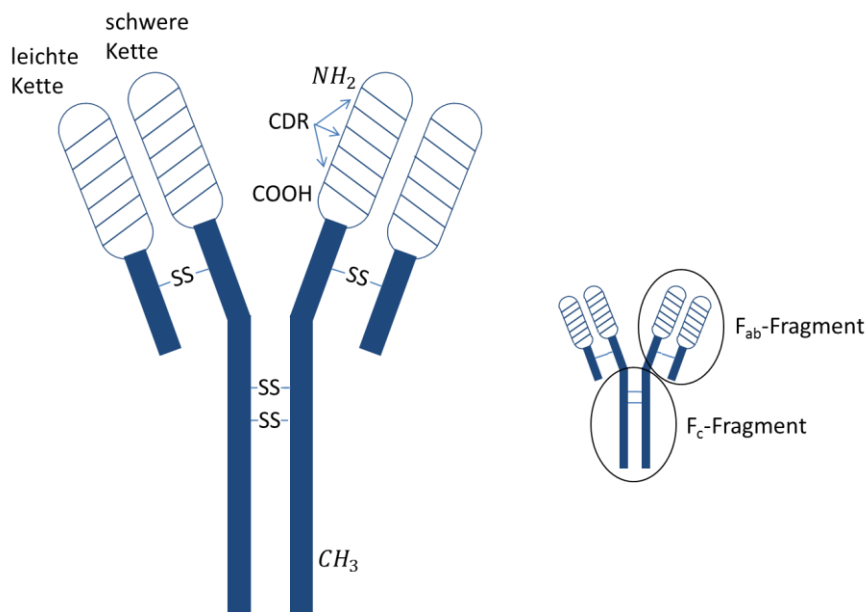


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers nach Ahmad *et al.*¹¹⁴. An die F_{ab}-Elemente bindet das Antigen. Der F_c-Teil ist artspezifisch konserviert. -SS- steht für die Disulfidbrücken.

1967 klärte Gerald Edelman die vollständige IgG-Struktur auf und bekam dafür 1972 den Nobelpreis¹¹⁵. Die Aufgabe der Immunglobuline liegt in der Unterscheidung von körpereigenen Substanzen und nichtkörpereigenen Substanzen. Die fremden Substanzen werden spezifisch eliminiert, damit sie dem Organismus nicht schaden können. Neben der enorm hohen Spezifität ermöglichen Antikörper ein adaptives Immunsystem, da gegen jedes Antigen ein Antikörper gebildet und somit eine sichere und nachhaltige Immunabwehr gegen fremde Substanzen garantiert werden kann.

In der Hämophilie-Forschung wurden 1963 erstmals Antikörper gegen den FVIII beschrieben¹¹⁶. Eine Inhibierung von FVIII wurde allerdings schon 1959 in sogenannten Tauschversuchen festgestellt¹¹⁷. Dieser Test war bereits recht genau, benötigte jedoch sehr viel Erfahrung¹¹⁸. Deswegen trafen sich 1974 die Hämophilie-Experten in Bethesda, USA, und entwickelten gemeinsam den Bethesda-Assay¹³. Bei dieser funktionelle Bestimmungsmethode wird Inhibitorplasma mit Imidazolpuffer (0,1 M; pH 7,4) zu gleichen Teilen gemischt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die lange Inkubationszeit beruht auf der niedrigen Kinetik der Inhibition des FVIII durch FVIII-Antikörper. Im Anschluss wird die FVIII-Aktivität gemessen. Nimmt diese um 50 % durch die Inhibierung ab, entspricht das 1 Bethesda-Einheit (Bethesda-Unit (BU)). Wenn nur 25 % Restaktivität des FVIII zu messen sind, entspricht das 2 BU. Liegen die Ergebnisse nicht im Analysebereich, muss das Plasma erneut 1:1 verdünnt werden. Somit ist dieser Test sehr zeitaufwendig. Ungefähr 20 Jahre später wurde von Verbruggen *et al.* eine Modifikation des Assays beschrieben, der sogenannte Nijmegen-

Assay, in dem der Imidazolpuffer durch Normalplasma ersetzt wurde. Diese kleine Modifikation macht den Assay spezifischer und sensitiver¹⁴. Jedoch ist die Inter-Assay-Variation des Bethesda- sowie des Nijmegen-Assays sehr hoch. Sie liegt zwischen 28 - 52 % und beträgt im Mittel für den Bethesda-Assay 45 % und für die Nijmegen-Modifikation 39 %¹¹⁹.

Die Bildung von Inhibitoren ist in der Hämophilie-A-Therapie das größte Problem. Denn die Antikörper blockieren relevante Bindungsstellen, sodass FVIII nicht aktiviert oder in den Tenasekomplex eingebunden werden kann. Deswegen wird seit vielen Jahren versucht, die Bildung von Antikörpern besser zu verstehen. Zu diesem Zweck wird die Antikörperbildung bei Hämophilie-A-Kindern, die noch nie behandelt worden sind, in Studien beobachtet. Die Pathogenese der Bildung von FVIII-Antikörpern wurde in zwei großen, internationalen Studien untersucht. In einer wurde validiert, welches Präparat die geringste Immunantwort auslöst. Die CANAL-Studie mit 316 zuvor unbehandelten Hämophilie-A-Kindern kam zu dem Ergebnis, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen plasmatischen oder rekombinanten FVIII-Präparaten gibt¹²⁰. Die RODIN-Studie untersuchte, ob bei hämophilen Kindern eine hohe FVIII-Gabe vor einer Operation mit einem erhöhten Inhibitorrisiko eingeht. Es zeigte sich, dass sehr hohe FVIII-Gaben die Inhibitorentwicklung steigert, und zwar mit einem Verhältnis von 2,0¹²¹. Prinzipiell ist die Inhibitorentwicklung ein Zusammenspiel von genetischen und mehreren nichtgenetischen Risikofaktoren. Ein erhöhtes Inhibitorbildungsrisiko haben Hämophilie-A-Patienten mit anderem ethnischen Hintergrund wie Plasmaspender, da sich die FVIII-Proteine unterschiedlicher ethnischer Herkunft leicht unterscheiden. Die Spender leben meistens in den USA und Europa, und auch die rekombinanten Präparate werden nach europäischer cDNA synthetisiert. Patienten mit schweren molekularen Gendefekten, wie z. B. großen Deletionen, *nonsense* Mutationen, Intron-22-Inversionen oder fehlender endogener FVIII-Synthese, haben eine 7 – 10fach höhere Prävalenz Inhibitoren zu entwickeln als Patienten mit geringfügigeren molekularen Defekten¹²². Auch eine positive FVIII-Inhibitor-Familiengeschichte kann die Prävalenz für Inhibitoren erhöhen. Polymorphismen in der Promotorregion vom Interleukin 10-Gen gehen auch mit erhöhtem Inhibitorrisiko einher^{9,123,124}. Mittlerweile besteht Konsens darüber, dass sogenannte *Danger-Signals*, damit sind Verletzungen von Gewebe und Impfungen gemeint, während der ersten 50 Expositionstage vermieden werden sollen. Kurnik et al. zeigte, dass von 30 zuvor unbehandelten Kindern nur 1 Kind Antikörper bildete, nachdem die *Danger-Signals* in dem Zeitraum vermieden oder reduziert worden waren¹²⁵. Auch wenn die FVIII-Präparate über die Zeit immer reiner und weniger immunogen wurden, besteht weiterhin die Gefahr, dass Kinder Immunglobuline gegen ihr Medikament entwickeln. Deswegen wird weiter pathobiochemisch untersucht, was die Ursachen der Antikörperbildung sind.

2.4 Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Antikörper gegen die Therapeutika sind in der Hämophilie-A-Therapie eines der wichtigsten Themen. Denn sie können dazu führen, dass die komplette Therapie nicht wirkt. Um diese Inhibitoren zu eliminieren, müssen sie spezifisch nachgewiesen werden. Eine sensitive Methode dafür ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

1902 beobachtete Wood erstmals den physikalischen Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance* (SPR)), indem er polarisiertes Licht auf eine speziell beschichtete Metalloberfläche richtete und im reflektierten Lichtband vereinzelte Abschwächungen der Lichtintensität feststellte^{126,127}. Doch erst im Jahr 1957 beschrieb Ritchie die Oberflächenplasmonen als elektromagnetische Wellen, die durch Schwingungen der freien Elektronen an Metalloberflächen ausgelöst wurden¹²⁸. Zur Veranschaulichung kann ein Plasmon aber auch als Teilchen dargestellt werden, ähnlich dem Photon bei Licht. Ab 1968 konnte der Effekt der Anregung der Oberflächenplasmonen durch Otto¹²⁹ sowie Kretschmann und Raether¹³⁰ vollständig erklärt werden.

Um Oberflächenplasmonen zu generieren, sind freie Elektronen an einer Oberfläche notwendig¹³¹. Deshalb wird in der Regel eine Metalloberfläche verwendet, die frei bewegliche Elektronen bereitstellt. Diese Plasmonen können an der Oberfläche durch Photonen angeregt werden. Das eintreffende Licht wird im Normalfall von der Metalloberfläche des Sensors reflektiert und nur ein Teil der Lichtenergie an Plasmonen weitergegeben. Wenn es aber zum Resonanzfall kommt, wird die gesamte Energie des Lichtteilchens an ein Plasmon abgegeben und kein Licht mehr reflektiert. Die Resonanz hängt stark von der Beschichtung der Metalloberfläche ab. In der biochemischen Analytik nutzt man diesen Effekt aus. Durch eine Adsorption von Molekülen, wie Proteine, auf der Metalloberfläche verändert sich der Resonanzpunkt. Durch einen geeigneten Messaufbau kann so die aufgebraute Schicht vermessen werden¹³².

Einen bioanalytischen Messaufbau definierte Kretschmann^{133,134}. Parallel zur Einfallenebene wird polarisiertes Licht über ein Prisma (ϵ_1 , Quarz) in einem bestimmten Winkel (Θ) auf eine Metallschicht (ϵ_2) gegeben (Abbildung 9). An der dem Prisma abgewandten Seite befindet sich die zu analysierende Deckschicht, das biologische Dielektrikum (ϵ_3).

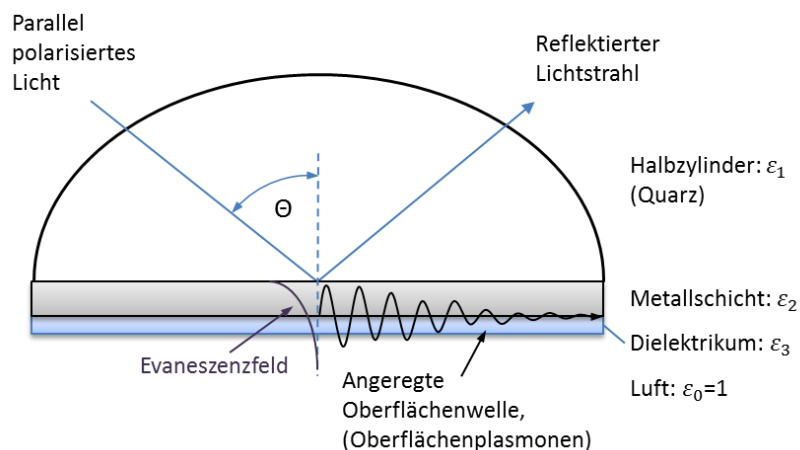


Abbildung 9: Anwendung der Kretschmann-Konfiguration für die Biosensorik. Schematische Zeichnung angelehnt an Kretschmann¹³⁴.

Der Einfallswinkel des Lichtstrahls ist so festgelegt, dass dieser an der Metalloberfläche komplett reflektiert wird (interne Totalreflexion). Das elektrische Feld des monochromatischen Lichts dringt um ungefähr dessen halber Wellenlänge (λ) in die Metallschicht ein¹³¹. Das einwirkende elektrische Feld wird als Evaneszenzfeld bezeichnet. Wird die Dicke des Metalls so dünn ausgelegt, dass das evaneszente Feld die Metallschicht durchdringen kann, werden die Plasmonen an der Grenzfläche Metall und Dielektrikum angeregt. Eine Lichtquelle/Metallchip-Anordnung kann zum Beispiel im Biacore® X (GE Healthcare, München, Deutschland) eine LED mit $\lambda = 760$ nm und ein Goldchip mit einer Schichtdicke von 50 nm sein. Die von den angeregten Plasmonen absorbierte Energie spiegelt sich im reflektierten Lichtstrahl in Form einer Intensitätsminderung wider.

Das Reflexionsminimum, auch als SPR-Dip bezeichnet¹³¹, tritt unter einem bestimmten Einfallswinkel des eingestrahlichten Lichtspektrums auf. In diesem Winkel, dem SPR- oder Resonanzwinkel, kann der einfallende Lichtstrahl die Oberflächenplasmonen anregen. Wird die Reflektivität über den Einfallswinkel vermessen, erhält man ein Reflexionsspektrum mit einem starken Minimum¹³⁴ (Abbildung 10).

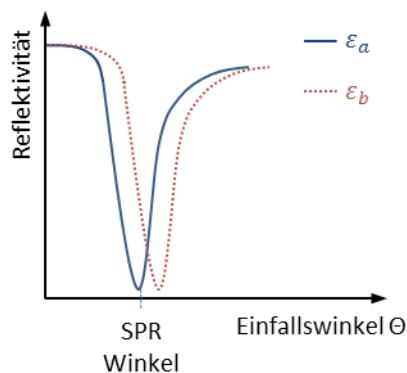


Abbildung 10: Reflexionsspektren zweier Materialien mit unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten ϵ_a und ϵ_b und auftretendem Dip im SPR-Winkel. Abgebildet nach Homola et al.¹³⁵

Die Lage des Reflexionsminimums ist abhängig von den optischen Eigenschaften der Metallschicht und des Dielektrikums. Somit kann eine Änderung des Dielektrikums (z. B. im Biosensor mit adsorbierten Proteinen an der Oberfläche) über die Winkeländerung des SPR-Dips vermessen werden.

Das Biacore®-System verwendet das SPR-Prinzip, um Interaktionen zwischen Molekülen in Echtzeit aufzuzeichnen. Dazu wird ein Interaktionspartner (Biacore®-Terminologie: Ligand) auf einem mit Gold bedampften Sensorchip immobilisiert und das andere Molekül (Analyt) mittels einer Flusszelle über den Chip gespült (Abbildung 11).

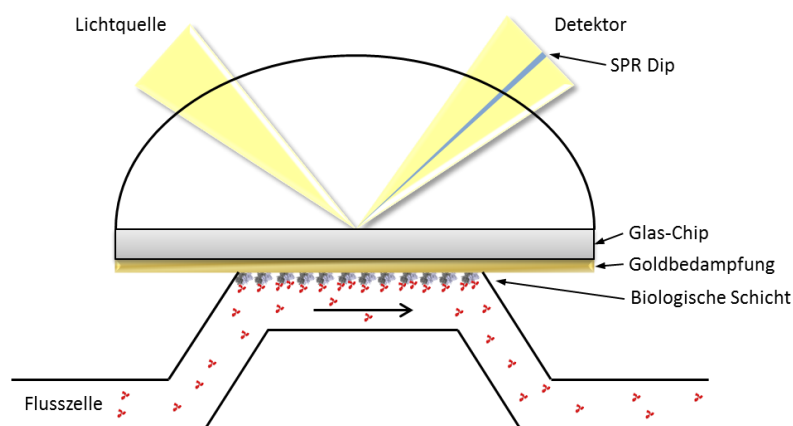


Abbildung 11: Biacore®-Flusszelle mit aufliegendem Sensorchip und Lichteinheit. Dargestellt nach Malmqvist¹³⁶

Durch das Interagieren der Moleküle (entspricht Änderung des Dielektrikums) an der Metallgrenzfläche verändert sich der Resonanzwinkel der Plasmone, und das Reflexionsminimum verschiebt sich. Diese Winkeländerung wird über die Zeit aufgetragen (Abbildung 12).

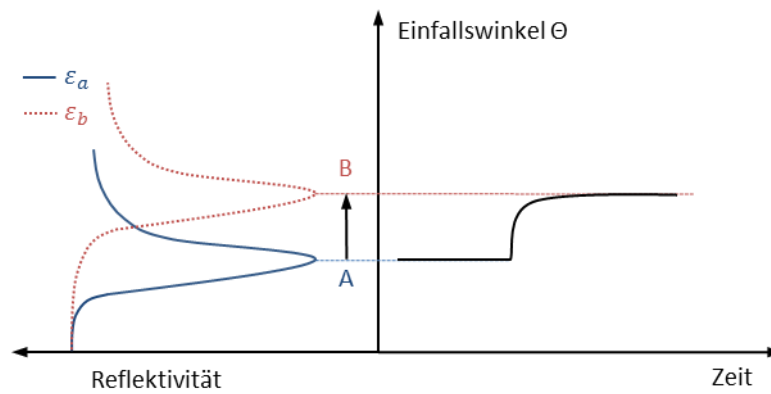


Abbildung 12: Winkel/Zeit-Sensorgramm zum SPR-Dip 90° (gedreht dargestellt). (Abgeleitet von Schasfoort et al. 2008)¹³⁷.

Der Sensorchip besteht aus einem Plastikträger, in dem die eigentliche Messoberfläche, ein goldbedampftes Glasplättchen, integriert ist (Abbildung 13). Der Sensorchip kann durch einen geeigneten Abspaltungsprozess der immobilisierten Proteine wiederverwendet werden. Die Stabilität des Chips hängt sehr stark vom immobilisierten Protein und den Assay-Bedingungen ab. Chips in verschiedenen Ausführungen können kommerziell erworben werden (Abbildung 13).

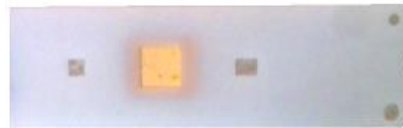


Abbildung 13: Biacore®-Sensorchip mit SAM-Oberfläche und immobilisiertem FVIII nach der Messung. (Quelle: eigene Fotografie).

Die Sensoroberfläche bestimmt durch die Eigenschaften der immobilisierten Moleküle die Spezifität der Biacore®-Messung. Biologisches Material, wie Proteine, Aptamere oder Peptide, können auf drei verschiedene Arten an den Goldchip gebunden werden (Abbildung 14):

- 1) Eine kovalente Bindung des Liganden direkt an der Oberfläche;
- 2) Bindung über einen Interaktionspartner, einen sogenannten *Capture*, der an der Goldfläche (meist kovalent) gebunden vorliegt und an den das Molekül hochaffin gebunden wird (oft eingesetzt: Antikörper);
- 3) Bindung der Liganden über hydrophobe Adsorption.

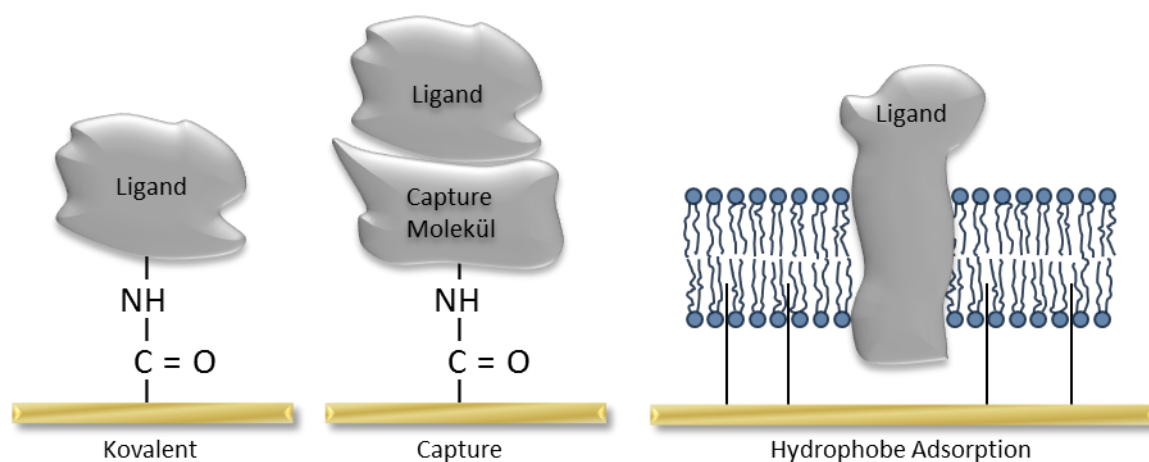


Abbildung 14: Bindungsarten zur Immobilisierung des Liganden an der Chip-Oberfläche (nach Biacore®-Handbuch 2008¹³⁸). Von links nach rechts: direkte kovalente Bindung, Bindung mittels *Capture*-Molekül und hydrophobe Adsorption.

Um die Sensoroberfläche mit Bio-Molekülen überspülen zu können, ist im SPR-Biosensor-Gerät eine Mikrofluidik (Abbildung 15) integriert. Die Interaktion zwischen Ligand und Analyt findet auf der goldbedampften Seite des Chips statt. Der in einem Puffer vorliegende Analyt wird mittels eines Pumpsystems in die Probeschleife durch die Flusszelle gespült. Der Chip bildet eine Wand der Flusszelle und wird durch Pressung auf die offenen Enden der Fluidikkanäle abgedichtet. Das Pumpsystem gewährleistet eine konstante Flussrate von 1-500 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Abbildung 15: Mikrofluidik vom Biacore® 3000 (aus Biacore Sensor Surface Handbook¹³⁸, mit freundlicher Genehmigung von Biacore®).

Durch Auswertung des Reflexionsminimums (SPR-Dip) des reflektierten Lichts erhält man bei einer erfolgreichen Ligand/Analyt-Interaktion ein auswertbares SPR-Sensorgramm (Abbildung 16). Nach dem Start der Analyt-Injektion ist die Anbindung des Analyten an den Liganden anhand der zunehmenden Resonanz bis zur Sättigung zu erkennen. Nach Ende der Injektion läuft nur Puffer über den Sensorchip. Dadurch werden die Ligand-Analyt-Verbindungen wieder aufgelöst, und es kommt zu einer Dissoziation der Anbindungskurve. Im letzten Schritt wird der Chip mit Hilfe einer Regenerationslösung vom Liganden befreit und kann wiederverwendet werden.

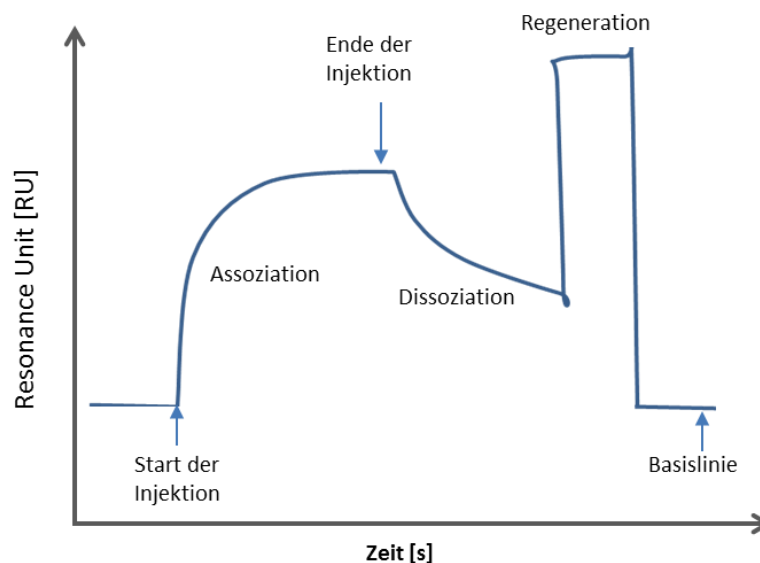


Abbildung 16: SPR-Sensogramm mit Anbindung des Analyten an den Liganden (Assoziation), einer Dissoziationsphase und anschließendem Regenerationsschritt zur Eliminierung des Analyten¹³⁶.

Die Vorteile SPR-Biacore®-Methode sind i) die markierungsfreie Detektionsmethodik, ii) die hieraus resultierende Echtzeitmessung der Reaktion mehrerer Interaktionspartner, iii) die Wiederverwertbarkeit des Chips aufgrund der Regenerationsschritte und iv) die Generierung kinetischer Aussagen über den Komplex.

Der Nachteil der Technik ist die Möglichkeit einer unspezifischen Adsorption anderer Bestandteile des Fluids und somit der Ausbildung einer Fehlerquelle.

2.4.1 Oberflächenmodifikationen zur Immobilisierung von Proteinen auf Gold

Bei der Herstellung von Biochips für die Oberflächenplasmonenresonanz-Technologie wird oft das Phänomen der selbstorganisierenden, monomolekularen Schichten (engl.: *"self-assembled monolayer"*, SAM) verwendet. Hierbei handelt es sich um spontane Anordnungen an einer Festkörperoberfläche, die sich ohne äußere Einflüsse durch Adsorption aus einer Lösung oder aus der Gasphase bilden¹³⁹. Eine derartige Selbstorganisation tritt z. B. bei der Faltung von Proteinen, beim Aufbau von Zellmembranen aus Lipiden¹⁴⁰ und bei der Bildung der DNA-Doppelhelix auf¹³⁹.

Die positiv geladenen Oberflächen vieler Übergangsmetalle, wie Gold, Silber oder Platin, besitzen Elektronenpaar-Akzeptoren und zeigen eine starke Affinität zu Elektronenpaar-Donatoren, wie Thiole, Disulfide und Thioether, auf¹⁴¹. Prinzipiell besteht eine Molekülkette aus der Kopfgruppe, der aliphatischen Kette, die 1-10 nm lang sein kann, und der funktionellen Gruppe (Abbildung 17). In der Regel werden NH_2 -, CH_3 - und OH -Gruppen verwendet. Die funktionelle Gruppe entscheidet über die Eigenschaften der Oberfläche. Ein gutes Beispiel dafür ist die Änderung von einer hydrophoben zu einer hydrophilen Oberfläche, indem von CH_3 - auf OH -Gruppen gewechselt wird¹⁴².

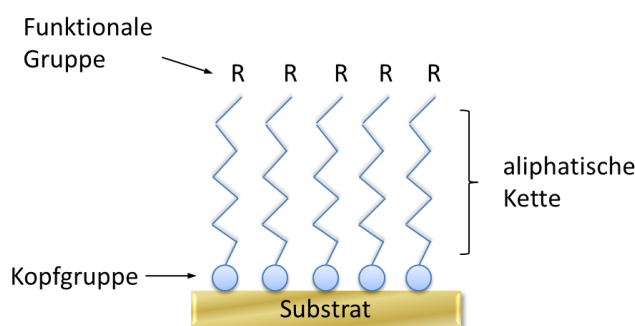


Abbildung 17: Oberfläche mit sich selbstorganisierender, monomolekularer Schicht (SAM-Oberfläche), einer bifunktionalen Monoschicht¹⁴².

Diese bifunktionalen Monoschichten mit definierter Chemie sind essentiell für die kovalente Kopplung von Liganden oder für weitere Derivatisierung. Die Adsorption dieser langkettigen Moleküle erfolgt in der Regel in einer Zeitspanne zwischen 8 - 24 h. Die Bildung einer Monoschicht ist

bereits nach wenigen Minuten fast vollständig abgeschlossen, die zunächst gebildete Monoschicht ist jedoch noch nicht gut geordnet¹⁴¹. Die SAM-Oberfläche wird auch 2D-Oberfläche genannt, weil der Ligand nur an einer Stelle der Molekülkette immobilisiert werden kann.

Sollen geringere Konzentrationen nachgewiesen werden oder handelt es sich um kleine Moleküle (*Small-Molecules* (<10 kDa)), so werden häufig 3D-Oberflächen eingesetzt. Dreidimensionale Oberflächen besitzen längere Moleküle, die pro Kette mehrere Bindungsstellen für den zu immobilisierten Liganden anbieten. Diese erlauben eine viel höhere Immobilisierungsdichte. Die am häufigsten eingesetzte Matrix ist Carboxymethyldextran¹⁴¹. Laut Literaturangaben sind synthetische Polycarboxylate besser geeignet, da sie meist keine unregelmäßigen, das bedeutet verzweigte Hyperformen, wie Helices, bilden¹⁴³.

2.4.2 Immobilisierungsschemie zur Kopplung von Proteinen an einen SPR-Chip

Es gibt unterschiedlichste Immobilisierungsmethoden¹³⁸. Im Folgenden soll nur auf die kovalente Immobilisierung eingegangen werden, da diese in der vorliegenden Arbeit für den Biosensor etabliert werden sollte.

Um das Protein auf der Chipoberfläche zu binden, wird mit einem niedermolekularen Puffer mit niedrigem pH gearbeitet, da die Chipoberfläche meistens negativ geladen ist. Mittels Immobilisierungspuffer wird das Protein positiv geladen und dadurch in die Matrix gezogen¹⁴⁴.

Um anschließend das Molekül kovalent an die Carboxylgruppen zu binden, wird meistens eine Amidkopplung über reaktive Ester verwendet. Das Vorgehen ist in der Handhabung einfach, robust und effektiv¹⁴⁴. Typischerweise werden an die Oberfläche gebundene Carboxylgruppen zunächst mit Carbodiimiden aktiviert und in aktive Ester-Zwischenprodukte umgewandelt. Stickstoff-terminale Gruppen, wie Lysine, können so aminolysiert werden. Das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) wird am häufigsten zur Konjugation von Biomolekülen eingesetzt. Ein großes Problem ist die sekundenschnelle Hydrolyse des Zwischenproduktes, O-Acylisoharnstoff. Demzufolge muss der aktivierte Ester durch Zugabe der wasserlöslichen Verbindung N-Hydroxysuccinimid oder deren sulfonierte Form N-Hydroxysulfosuccinimid zur Aktivierungsmischung stabilisiert werden. Im Gegensatz zum O-Acylisoharnstoff hat das NHS-Ester-Zwischenprodukt eine Halbwertszeit von 8 - 9 Minuten bei einem neutralen pH Wert und bei pH 4 - 5 sogar von bis zu mehreren Stunden¹⁴¹ (Abbildung 18).

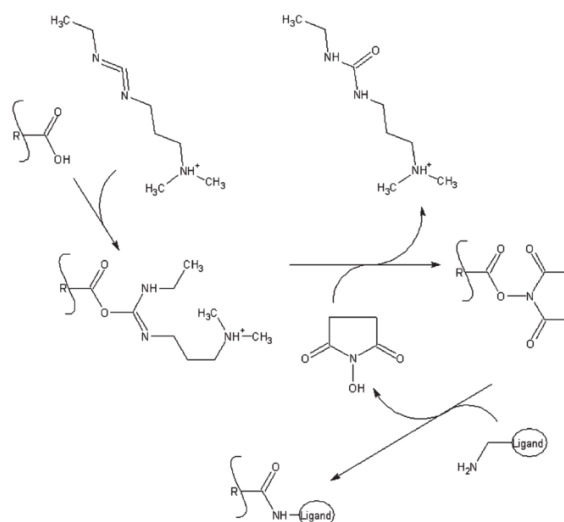


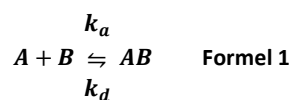
Abbildung 18: Reaktionsschema der COOH-Aktivierung mit EDC/NHS und Liganden-Kopplung¹⁴¹.

Die EDC/NHS-Immobilisierung ist bis heute die meist eingesetzte Kopplungschemie am Biacore®, obwohl es unzählige andere kovalente Kopplungen gibt¹⁴⁵.

2.5 Bestimmung kinetischer Konstanten mit Hilfe des Biacore®-Geräts

Die Echtzeitmessungen mit Hilfe des SPR-Geräts ermöglichen die Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten. Zudem kann die Analytkonzentration bestimmt werden. Zur Verdeutlichung sollen die zugrunde liegenden Abläufe einer 1:1 Reaktion, das heißt, die Bindung zwischen einem Antigen und einem Antikörper, erklärt werden^{146,147}.

Eine reversible Interaktion zweiter Ordnung erfolgt zwischen zwei Molekülen unter folgenden Bedingungen:



In der Formel 1 steht A für den injizierten Analyten, B für den immobilisierten Liganden und AB für den entstandenen Komplex.

Eine Reaktion findet immer mit einer bestimmten Geschwindigkeit statt. Bei der Assoziation (also der Anbindung) wird sie mit der Geschwindigkeitskonstanten k_a beschrieben. Für die Assoziationsreaktion gilt:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A]_{\text{frei}} \times [B]_{\text{frei}} \quad \text{Formel 2}$$

Auf der anderen Seite findet in einer Reaktion auch immer eine Trennung der Interaktionspartner statt. Die Rückreaktion, also die Dissoziation, kann wie folgt beschrieben werden:

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \times [AB] \quad \text{Formel 3}$$

In einem Reaktionssystem mit Assoziation und Dissoziation lässt sich die Nettoanbindung als Differenz beider Gleichungen definieren:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A]_{frei} \times [B]_{frei} - k_d \times [AB] \quad \text{Formel 4}$$

Nachdem die zugrunde gelegten Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten definiert worden sind, gilt es nun die relative Proteinanbindung R zu definieren. Sie ist proportional, im linearen Bereich der Adsorptionstherme, zur Proteinkonzentration:

$$R = k_p T \quad \text{Formel 5}$$

T entspricht der Protein-Oberflächenkonzentration und k_p wird bei der SPR-Technologie als $1 \text{ RU} \cdot \text{mm}^2 / \text{pg}$ (RU: *resonance unit* und pg: Picogramm Protein) definiert¹⁴⁸.

Wenn für kinetische Messungen angenommen wird, dass eine einfache 1:1 Interaktion stattfindet und A (Analyt) mit B (immobilisierter Ligand) zum Komplex AB interagiert, kann das SPR-Signal gegen die Zeit (R_t) mit folgender Gleichung wiedergegeben werden.

$$R_t = \frac{k_a[A]B_{max}}{k_a[A] + k_d} \times (1 - e^{-(k_a[A] + k_d)t}) \quad \text{Formel 6}$$

Somit ist die SPR-Technologie ein Instrument, mit der viele Parameter bestimmt und Antikörper besser charakterisiert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller

Name	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	GE Healthcare (München, Deutschland)
1x NuPAGE Transferpuffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Acrylamid 40 % (Acrylamid/Bis 19:1)	BioRad (Hercules, USA)
Argon	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH (Friedrichshafen, Deutschland)
Borax	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Coomassie-Brilliantblau R-250	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanolamin-HCl 1 M, pH 8	GE Healthcare (München, Deutschland)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Polyethylenglycol 3.350 (PEG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Polyvinylpyrrolidon 10.000 (PVP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Quick Start™ Bradford-Protein-Assay	BioRad (Hercules, USA)
Roti-Load™	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Supersignal West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tricin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triton X 100 (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether)	Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween 80	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.2 Proteine

Tabelle 2: Liste der verwendeten Proteine mit dazugehörigen Konzentrationen und deren Hersteller

Name	Konzentration	Hersteller
Advate® (FL-FVIII)	500 IU/ml	Baxter (Wien, Österreich)
Anti-Faktor-VIII-IgG, monoklonal	0,5 mg/ml	GeneTex (Irvine, USA)
Anti-Faktor-VIII-IgG, polyclonal	10 mg/ml	Cederlane (Burlington, Kanada)
Anti-FVIII-ESH-8, monoklonal	0,5 mg/ml	American Diagnostica (Pfungstadt, Deutschland)
Anti-Human-Albumin-IgG	2 mg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Human-F _{ab}	Nicht bekannt	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Human-F _c	Nicht bekannt	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Human-IgG-HRP	Nicht bekannt	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Human-IgM-HRP	1,3 mg/ml	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Nicht bekannt	Biosciences Amersham (Amersham, England)
Anti-Maus-IgG-HRP	10,9 mg/ml	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-von-Willebrand-Faktor-IgG,	0,2 mg/ml	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Ziege-IgG-HRP	7,3 mg/ml	Dako (Glostrup, Dänemark)
BeneFIX (rekomanter FIX)	25 IU/ml	Pfizer (New York, USA)
Bethesda Inhibitor 16 Plasma	16 BU/ml	Technoclone (Wien, Österreich)
Bethesda Normalplasma	0 BU/ml	Technoclone (Wien, Österreich)
Bovines Serum Albumin (BSA)	99% rein	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Cedarlane (rekombinanter FVIII ohne B-Domäne)	100 IU/ml	Cedarlane (Burlington, Kanada)
Cofact® (Prothrombin-Komplex)	FII: 280 – 700 IU. FVII: 140 – 400 IU FIX: 500 IU FX: 280 – 700 IU Protein C: 222 - 780 IU Protein S: 20 - 160 IU	Sanquin (Amsterdam, Niederlande)
Haemate®P 1000 (plasmatischer FVIII mit vWF)	vWF: 160 IU/ml FVIII: 66.6 IU/ml Albumin: 11-16 mg/ml Gesamt: 13-30 mg/ml	CSL Behring (Marburg, Deutschland)
Humanes Serum Albumin (HSA)	99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kogenate® (FL-FVIII)	500 IU/ml	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Plasmatischer Faktor Xa	100 µg	Enzo Life Sciences (Lausen, Schweiz)
Plasmatischer FL-Faktor VIII	100 IU/ml	Cedarlane (Burlington, Kanada)
Precision Plus Protein Standard	2 mg/ml	BioRad (Hercules, USA)
Protein A/G	2,5 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rainbow Marker	2 mg/ml	GE Healthcare (München, Deutschland)
Refacto®(BDD-FVIII)	50 IU/ml	Pfizer (New York, USA)
Rekombinanter von-Willebrand-Faktor	0,25 mg/ml	Haematologic Technologies Inc (Essex Junction, USA)
Transferrin	12 mg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.3 Blutseren und Blutplasmen

Tabelle 3: Übersicht aller eingesetzten Plasmen und Seren

Name	Bereitgestellt von:
Anti-FVIII-Patientenseren und -plasmen	Prof Dr. Michael Spannagel; Perioperative Hämostase; Klinikum der Universität München Dr. Wolfgang Miesbach; Hämophiliezentrum Frankfurt; (n=9)
Defizientes Faktor-IX-Plasma	Affinity Biologicals (Ancaster, Ontario, Kanada)
Defizientes Faktor-X-Plasma	Affinity Biologicals (Ancaster, Ontario, Kanada)
Defizientes vWF-Plasma	Affinity Biologicals (Ancaster, Ontario, Kanada)
Kontrollplasmen	Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)

Die retrospektive Studie entsprach den Grundsätzen der Helsinki-Erklärung als reflektierte vorheriger Zustimmung der Ethikkommission der Universität München. Diese Genehmigung galt auch für die Patienten aus Frankfurt, da beide Zentren Mitglieder des Deutschen Hämophilie-Netzwerkes sind.

Alle anti-FVIII-Patientenplasmen wurden als positiv klassifiziert, wenn der Bethesda-Assay über 0,6 Bethesda Einheiten/ml entsprach. Der Bethesda-Assay wurde von den Kliniken durchgeführt, in denen die Patienten behandelt worden sind. Im Klinikum rechts der Isar wurden alle Patienten mittels *Factor-VIII-Antibody-Screen* von Immucor GTI Diagnostics (Norcross, USA) auf FVIII-Antikörper untersucht. Wenn bei diesem ELISA Antikörper gegen den FVIII detektiert worden waren, die nicht Bethesda positiv waren, galten diese Antikörper als nichtinhibitorisch.

Tabelle 4: Charakterisierung der Patientenplasmen für die Pilot-Untersuchung mittels Biosensor (n. b.= nicht bestimmbar)

Antikörper Typ	ID	Geburtsjahr	Bethesda Units/ml	Abnahme Datum	Geschlecht
Autoantikörper	Pat 39	1926	2	Mrz 11	Frau
Autoantikörper	Pat 40	1930	17	Jan 08	Mann
Autoantikörper	Pat 41	1930	4	Feb 08	Mann
Alloantikörper	Pat 42	1950	1	Sep 07	Mann
Autoantikörper	Pat 43	1929	78	Nov 09	Mann
Autoantikörper	Pat 44	1929	37	Dez 09	Mann
Autoantikörper	Pat 45	1934	45	Feb 10	Frau
Autoantikörper	Pat 46	1934	23	Feb 10	Frau
Autoantikörper	Pat 50	1932	3	Feb 12	Mann
Autoantikörper	Pat 1928	1928	3	Feb 11	Frau
Autoantikörper	Pat 1947	1947	n. b.	Feb 11	Mann
Alloantikörper	Pat 220	1932	3	Okt 10	Mann
Autoantikörper	Pat 1935	1935	3	Feb 11	Frau

Tabelle 5: Charakterisierung der Patientenplasmen für den großen Screen und den biomimetrischen Sensor (n. b. = nicht bekannt)

Antikörper Typ	ID	Geburtsjahr	Bethesda Units/ml	Abnahme Datum	Geschlecht
Autoantikörper	E 1	1935	466	Sep 11	Mann
Autoantikörper	E 10	1926	2	Mrz 11	Frau
Autoantikörper	E 11	1926	1	Apr 11	Frau
Autoantikörper	E 12	1926	0,7	Apr 11	Frau
Autoantikörper	E 2	1931	0,6	Nov 10	Mann
Autoantikörper	E 3	1931	2	Nov 10	Mann
Autoantikörper	E 4	1935	6	Jan 11	Frau
Autoantikörper	E 5	1935	3	Feb 11	Frau
Autoantikörper	E 6	1935	2	Feb 11	Frau
Autoantikörper	E 7	1935	3	Mai 09	Mann
Autoantikörper	E 8	1935	1	Jun 09	Mann
Autoantikörper	E 9	1928	1	Feb 11	Frau
Alloantikörper	Frankfurt 1	n.b.	9,7	n.b.	Mann
Autoantikörper	Frankfurt 2	n.b.	153,6	n.b.	n.b.
Autoantikörper	Frankfurt 3	n.b.	48,1	n.b.	n.b.
Autoantikörper	Frankfurt 4	n.b.	7	n.b.	n.b.
Autoantikörper	Frankfurt 5	n.b.	16	n.b.	n.b.
Alloantikörper	Frankfurt 6	n.b.	37,8	n.b.	Mann
Alloantikörper	Frankfurt 7	n.b.	8,5	n.b.	Mann
Alloantikörper	Frankfurt 8	n.b.	3	n.b.	Mann
Alloantikörper	Frankfurt 9	n.b.	4,9	n.b.	Mann
Alloantikörper	Pat 227	1943	4	Apr 12	Mann
Alloantikörper	Pat 39	1975	2	Mrz 11	Mann
Alloantikörper	Pat 181	1978	0,6	Mrz 10	Mann
Alloantikörper	Pat 182	1964	1	Mrz 10	Mann
Nichtinhibitorische Antikörper	NS 3	1954	0	Jun 11	Mann
Nichtinhibitorische Antikörper	Pat 29	1947	0	Apr 11	Mann
Nichtinhibitorische Antikörper	Pat 85	1946	0	Aug 11	Mann
Nichtinhibitorische Antikörper	Pat 87	1947	0	Aug 11	Mann
Nichtinhibitorische Antikörper	Pat 240	1966	0	Feb 12	Mann

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Name	Hersteller
Amersham® Hyperfilm ECL (18 × 24 cm)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Filter, 0,2 µm	Whatman (Freiburg, Deutschland)
Filterpapier	BioRad (Hercules, California, USA)
Immunoplaten I Nunc MaxiSorp®	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
LIFECODES Factor VIII Antibody Screen	Immucor GTI Diagnostics (Norcross, USA)
Microcon Zentrifugationssäule 30 kDa, 400 µl	Millipore (Darmstadt, Deutschland)
NHS-aktivierte Säulen, 400 µl	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Nitrozellulose-Membran, 0,45 µm	BioRad (Hercules, USA)
NuPAGE Novex 3-8 % Tris-Acetat Gels; 1,5 mm	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Protein-A/G-Säulen Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
SPR-Sensorchip AU	GE Healthcare (München, Deutschland)
SPR-Sensorchip CM5	GE Healthcare (München, Deutschland)
SPR-Sensorchip CMD50	XanTec (Düsseldorf, Deutschland)
SPR-Sensorchip HC (Polycarboxylat) 1000 nm	XanTec (Düsseldorf, Deutschland)
SPR-Sensorchip HC (Polycarboxylat) 1500 nm	XanTec (Düsseldorf, Deutschland)
SPR-Sensorchip Protein A CMD50	XanTec (Düsseldorf, Deutschland)
Supersignal West Dura Extended Duration Substrat Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)

3.1.5 Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Name	Hersteller
2D Advanced Proteomic Imager	Intas (Göttingen, Deutschland)
ELx808 Absorbance Microplate Reader	BioTek (Winooski, USA)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Kreisschüttler für Mikrotiterplatten	IKA (Staufen, Deutschland)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA (Staufen, Deutschland)
Millipore® Anlage	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mini Trans-Blot Kammer	BioRad (Hercules, USA)
Surface Plasmon Resonance Biacore® X	GE Healthcare (München, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3.1.6 Software

Tabelle 8: Liste der verwendeten Software und deren Hersteller

Name	Hersteller
BIAevaluation 3.2 RC1	GE Healthcare (München, Deutschland)
Biacore X Control Software	GE Healthcare (München, Deutschland)
Gen5 Data Analysis	BioTek (Winooski, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Origin 8.5.1	OriginLab (Northampton, USA)
Pymol 1.7.4	Schrödinger (Portland, USA)
SPSS Statistic 21	IBM (Armonk, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Biochemische Methoden

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinen nach Bradford¹⁴⁹ ist ein kolorimetrisches Verfahren und basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau R250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm aufgrund der Bindung des Farbstoffs an Proteine. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt dabei unspezifisch an unpolare, kationische und hydrophobe Aminosäurereste. Die Intensität des Farbkomplexes ist direkt proportional zum Proteingehalt. Die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe wurde mittels einer Kalibrierung mit BSA (0,15 mg/ml – 2 mg/ml) ermittelt. Jeder Proteinprobe (5 µl) in Wells einer 96-Well-Platte wurde 250 µl Bradford-Lösung zugesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte über 10 min abgedunkelt bei RT. Als Leerprobe dienten 250 µl Bradford-Lösung mit 5 µl Puffer. Alle Proben wurden doppelt bestimmt. Die Absorption des entstandenen Proteinkomplexes wurde bei 595 nm im Microplate Reader bestimmt.

3.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer	Zusammensetzung
3facher Gelpuffer	3 M Tris 0,3 % (w/v) SDS
Trenngel	10 ml 3facher Gel-Puffer 7,5 ml Acrylamid 40 % (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1) 4 g Glycerol 10,4 ml Millipore® Wasser
Sammelgel	3,1 ml 3facher Gel-Puffer 1,2 ml Acrylamid 40 % (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1) 8,2 ml Millipore® Wasser
Kathodenpuffer	0,1 M Tris 0,1 M Tricin 0,1 % (w/v) SDS (pH 8,2)
Anodenpuffer	0,2 M Tris (pH 8,9)

Die Proteine wurden gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt. Tris-Glycin-Gele wurden nach dem Laemmli-System hergestellt¹⁵⁰. Nach Ansetzen der Trenngel-Lösung erfolgte die Polymerisierung zu einem Gel durch radikalische Polymerisation nach Zugabe von 50 µl 10 % (v/v) APS und 5 µl TEMED pro 5 ml Trenngel. Die Gele wurden in der vertikalen Gelapparatur zu 2/3 der Glaskammer mit dieser Lösung gefüllt und sofort mit 100 %igem Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Ethanol entfernt und 3,5 ml Sammelgelpuffer, ebenfalls mit 50 µl 10 % (v/v) APS und 5 µl TEMED versetzt, auf das Trenngel bis zum Rand der Glaskammer gefüllt. Der Probenkamm wurde luftblasenfrei eingesetzt. Nach dem Polymerisieren wurden die Proteinproben mit reduzierendem SDS-Probenpuffer (Rothi-Puffer) 1:4 (v/v) versetzt und 5 – 10 min bei 95 °C vollständig denaturiert. Anschließend folgte die elektrophoretische Trennung zunächst für 25 min bei 25 Volt im Sammelgel und folgend im Trenngel bei 120 Volt für 1 h. Der hochmolekulare von-Willebrand-Faktor wurde auf kommerziell erworbenen NuPAGE® Novex 4 - 12 % Bis-Tris-Gradienten Gelen (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben mit den zugehörigen Puffern und der vertikalen Gelapparatur XCell SureLock™ Mini-Cell elektrophoretisch getrennt.

3.2.1.3 Färben und Entfärben von SDS Gelen

Puffer	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R250
	10 % (v/v) Essigsäure
	40 % (v/v) Methanol

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die SDS-Gele in ca. 40 ml Coomassie-Färbelösung für 1 - 2 h mit 100 rpm inkubiert. Folgend wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung getauscht und alle 20 – 30 min gewechselt, bis die proteinfreien Bereiche entfärbt waren. Danach wurden die Gele fotografiert und auf Whatman-Papier unter Vakuum bei 50 °C für mindestens 2 h getrocknet. Die Nachweisgrenze lag für diese Färbemethode bei ca. 0,5 µg Protein.

3.2.1.4 Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Blocking-Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver 1 % (w/v) PEG 3.350 1 % (w/v) PVP 10.000 in TBS-Tween-Puffer
Transferpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,01 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
TBS-Tween-Puffer	20 mM Tris 500 mM NaCl 0,2 % (v/v) Tween 20

Der Western Blot erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch. Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine über ein elektrisches Feld aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert^{151,152}. Nach Adsorption über ionische und polare Wechselwirkungen der Antigene werden sie mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Visualisiert wird diese Reaktion mittels einer konjugierten Peroxidase am sekundären Antikörper. Sie katalysiert die Oxidation von Luminol, welches durch den Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand Licht bei einer Wellenlänge von 400 - 700 nm emittiert.

Die unterschiedlich konzentrierten SDS-Gele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung für den *Wet*-Transfer mit einer Nitrozellulose-Membran von BioRad (Hercules, USA) in eine Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad (Hercules, USA) nach Herstellerangaben eingebaut. Der Transfer des von-Willebrand-Faktors wurde 5 h bei 0,3 A mit 200 V und bei 4°C durchgeführt. Um die Temperatur in der Kammer niedrig zu halten, wurde das eingesetzte Kühlelement alle 3 h gewechselt. Bei allen kleineren Proteinen reichte eine Transferdauer von nur 1 - 1,5 h bei gleicher Stromstärke. Als Transferpuffer wurde entweder der kommerziell erworbene NuPAGE® Transferpuffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 10 % (v/v) Methanol verwendet oder für selbsthergestellte Gele der Transferpuffer. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zweimal für 5 min mit Coomassie-Entfärbelösung gewaschen, danach mit fließendem Reinstwasser abgespült und einmal für 5 min mit TBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 20 ml *Blocking*-Lösung geschwenkt, um alle unspezifischen Bindungen an die Membran zu blockieren. Danach folgte die

Inkubation mit den primären Antikörpern (Serum 1:200 bzw. kommerziell erworbene Antikörper 1:1000 in *Blocking*-Lösung verdünnt) für 2 h bei RT unter Schwenken. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde 5-mal für 5 min mit TTBS gewaschen. Zur Visualisierung der gebundenen Primärantikörper wurde die Membran in einer Lösung mit Sekundärantikörpern mit konjugierter *Horseradish Peroxidase* (HRP; 1:15.000 verdünnt) für 2 h inkubiert und anschließend, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Für die enzymatische Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch aus *Stable Peroxid* und Luminol-Lösung aus dem *Supersignal West Dura Extended Duration Substrate Kit* (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit 10 µl/cm² für 5 min inkubiert. Die Chemilumineszenz-Signale reichten aus, um Röntgenfilme (GE Healthcare, München, Deutschland) zu belichten. Nach entsprechender Expositionszeit (10 s bis 12 h) wurden diese entwickelt und das Ergebnis analysiert. Alternativ wurde die Lichtemission auch mit dem *2D Advanced Proteomic Imager* (Intas, Göttingen, Deutschland) für 10 min aufgenommen und dokumentiert. Die Nachweisgrenze des Western Blots lag bei ca. 1 ng Protein.

3.2.1.5 Ponceau S Färbung

Puffer	Zusammensetzung
Ponceau-S-Lösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure

Der Farbstoff Ponceau S färbt Proteine temporär, da er reversibel an positiv geladene Strukturen bindet und somit von der Nitrozellulose-Membran abgewaschen werden kann. Diese Färbung dient der Überprüfung des Proteintransfers von dem SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran^{153,154}. Da der Western Blot viele Einzelschritte beinhaltet, war es hilfreich, den Transfer der Proteine auf die Membran zu visualisieren und ihn somit zu beurteilen. Dafür wurden die Nitrozellulose-Membranen zweimal für 5 min mit Entfärbelösung gewaschen, anschließend unter fließendem Reinstwasser ausgespült und für 10 min in Ponceau-S-Färbelösung geschwenkt. Zur weiteren immunologischen Analyse wurde der Farbstoff mit Reinstwasser abgespült und die Nitrozellulose-Membran mit dem Primärantikörper inkubiert.

3.2.1.6 Antikörperisolierung aus humanem Serum oder Plasma

Puffer	Zusammensetzung
Elutionspuffer	100 mM Glycin pH 2,8
Ethanolaminpuffer	200 mM Ethanolamin 50 mM Glycin 1 % (v/v) Tween 20 pH 10,5
Neutralisationspuffer	1 M Tris pH 8,5
PBS-Puffer (Thermo Fischer)	100 mM Phosphat 150 mM NaCl pH 7,4

Protein A ist ein Oberflächenprotein aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*. Es bindet mit hoher Affinität viele Antikörper-Subtypen, insbesondere humane IgG₁, IgG₂, IgM, IgA und IgE Antikörper¹⁵⁵. Die Erkennungssequenz für Protein A ist am F_c-Teil des Antikörpers lokalisiert. Diese Funktion wird biotechnologisch genutzt, um Immunglobuline aus Proteingemischen, wie Zellkulturen oder Blut, zu isolieren. Um zusätzlich die Subtypen IgG₃ zu binden, wird Protein G aus *Staphylococcus aureus* mit Protein A fusioniert. Beide Proteine besitzen eine albuminbindende Domäne, die nicht im rekombinanten Fusionsprotein enthalten ist, um die Spezifität zu erhöhen. Das Protein-A/G-Konstrukt wird kovalent an Sepharose gebunden und als Zentrifugationssäule verwendet, um chromatographisch Immunglobuline zu isolieren.

Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit anderen Plasmaproteinen an der Sepharose wurden die Säulen über Nacht mit Ethanolaminpuffer bei 4°C invertiert und vor Benutzung 3-mal mit PBS-Puffer äquilibriert. Danach wurden je nach Weiterverwendung 50 µl oder 100 µl Plasma auf eine 0,2 ml Protein A/G Säule aufgetragen und für 10 min inkubiert. Für kinetische Messungen wurden 100 µl Plasma und für die Antikörper-Detektion 50 µl verwendet. Nach 3 Waschschritten mit je 400 µl PBS-Puffer und einem dazwischen liegenden Zentrifugationsschritt (bei 1.000 g) wurden die gebundenen Antikörper isoliert. Dazu wurde 3-mal mit je 400 µl Elutionspuffer eine pH-Verschiebung in den neutralen Bereich erzielt. Die isolierten Immunglobuline lösten sich vom Protein A/G und wurden in 40 µl Neutralisationspuffer aufgefangen. Alle 3 Fraktionen wurden vereint und in Laufpuffer mittels 30 kDa Microcon Zentrifugationssäule (Millipore, Darmstadt, Deutschland) für 4-mal 5 min bei 13.000 g umgepuffert. Für die weitere Anwendung wurden sie auf ein Volumen von

300 µl (Antikörperdetektion) oder 400 µl (kinetische Messungen) aufgefüllt. Diese isolierten Antikörper wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C für maximal 36 h gelagert. Mittels der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford¹⁴⁹ (Kap.3.2.1.1) wurde die Chromatographie überprüft.

3.2.1.7 Spezifische FVIII-Antikörperisolierung aus Antikörper-Pool

Puffer	Zusammensetzung
HEPES-Puffer ohne Tween 80	10 mM HEPES 300 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ pH 6,9
Immobilisierungspuffer	3 mM HEPES pH 6,0

Bei einer immunologischen Antwort gegen den FVIII ist nur jeder 1.000 - 10.000-te Antikörper im humanen Serum spezifisch gegen das Antigen¹⁵⁶. Bei einer sehr geringen Proteindichte auf einem SPR-Chip könnte es vorkommen, dass kein spezifischer Antikörper immobilisiert wird. Deswegen erschien es zielführender, nur die spezifischen Antikörper zu immobilisieren. Das ließ sich mit einer FVIII-Chromatographie erreichen. Dafür wurde eine kommerziell erworbene, NHS-aktivierte Sepharose-Säule (Thermo Scientific, Carlsbad, USA) mit 400 µl Kogenate®-1:1 in HEPES-Puffer ohne Tween 80 für 1 h invertiert und anschließend einmal bei 1.000 g trocken zentrifugiert. 400 µl der zuvor isolierten Antikörper wurden auf eine FVIII-Säule gegeben und diese für 2 h bei RT invertiert. Nach zwei Waschschrritten mit HEPES-Puffer (je 1 min bei 1.000 g) erfolgte die Elution der spezifischen FVIII-Antikörper in zwei Schritten mit je 400 µl Elutionspuffer für 1 min bei 1.000 g. Die Fraktionen wurden in je 40 µl Neutralisationspuffer aufgefangen und zusammengefügt. Um die Ionenstärke im Puffer der FVIII-Antikörper zu minimieren, was für die Immobilisierung essentiell war, wurden mit Hilfe einer 30 kDa Microcon Zentrifugationssäule die IgGs 7-mal für 5 min bei 13.000 g in 3 mM HEPES-Puffer überführt. Um die Konzentration immer gleich zu halten, wurde das Volumen auf 120 µl mit den Microcon Zentrifugationssäule reduziert. Diese Antikörper wurden unverzüglich auf der CMD-Oberfläche mittels EDC/NHS Kopplungschemie immobilisiert (Kap.3.2.2.2).

3.2.2 Bindungsstudien und Biosensorik

3.2.2.1 Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA) zur anti-FVIII-Detektion in Plasma und Serum

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	2,6 mM KCl 138 mM NaCl 10 mM HNa ₂ PO ₄ x2H ₂ O 1,8 mM H ₂ KPO ₄ pH 7,4
PBS-Puffer-Tween 20 (PBST)	2,6 mM KCl 138 mM NaCl 10 mM HNa ₂ PO ₄ x2H ₂ O 1,8 mM H ₂ KPO ₄ 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 7,4
PBST-BSA-Puffer	3 % (w/v) BSA in PBST-Puffer
PBST-Magermilchpuffer	3 % (w/v) Magermilchpulver in PBST-Puffer
Schwefelsäure	2 M Schwefelsäure

FVIII-Antigene	Konzentration
Advate [®] rekombinanter FL-FVIII (Baxter)	10 UI/ml
BDD-FVIII rekombinant (Cedarlane)	10 UI/ml
Haemate [®] plasmatisch (CSL Behring)	10 UI/ml
FL-FVIII plasmatisch (Cedarlane)	10 UI/ml

Der ELISA^{157,158} ist ebenfalls ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine, wobei das zu bestimmende Antigen im Unterschied zum Western Blot auf einer Polystyren-Platte über hydrophobe, also nichtkovalente, Wechselwirkungen immobilisiert wird. Werden beide Methoden verglichen, fehlt die Möglichkeit der Proteinauftrennung beim ELISA. Er hat aber den Vorteil, dass er auf einer 96-Well-Platte durchführbar ist, so viele gleichzeitige Analysen ermöglicht. Es gibt zwei Arten dieses Assays. Zum einen kann das sogenannte „Sandwich-Prinzip“ verwendet werden, bei dem ein *Capture*-Antikörper auf der Oberfläche präsentiert wird, an dem wiederum das Antigen

bindet (*Sandwich*-ELISA). Dieser Ansatz wird oft gewählt, wenn die direkte Adsorption an das Plastik zu einer Denaturierung des Proteins führt. Zum anderen kann das Antigen auch direkt an die Oberfläche gebunden werden (Antikörper-ELISA). Nach einem Blockierungsschritt, der unspezifische Bindungen an die Plastikplatte verhindern soll, werden die antikörperhaltigen Proben in die Vertiefungen (engl. *wells*) gegeben. Der spezifische Primärantikörper bindet an das Antigen. Beim *Sandwich-Assay* ist zu beachten, dass die Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen müssen und sich sterisch nicht behindern dürfen. Visualisiert wird diese Bindung mit einem konjugierten Sekundärantikörper, an dem entweder das Enzym Peroxidase oder eine Alkalische Phosphatase gebunden vorliegt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrates, was durch Wasserstoffperoxid ausgelöst wird. Das emittierte Licht kann photometrisch analysiert werden. Die Detektionsgrenze ist abhängig vom Substrat und liegt zwischen 10 ng/ml für para-Nitrophenylphosphat (PNPP) und 2 pg/ml bei Ultra 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB).

Der ELISA wurde verwendet, um das geeignete FVIII-Antigen für die Biacore®-Chip-Immobilisierung zu identifizieren. Dafür wurden je 200 µl von vier verschiedenen FVIII-Proteinen (Advate®, Haemate®, BDD-FVIII und ein plasmatischer FL-FVIII) für 2 h bei 37 °C auf einer Maxi-Sorp®-96-Well-Platte immobilisiert und anschließend 3-mal mit 300 µl PBST gewaschen. Um freie Stellen auf der Platte zu blocken, wurde mit 200 µl PBST-Magermilch bei 37 °C für erneute 2 h inkubiert. Nach dem folgenden Waschschrift diente 1:10 verdünntes Patientenserum in PBST-Magermilch als primärer Antikörper. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation über 2 h bei 37 °C. Zum Nachweis der Bindung der humanen Antikörper an das Antigen wurde die Lösung mit 100 µl anti-Human-IgG (1:5000 in PBS-Puffer verdünnt) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Farbreaktion wurden 100 µl TMB-Substrat für 30 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 100 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die photometrische Quantifizierung erfolgte bei 450 nm im ELx808 Absorbance Microplate Reader.

3.2.2.2 Messungen am Biacore® X

Puffer	Zusammensetzung
Abspalllösung 1	70 mM NaOH 1 M NaCl
Abspalllösung 2	10 mM NaOH 1 M NaCl
HEPES-Laufpuffer	10 mM HEPES 300 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,5 % (v/v) Tween 80 pH 6,9

Biacore® ist eine SPR-basierte Biosensor-Technologie und visualisiert in Echtzeit und markierungsfrei die Interaktion von immobilisiertem Ligand und gelöstem Analyten¹⁵⁹. Aufgrund der kovalenten Bindung des Antigens ist der Chip nach optimierter Regenerierung der Oberfläche wiederverwendbar und für viele Messungen stabil. Die FVIII-Antikörper-Detektionsmessungen wurden mit HEPES-Puffer als Lauf- und Verdünnungspuffer durchgeführt. Alle Messungen erfolgten am Biacore® X (GE Healthcare, München, Deutschland) bei einer Temperatur von 25 °C und einer Flussrate von 10 µl/min, falls nicht anderes angegeben. Alle Puffer wurden steril filtriert und mittels Helium entgast. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 45 µl mit einem 300 sec *Delay*. Um die gebundenen Antikörper vom Antigen zu entfernen, wurden 1 – 10 µl Abspalllösung 1 verwendet, bis die Basislinie wieder ± 5 RU betrug. Die optimierte Kombination aus Laufpuffer und Abspalllösung erlaubten bis zu 70 Wiederholungen. 1-3 µl Abspalllösung 2 wurde für die kinetischen Messungen, sowie für den biomimetischen Chip nach Anbindung von FIX bzw. FXa verwendet.

3.2.2.2.1 Herstellung der self-assembling-monolayer (SAM)-Oberfläche und Immobilisierung der Proteine

Puffer	Zusammensetzung
Abspaltlösung 3	50 mM NaOH 1 M NaCl
Abspaltlösung 4	10 mM Glycin 1 % (v/v) Triton X 100 pH 12,1
EDC-NHS-Aktivierungslösung	0,5 M NHS 0,2 M EDC
Ethanolamin	1 M Ethanolamin pH 8,5
SAM-Lösung	
SAM-OH⁻-Lösung	10 mM 11-Mercapto-1-undecanol
SAM-H⁺-Lösung	10 mM 11-Mercaptoundecansäure
SAM-NH₂-Lösung	10 mM 11-Amino-1-undecanethiol in 100 % Ethanol

Langkettige Alkanthiole absorbieren spontan aus einer Lösung oder aus der Gasphase auf eine Gold-Oberfläche¹⁶⁰. Daraus resultiert eine selbstorganisierende, monomolekulare Schicht (engl.: "self-assembled monolayer", SAM). Dieser Prozess wird als ein zweistufiger Vorgang aufgefasst. Zuerst liegen die Alkanketten parallel zur Oberfläche. Sobald die ganze Oberfläche belegt ist, beginnt der zweite Teil der Reaktion. Die Ketten richten sich nun vertikal zur Oberfläche auf und bilden eine dicht gepackte Phase (Abbildung 19). Die Bindung zwischen Gold und Schwefel wird mit der Entstehung einer Thiolatbindung erklärt. Die Wahl der Endgruppe in der Thiol-Struktur ermöglicht dabei eine Funktionalisierung der Oberfläche und somit die kovalente Bindung der Proteine.

Die SAM-Oberfläche auf dem Goldchip wurde selbst hergestellt. Dafür wurde ein Volumen von 300 µl SAM-OH⁻-Lösung 1, 600 µl SAM-H⁺-Lösung 2 und 100 µl SAM-NH₂ mit 9 ml 100 % Ethanol gemischt. Der Goldchip wurde mit Hilfe einer Klemme komplett in die Lösung eingetaucht und über Nacht abgedunkelt bei 100 rpm inkubiert, sodass die Reaktion genug Zeit hatte, um die SAM auszubilden. Am folgenden Tag wurde der Chip mit Ethanol (100 % (v/v)) gespült und mit Argon fusselfrei getrocknet. Für die Biacore® Messungen wurde der Goldchip anschließend mittels beigefügtem Trägermaterial auf einen Plastikträger geklebt und in das Gerät eingebaut.

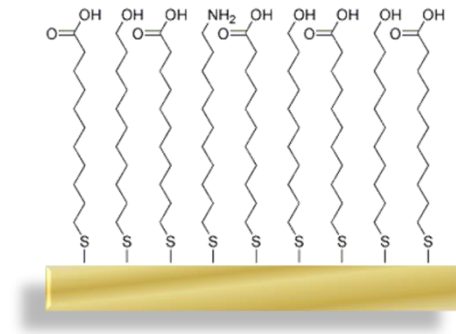


Abbildung 19: *Self assembling monolayer* auf einem Goldchip¹⁶¹.

Die Immobilisierung geschah *online* bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Als Lauf- sowie Immobilisierungspuffer wurde HEPES-Puffer verwendet. Um alle nichtkovalent gebundenen Alkanketten zu entfernen, wurde die Oberfläche zuerst gereinigt. Dafür wurden im Wechsel 3-mal 10 μl Abspaltlösung 3 und 2-mal 10 μl Abspaltlösung 4 injiziert. Der Biacore® X hat zwei Flusszellen, um die unspezifischen Reaktionen und die Brechungsindex-Unterschiede zwischen Puffer und Probe von den spezifischen Interaktionen zu subtrahieren. Die Zellen werden als Referenz- und Messzelle bezeichnet. Für die Kopplung der Proteine an der Oberfläche wurden die Zellen einzeln angesteuert. Begonnen wurde immer mit der Referenzzelle. Mit 50 μl EDC/NHS-Lösung und 30 sec *Delay* wurde injiziert, um die Carboxylgruppen in Aktivester umzufunktionalisieren. Anschließend wurde je nach Versuchsaufbau entweder 1 mg/ml BSA (in Immobilisierungspuffer) für 5 min injiziert oder die aktivierten Ester sofort mit 50 μl Ethanolamin und 100 sec *Delay* geblockt. Die Messzelle wurde mit 50 μl EDC/NHS aktiviert und mit 100 μl FVIII (550 IU/ml) übergespült. Um eine dichter gepackte Oberfläche zu gewährleisten, wurde 10 min Laufpuffer über die Messzelle gespült, um alle Kopplungen abzuschließen und erst danach 50 μl Ethanolamin mit 100 sec *Delay* zum Entfernen der Aktivester injiziert. Nach der Kopplung der Proteine an die Oberfläche wurde der Laufpuffer für mindestens 1 h bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ zum Äquilibrieren durch beide Zellen laufen gelassen.

3.2.2.2.2 Immobilisierung der FVIII-Proteine auf der Polycarboxylat-HC 1500 nm- und HC 1000 nm-Oberfläche inklusive Messungen

Puffer	Zusammensetzung
EDC-NHS-Aktivierungslösung	0,5 M NHS 0,2 M EDC
Elutionspuffer	0,1 mM Borax 1 M NaCl pH 9,0
Ethanolamin	1 M Ethanolamin pH 8,5
Immobilisierungspuffer	5 mM Essigsäure pH 5 (für BSA) 5 mM Essigsäure pH 4,5 (für BDD-FVIII)

Für die FVIII-Antikörper-Detektion wurde ein Hydrogelchip verwendet, da dieser aufgrund der vielen Carboxylgruppen eine sehr hohe Immobilisierungsdichte ermöglicht. Gleichzeitig zeigt er wenig unspezifische Bindungen mit anderen Proteinen an der Oberfläche¹⁴¹. In der vorliegenden Arbeit wurde der HC 1500 nm- und der HC 1000 nm-Chip mit jeweils unterschiedlich langen Polycarboxylatketten (Abbildung 20) verwendet. Beide Oberflächen gewährleisteten eine Beladung von bis zu 20.000 RU für den *full-length* FVIII und 13.000 RU für den *B-domain-deleted* FVIII. Für alle dreidimensionalen (3D) Oberflächen, an denen mehrere Proteine pro Molekülkette immobilisiert werden konnten, wurde entgastes Millipore®-Wasser als Laufpuffer verwendet, um die Ionenstärke für die Immobilisierung so gering wie möglich zu halten. Als Vorbereitung für die Aktivierung wurde je 3-mal 30 µl Elutionspuffer mit *Normal-Delay* (50 sec) injiziert und anschließend 50 µl einer 1:1 Mischung aus EDC/NHS mit 30 sec *Delay* für die Bildung der Aktivester. Auch bei der Hydrogel-Oberfläche wurden Chips mit und ohne BSA in der Referenzzelle hergestellt. Das heißt, es wurden die Aktivester produziert, die entweder sofort mit 50 µl Ethanolamin oder erst nach Injektion von 50 µl BSA (in Immobilisierungspuffer) abreagiert wurden. Die Messzelle wurde ebenfalls mit einer 3-maligen Elutionspuffer-Injektion vorbehandelt und wie zuvor beschrieben aktiviert. 500 IU/ml FL-FVIII wurde unverdünnt mit 3-mal 100 µl injiziert. Im Gegensatz dazu wurde der 100 IU/ml BDD-FVIII 1:4 (v/v) in Immobilisierungspuffer verdünnt, um die Immobilisierungsrate signifikant zu erhöhen. Ebenfalls wurde hier die Bindung stabilisiert, indem 10 min Millipore®-Wasser durch die Messzelle gespült und danach mit 50 µl Ethanolamin abreagiert wurde. Um eine solide Basislinie zu erhalten,

wurden beide Zellen für mindestens 1 h mit Laufpuffer gespült. Auf dem Polycarboxylat-Chip wurde auch der biomimetrische Assay etabliert. Hierfür wurde nur der FL-FVIII von Kogenate® wie zuvor beschrieben immobilisiert. Um die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper zu beobachten, wurden 45 µL der isolierten Antikörper injiziert (*normal Delay*) und anschließend 45 µL FIX oder FXa mit 300 sec *Delay* (Abbildung 20). Die Abspaltung erfolgte hier mit 1 – 3 µL 10 mM NaOH und 1 M NaCl. Der biomimetische Chip wurde für ca. 10 – 15 Messungen wiederverwendet.

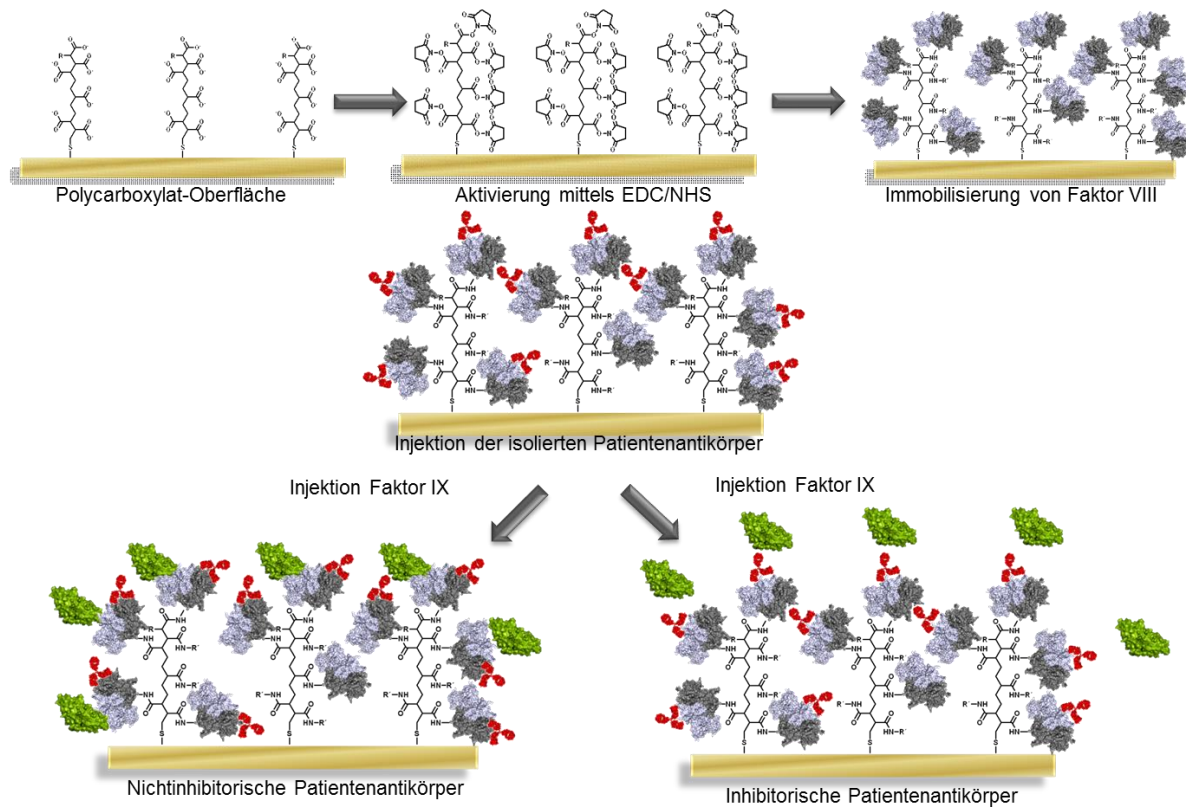


Abbildung 20: Übersicht der Immobilisierung des FVIII an die Polycarboxylat-Oberfläche mit darauffolgender Injektion der isolierten Patientenantikörper. Für den biomimetischen Assay wird der Vorgang mit einer Injektion von FIX erweitert.

3.2.2.2.3 Immobilisierung der FVIII-Antikörper auf der Carboxymethyldextran-CMD 50 nm-Oberfläche und kinetische Messungen

Puffer	Zusammensetzung
Abspatlösung 1	70 mM NaOH
	1 M NaCl
Abspatlösung 2	10 mM NaOH
	1 M NaCl
HEPES-Laufpuffer	10 mM HEPES
	300 mM NaCl
	5 mM CaCl ₂
	0,5 % (v/v) Tween 80
	pH 6,9

Die Messungen zur Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten wurden mit HEPES-Puffer durchgeführt. Alle Messungen wurden bei 30 µl/min durchgeführt, da eine hohe Flussrate für kinetische Messungen entscheidend war. Liegt eine schnelle Assoziation vor, kann der Massentransport zum Liganden zum limitierenden Faktor für die Bindung werden. Ein weiteres Problem ist das sogenannte *Rebinding* in der Dissoziationsphase. Das heißt, ein erneutes Binden des freigesetzten Analyten während der Dissoziationsphase an den immobilisierten Liganden erbringt falsche Ergebnisse. Mit einer geringen Oberflächendichte und einer hohen Flussrate kann dieser Effekt reduziert werden¹⁶². Aufgrund der hohen Flussrate bei den kinetischen Messungen war das Injektionsvolumen so hoch wie möglich. Beim Biacore® X waren das 100 µl und die Dissoziationsphase betrug 600 sec. Der FVIII wurde mit 1 – 3 µl Abspatlösung 2 restlos entfernt. Der Chip blieb für mindestens 20 Messungen stabil.

Der SPR-Biosensor erlaubte Aussagen zur Assoziation und Dissoziation über den Antigen-Antikörper-Komplex. Dafür musste die Konzentration des Analyten bekannt sein und die Assay-Bedingungen in Bezug auf Immobilisierung, Flussrate und Abspaltbedingungen optimiert werden. Für alle kinetischen Messungen wurde eine Carboxymethyldextran-Oberfläche verwendet. Das hatte folgende Vorteile: Zum einen war die Immobilisierungsdichte geringer, da weniger Carboxylgruppen am Dextran gebunden waren als an der Polycarboxylat-Oberfläche. Bei kinetischen Messungen ist eine schwach beladene Oberfläche essentiell, da eine Sättigung mit dem Analyten für die Auswertung der Daten notwendig ist¹³⁶. Deswegen wurde entweder eine sehr niedrig konzentrierte Liganden-Lösung

eingesetzt oder diese Lösung mit Ethanolamin oder einer anderen Aminverbindung versetzt, um potentielle Bindungspartner abzublocken.

Die ersten Schritte der Immobilisierung (bis zur Aktivierung der Carboxylgruppen) wurden wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Referenzzelle wurde jedoch nicht mit BSA beladen, sondern nur mit Ethanolamin abreagiert. Nach der Aktivierung der Messzelle wurde die Flussrate auf 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert, um die Immobilisierung genau beobachten zu können, damit nicht zu viele Antikörper banden. Die zuvor isolierten FVIII-Antikörper wurden in einem Volumen von 30 μl injiziert und der Vorgang bei ca. 700 RU gestoppt. Um die Kopplung abschließen zu können, wurde für 10- 15 min Millipore®-Wasser über die Zelle gespült und diese dann mit 50 μl Ethanolamin (bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) geblockt. Nach der Sättigung waren ca. 300 - 400 RU Protein auf der Oberfläche immobilisiert. Die kinetischen Analysen wurden bei 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt, weshalb auch mit dieser Flussrate für mindestens 1 h äquilibriert wurde. Der FVIII wurde auf eine Konzentration von 30 nM - 1 nM verdünnt und 100 μl wurden injiziert. Der Chip konnte für ca. 20 weitere Messungen verwendet werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Zur Verbesserung der Faktor-VIII-Antikörper-Detektion und der Qualität der aktuellen Hämophilie-Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit das Ziel verfolgt, eine alternative Methode zu dem bestehenden Bethesda-Assay zu etablieren. Der Bethesda-Assay wurde 1973 entwickelt und gibt als funktionaler Test eine Endpunktbestimmung der Inhibierung des FVIII an¹³. Für die Durchführung des Bethesda-Assays wird einer Verdünnungsreihe des Patientenplasmas eine FVIII-Quelle zugesetzt und nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C der FVIII-Restgehalt bestimmt. Dieser wird auf den FVIII-Gehalt einer mitgeführten FVIII-haltigen Kontrollmischung bezogen und in Prozent angegeben. Eine Bethesda-Einheit entspricht einer Inhibitormenge, die die FVIII-Aktivität halbiert¹³.

Mit dem neu entwickelten Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensor sollten die FVIII-Antikörper spezifisch, reproduzierbar und sensitiv nachgewiesen werden. Eine grundlegende Voraussetzung war die Etablierung einer geeigneten Methode zur Immobilisierung der FVIII-Präparate direkt auf die Sensoroberfläche. Dies sollte zudem unter gleichzeitigem Erhalt der Antigenität und unter Gewährleistung optimaler Zugänglichkeit des Proteins erfolgen. Darüber hinaus sollte auch die Regenerierung des Biochips ohne signifikanten Verlust der Antigenität des FVIII möglich sein. Aufgrund dessen schied ein Biosensor-Konzept aus, bei dem auf der Oberfläche immobilisierte monoklonale Antikörper FVIII binden.

Weiterhin wurden isolierte Patientenantikörper immobilisiert und mit nachfolgender Zugabe des FVIII in Lösung zu exemplarischen kinetische Messungen generiert.

Die markierungsfreie SPR-Methode, deren Entwicklung und Etablierung in dieser Arbeit erforscht wurde, bot zudem einen analytischen Vorteil. Die Patientenantikörper konnten in Bezug auf ihre Affinität sowie der Epitop-Spezifität besser charakterisiert werden. Das hätte den Vorteil, dass auf diesem Weg bessere Medikamente entwickelt werden könnten.

Folgende Kriterien mussten berücksichtigt werden, um dieses SPR-Biosensor-Format valide zu etablieren:

- Optimale FVIII-Proteinimmobilisierung,
- Schonende Regenerierung unter Erhalt der FVIII-Antigenität,
- Sensitiver und spezifischer Nachweis der anti-FVIII-Antikörper in Patientenplasmen,
- Charakterisierung der anti-FVIII-Antikörper (inhibitorisch/nichtinhibitorisch).

Aus der Konsequenz der zu beachtenden Kriterien ergab sich die in Abbildung 21 dargestellte Gliederung der Arbeitseinheiten.

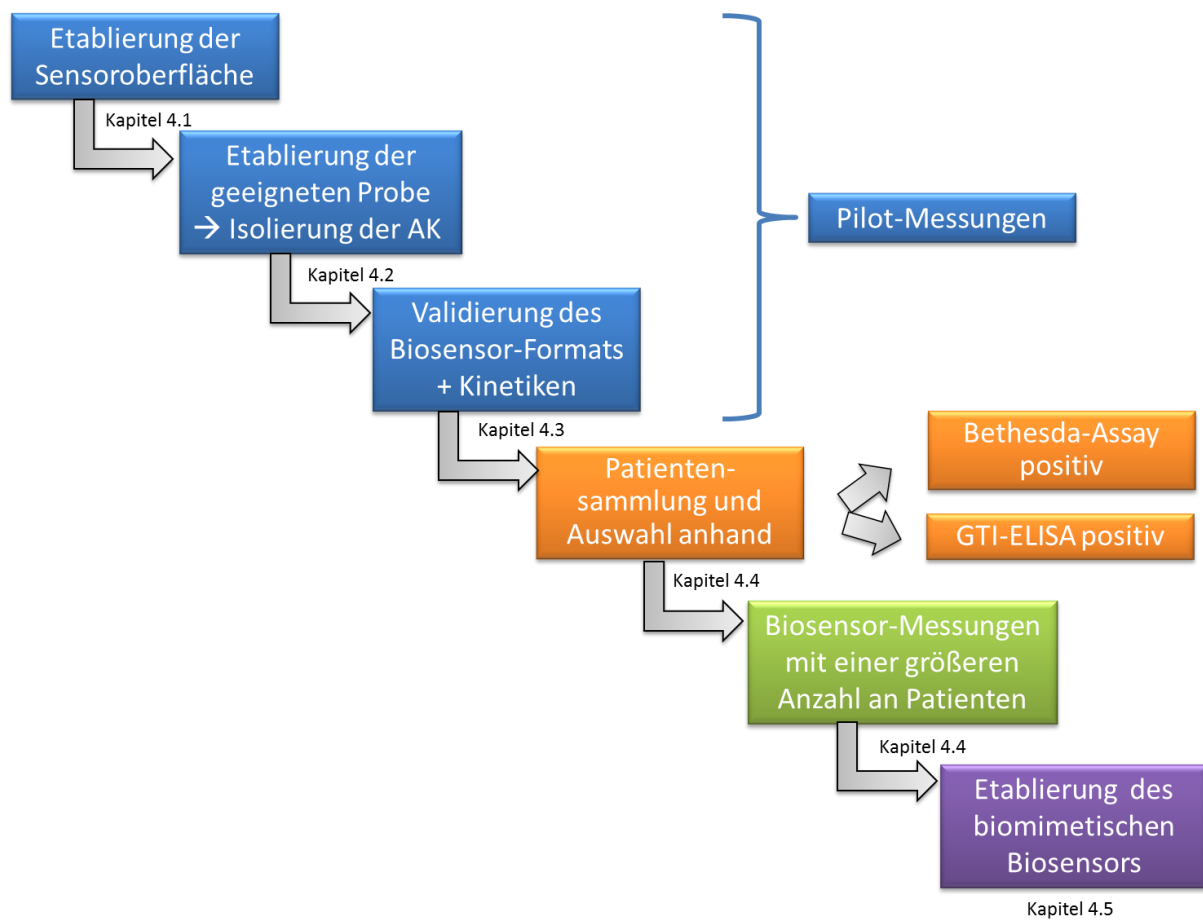


Abbildung 21: Gliederung der Arbeitseinheiten der vorliegenden Dissertation.

4.1 Pilot-Messungen: Entwicklung eines Biosensor-Bestimmungsformats zur Detektion und kinetischen Charakterisierung von FVIII-Inhibitoren

Die Entwicklung des Biosensors wurde mit einem Pilot-Kollektiv von 13 Patientenplasmen begonnen (siehe Tabelle 4 Kap.3.1.3).

Zuerst sollten optimale Bedingungen gefunden werden, um spezifisch humane FVIII-Antikörpern im Plasma nachzuweisen. In folgenden Experimenten sollten die Antikörper genauer charakterisiert werden.

4.1.1 Etablierung der FVIII-Oberfläche für die Detektion kommerzieller Faktor VIII-Antikörper

Alle Interaktionsmessungen wurden am Biacore® X durchgeführt (Kap.3.2.2.2). Die Eigenschaften der Sensoroberfläche haben einen großen Einfluss auf die Qualität der Messungen¹⁶³, sodass diese optimiert werden musste. Eine Vielzahl von modifizierten Oberflächen für die Immobilisierung des Liganden sind möglich¹⁴¹. Für jede Anwendung muss eine spezifische, optimale Oberfläche gewählt werden.

Die Schwierigkeit der Assay-Entwicklung lag zum einen in der Immobilisierung des Liganden und zum anderen in der Optimierung der Assay-Bedingungen, sodass nur eine spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper stattfand.

Um das System zu Beginn der Arbeit so übersichtlich und reproduzierbar wie möglich zu halten, wurden die Versuche mit kommerziellen, gereinigten Antikörpern durchgeführt. Dafür sollte der FVIII unter Erhalt der Antigenität kovalent auf einen Biosensorchip immobilisiert werden. Essentiell für eine effektive FVIII-Immobilisierung mit der klassischen Biacore® Kopplungschemie (Kap. 3.2.2.2) war, dass FVIII in einem aminfreien Puffer vorlag¹⁴⁴. Bei der Verwendung eines Tris-Puffers würden die primären Amine mit den Aktivestern reagieren und so die Immobilisierung des Proteins blockieren. Die Wahl fiel deswegen auf den rekombinanten *B-domain-deleted* (BDD) FVIII.

Wie beschrieben, steht dem Anwender eine Vielzahl verschiedener Sensoroberflächen zur Verfügung. Da für vergleichbare Anwendungen häufig eine Oberfläche aus methylcarboxyliertem Dextran verwendet wurde¹⁴¹, wurde deren Anwendung als erstes evaluiert.

Um eine erfolgreiche Immobilisierung des jeweiligen Protein-Liganden auf der schwammartigen Dextran-Oberfläche zu gewährleisten, musste der isoelektrische Punkt (iP) des Proteins höher als der pK_a-Wert der Oberfläche sein (Abbildung 22). Liegt der pH-Wert einer möglichst niedrig

konzentrierten Pufferlösung zwischen iP (Protein, hier: 4,5) und pK_a (Oberfläche, hier: 3,5), ermöglicht dies ein Eindringen des zu immobilisierenden Liganden in die Matrix auf Grund der gegensätzlichen Ladung¹⁴⁴. Ohne weitere Optimierung wurden bei den ersten Versuchen mit einem pH-Wert von 4,5 eine pH-basierte Denaturierung des Proteins beobachtet (Daten nicht gezeigt).

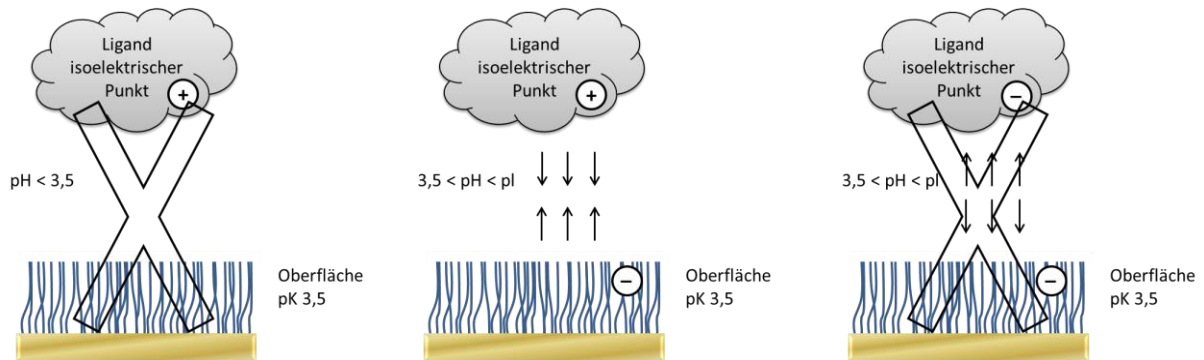


Abbildung 22: pH-Scouting für eine erfolgreiche Immobilisierung des Liganden auf einer dreidimensionalen Biosensor-Oberfläche (Abbildung nach Biacore Handbuch¹³⁸). Der isoelektrische Punkt des zu immobilisierenden Liganden (grau) muss über pK_a 3,5 liegen und die Oberfläche des Sensorchips (blau; pK_a 3,5) auf Grund des Puffers negativ geladen sein, damit der Ligand in die Matrix gezogen wird. Liegt der iP unter dem pK_a der Oberfläche, stoßen sie sich ab.

Um diese pH-Sensitivität der Messmethode zu umgehen, wurde die Immobilisierung des Liganden an einer selbstorganisierten Monoschicht (SAM)-Oberfläche (siehe Abbildung 19) untersucht¹⁶⁴. Bereits nach den ersten Versuchen konnte der Ligand auf der 2D-Oberfläche immobilisiert werden und erzielte ein Signal von 2.000 RU. Die Immobilisierungsdichte schwankte um $\pm 15\%$, da alle Schritte händisch durchgeführt wurden und die Oberflächenbeschichtung somit variierte (Daten nicht gezeigt). Die zwei eingesetzten anti-FVIII-Antikörper zeigten ein Bindungssignal an den kovalent immobilisierten FVIII. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich zwei verschiedene Antikörper eingesetzt, ein monoklonaler (mAK) und ein polyklonaler (pAK) (siehe Kap. 3.1.2). Der monoklonale Antikörper lag in einer Konzentration von 0,5 mg/ml vor, der polyklonale Antikörper hingegen mit 10 mg/ml, sodass dementsprechend unterschiedlich starke Assoziations-Signale beobachtet wurden (Abbildung 23). Bei gleicher Konzentration weisen der polyklonale und der monoklonale Antikörper gleich starke Signale auf (Daten nicht gezeigt).

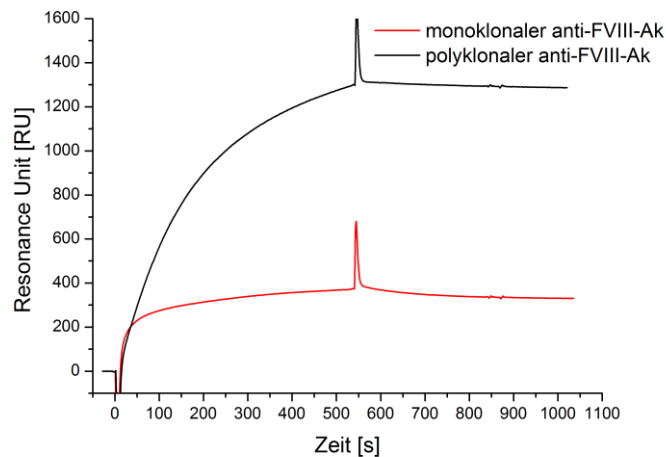


Abbildung 23: Biacore Sensorgramm: Anbindung des monoklonalen (5 ng/ml; rot) und polyklonalen (100 ng/ml; schwarz) anti-FVIII-Antikörpers auf einer SAM-Oberfläche mit 100 μ l kovalent immobilisierten BDD-FVIII. Injektion: Beide Antikörper wurden 1:100 in HEPES-Laufpuffer verdünnt, Flussrate: 10 μ l/min, 25 °C.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der BDD-FVIII unter Erhalt der Antigenität immobilisiert werden konnte, wurde eine Verdünnungsreihe des polyklonalen Antikörpers durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sich der Antikörper nicht komplett vom Antigen abspalten ließ. Dies ist sehr wahrscheinlich mit der hohen Affinität zwischen FVIII und anti-FVIII-Antikörper zu erklären.^{165,166} Da eines der Kriterien zur Etablierung des Assays die Wiederverwendbarkeit des Chips zur Kostenreduzierung war, wurde eine Optimierung der Regenerations- und der Laufmittelbedingungen durchgeführt.

4.1.2 Optimierung der Regenerations- und Laufmittelbedingungen

In einem validen SPR-Biosensor muss die Sensoroberfläche mit einer Regenerationslösung vollständig regeneriert werden können, um deren Ausgangszustand für weitere Messungen sicherzustellen. Dabei ist nicht nur die vollständige Entfernung des Analyten wichtig, sondern auch die Notwendigkeit dies ohne Beschädigung des Liganden zu realisieren. Andernfalls werden die Systemeigenschaften von Messung zu Messung verändert, und Ergebnisse sind nicht vergleichbar¹⁶⁷. Die meisten Proteine werden bei niedrigem pH-Wert teilweise entfaltet und positiv geladen. Dies führt bei einigen Proteinen dazu, dass die Bindungsstelle nicht mehr übereinstimmt und die Moleküle einander abstoßen¹⁶⁸. Unter derartigen Bedingungen kann keine reproduzierbare Messung gewährleistet werden. Deswegen wurden der Laufpuffer und die Abspaltung variiert. Beide haben großen Einfluss

auf die Stabilität des Antigens^{72,168,169}. Angefangen wurde mit der Untersuchung von 3 verschiedenen Laufpuffern (Kap.3.2.2.2) (Abbildung 24). Beobachtet wurde, ob PBS-Puffer oder HEPES-Puffer die Bindung zwischen FVIII und Antikörper verstärkt. Als dritter Puffer wurde *Blocking*-Puffer (PBS-Puffer mit 3 % BSA) untersucht, da dieser zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen standardmäßig bei vielen ELISAs eingesetzt wird¹⁷⁰.

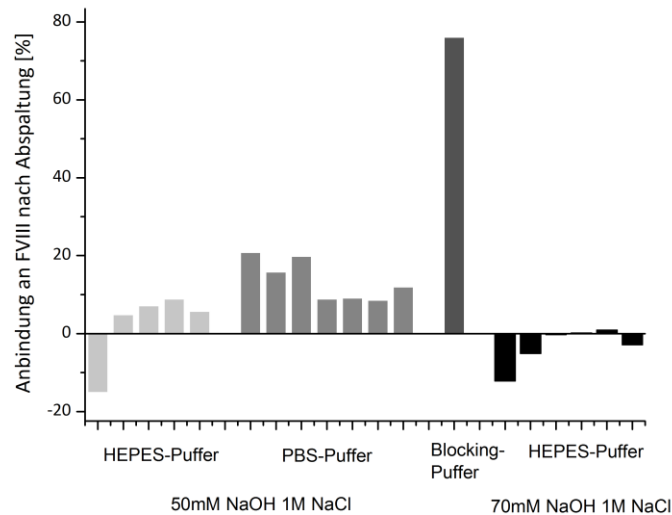


Abbildung 24: Optimierung der anti-FVIII-Antikörper-Regeneration: Anbindung des polyklonalen anti-FVIII-Ak an den immobilisierten BDD-FVIII (in Prozent) nach Einsatz verschiedener Puffer. Regeneration mit 10 µl Abspaltungslösung (entweder 50 mM NaOH, 1 M NaCl oder 70 mM NaOH, 1 M NaCl). Injiziert wurde der pAk 1:100 verdünnt in 3 verschiedenen Laufpuffern: HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4), PBS pH 7,4 und Blocking-Puffer (PBS-Puffer mit 3 % BSA). Flussrate: 10 µl/min, 25°C.

Im Vergleich der drei Laufpuffer zeigte sich die stärkste Anbindung zwischen dem pAk und dem FVIII bei der Verwendung von HEPES-Puffer. Der *Blocking*-Puffer mit 3 % BSA hatte die Bindung zwischen den Immunglobulinen und FVIII so verstärkt, dass sich fast gar kein Antikörper abspalten ließ (Abbildung 24). Albumin ist als Proteinstabilisator bekannt und kann Bindungen zwischen Proteinen verstärken. Ein weiteres Problem aufgrund der hohen Proteinkonzentration im Puffer ist die Stabilität der Basislinie. Das Albumin band auf der gesamten Chipoberfläche an, wurde je nach Regenerationslösung bei jedem Zyklus entfernt und lagerte sich während der Messung wieder langsam an. Das bedeutete, dass bei jeder Messung eine andere Chipoberfläche präsentiert wurde. Als effektivste Abspaltungslösung konnte 70 mM NaOH mit 1 M NaCl in Kombination mit HEPES-Puffer als Laufpuffer identifiziert werden (Abbildung 24– schwarze Balken).

Nachdem Bedingungen für eine gute Chipstabilität ermittelt worden waren, sollte humanes Plasma eingesetzt werden. Dazu wurde humanes Serum mit dem pAk versetzt, um damit Patientenplasma nachzuahmen. Serum und Plasma haben eine hohe Gesamtproteinkonzentration von 80-110 mg/ml¹⁵⁴. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob die Oberfläche spezifisch genug ist, um nur die FVIII-Antikörper-Anbindung zuzulassen. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe erstellt und die Assoziations-Werte gemessen (Abbildung 25).

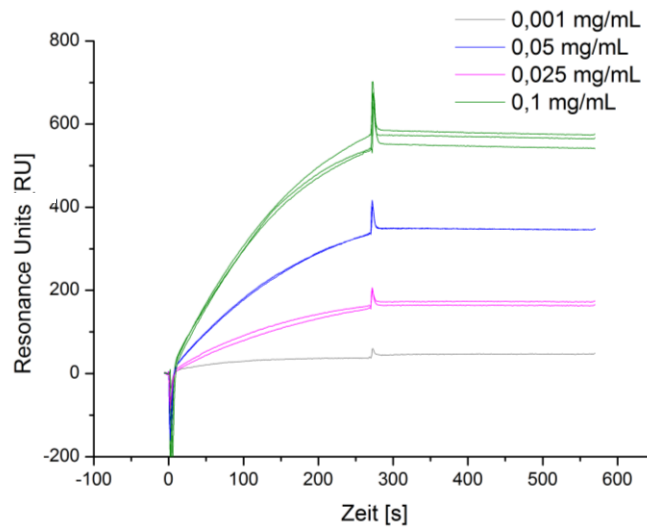


Abbildung 25: Anbindung des polyklonalen anti-FVIII-Antikörpers versetzt in gesundem, humanem Serum auf einer SAM-Oberfläche mit 100 µl kovalent immobilisierten BDD-FVIII. Injektion: 45 µl Serum 1:100 verdünnt in HEPES-Laufpuffer, versetzt mit pAk von 0,001-0,1 mg/ml. Messung in HEPES-Puffer, Flussrate: 10 µl/min, 25°C, n=2.

Mit Seren von gesunden Menschen konnte eine gute Reproduzierbarkeit in den Doppelbestimmungen beobachtet werden (Abbildung 25). Die Standardabweichung (SD) für 0,1 mg/ml pAk in humanen Serum betrug 13,3 RU, für 0,05 mg/ml nur 1,8 RU, und für 0,025 mg/ml 6,9 RU. Die hohe Reproduzierbarkeit und die Werte der Konzentrationsreihe sprachen für eine hohe Stabilität des Chips. Nachdem der kommerziell erwerbliche pAk in humanem Serum nachgewiesen werden konnte, sollte das System mit Patientenplasmen validiert werden.

4.1.3 Detektion humaner anti-FVIII-Antikörper in Serum auf der SAM-Oberfläche

Zur Untersuchung humaner Patientenplasmen mit der neu etablierten SPR-Methode wurden die ersten Messungen mit drei erworbenen Hemmkörperseren durchgeführt. Diese Patienten hatten

den Antikörper gegen ihren intrinsischen FVIII entwickelt. Somit gilt die Erkrankung als autoimmun und die Antikörper als Autoantikörper¹⁷¹. Im Gegensatz dazu gibt es Antikörper, die gegen das Medikament gerichtet sind, und, wie in der Transfusionsmedizin üblich, als Alloantikörper bezeichnet werden.

Die durchgeführten Serummessungen zeigten entgegen der Erwartung keine spezifische Anbindung der Autoantikörper an den immobilisierten FVIII. Die Anbindungssignale lagen zwischen 50 - 80 RU (Abbildung 26 – rote Kurven), was mit einer Anbindung ohne Antikörper vergleichbar ist (Abbildung 26 – blaue Kurven). Auch mit Hilfe anderer Puffer und verschiedener Flussraten (Daten nicht gezeigt) konnte keine spezifische Anbindung detektiert werden. Deswegen musste das System optimiert werden.

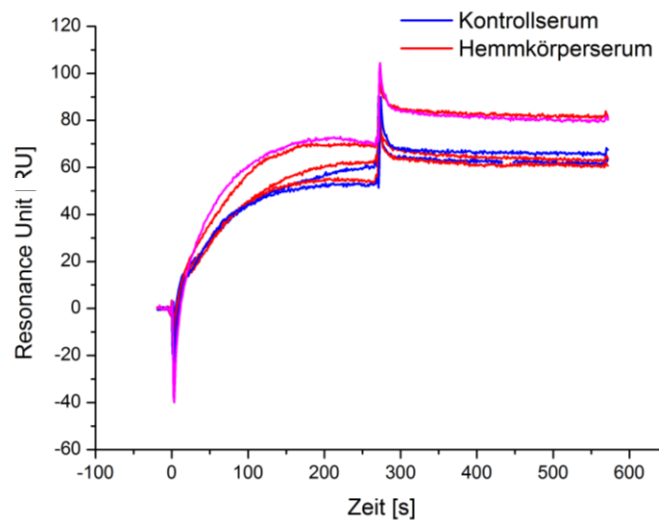


Abbildung 26: Anbindung der Hemmkörperserum auf einer SAM-Oberfläche mit 100 μ l kovalent immobilisierten BDD-FVIII. Injektion: je 45 μ l Patientenserum (rote Kurven) 1:100 in HEPES-Laufpuffer verdünnt. Kontrollserum (blau) 1:100, Patientenserum 1:10 verdünnt (pink), Flussrate: 10 μ l/min, 25°C.

Das Immobilisierungsvolumen und die Flussrate unterliegen beim Biacore® Limitierungen. Als Konsequenz daraus konnte der Antikörper nicht 2 h, wie beim Bethesda-Assay, inkubiert werden und bei einer 2D Oberfläche konnte nicht sehr viel Protein immobilisiert werden. Dies wiederum führte bei der SPR-Methode zu einem geringen Signal, was als mögliche Erklärung für die beobachteten falsch negativen Anbindungswerte (Abbildung 26) gewertet wurde. In der Literatur sind Konzentrationen des spezifischen FVIII-Antikörpers von 70-700 ng/ml je nach Inhibitorstärke beschrieben¹⁵⁶. Die 1:500 Verdünnung des pAk (10 mg/ml) entspräche einer Endkonzentration von 20 ng/ml. Würde das Serum nochmals 1:10 verdünnt, ergäben sich bei hochtitrigen Patientenplasmen eine Konzentration von

2,0 ng/ml. Das ist zu gering, um mit der in dieser Arbeit eingesetzten SAM-Oberfläche detektiert zu werden.

Zur Erhöhung der Aussagekraft der Detektion humaner anti-FVIII-Antikörper musste das System weiter optimiert werden. Dazu sollten die Proben mit einer sensitiveren Oberfläche untersucht werden (Kap. 4.1.6). Doch zunächst sollte die Antigen-Antikörper-Bindung besser visualisiert werden, um die Bindung zu validieren (Kap. 4.1.4 - 4.1.5). Eine etablierte Methode dafür ist der Western Blot.

4.1.4 Western Blot als alternativer Nachweis von von anti-FVIII-Ak und anti-vWF-Ak aus Serum

Als hochsensitive Methode zum Nachweis von Proteinen, so auch Antikörpern, gilt der Western Blot. Je nach Assay-Bedingungen hat er eine Nachweisgrenze von bis zu 60 fg Protein bzw. Antikörper¹⁷². Zudem können aus einem Proteingemisch einzelne Proteine gezielt nachgewiesen werden. Der Mehrgehalt gegenüber einem ELISA ist eine klare Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes durch die Auftrennung über eine Gelelektrophorese.

Um zu überprüfen, ob der humane Antikörper das Antigen erkennt (siehe Kap 4.1.3), wurde ein Western Blot mit anti-FVIII-Patientenserum, als sekundären Antikörpern durchgeführt (Kap. 3.2.1.4). Das anti-FVIII-Patientenserum diente als Positivkontrolle für das FVIII-Präparat Kogenate® und trug zur selektiven Unterscheidung zwischen FVIII und vWF bei. Beide Proteine sind als Komplex im Blut vorhanden. Daher war es wichtig zu überprüfen, ob die Antikörper spezifisch an den FVIII und nicht an den vWF binden.

Um den Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran (Abbildung 27 A) zu überprüfen, wurde Ponceau S verwendet. Dieser Farbstoff bindet, im Gegensatz zu Coomassie-Brilliant-Blau-R250, reversibel an positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen¹⁵³. Dadurch konnte die Membran anschließend problemlos für die Antikörperkomplexbildung weiterverwendet werden.

Der Western Blot zeigte, dass die Patientenantikörper beide FVIII-Präparate erkannten (Abbildung 27B). Wie erwartet, banden die Patientenantikörper einerseits an den FL-FVIII (240 kDa), andererseits aber auch an die kurze (75 kDa) und lange Kette (85 - 200 kDa) des Proteins. Ebenfalls war zu sehen, dass das Medikament Advate® weitere schwere Ketten (ca. 140 kDa) aufwies. Dieser rekombinante FL-FVIII wurde als Positivkontrolle mitgeführt, um Unterschiede zwischen den Präparaten zu sehen. Die Anbindung an Albumin und Transferrin war damit zu erklären, dass der FVIII an Albumin bindet¹⁷³ und die Antikörper auch den endogenen FVIII erkannt hatten.

Als Negativkontrolle wurde der vWF aufgetragen. Doch war er weder auf der Ponceau S gefärbten Nitrozellulose-Membran, noch nach Western Blot ersichtlich. Mit einem späteren Versuch konnte geklärt werden, dass der Grund das rasche Präzipitieren des großen Proteins war (Daten nicht gezeigt). Mit einer Ultraschall-Behandlung konnte der vWF gelöst werden. Mit dem Versuch konnte zudem gezeigt werden, dass die Patientenantikörper nicht an vWF, sondern nur an FVIII banden (Daten nicht gezeigt).

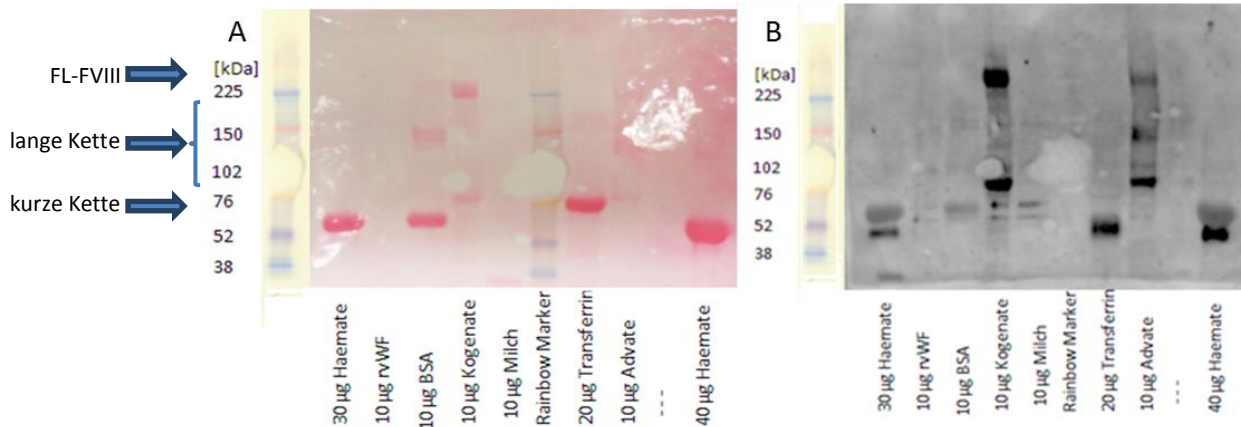


Abbildung 27: Nachweis von anti-FVIII-Ak und anti-vWF-Ak aus Serum A) Nitrozellulosemembran eingefärbt in Ponceau S Lösung nach Proteintransfer von SDS-PAGE. B) Western Blot nach Inkubation mit anti-FVIII-Patientenserum 1:200 in PBS-Puffer mit 3 % (w/v) BSA für 2 h bei RT.

Die Visualisierung der Komplexbildung der FVIII-Antikörper aus humanem Serum an verschiedene FVIII-Präparate, konnte mit diesem Western-Blot-System beispielhaft gezeigt werden (Abbildung 27 B). Nachdem die spezifische Interaktion zwischen FVIII und anti-FVIII-Ak geklärt war, sollte im nächsten Schritt ein ELISA für den Nachweis von FVIII-Antikörpern entwickelt werden. Ein ELISA war für die SPR-Biosensor-Entwicklung wichtig, da er mehr dem SPR-Format entspricht und keinen Proteintransfer beinhaltet.

4.1.5 Evaluierung eines geeigneten FVIII-Präparates mittels selbst entwickeltem ELISA

Der ELISA (Kap. 3.2.2.1) ist die Methode der Wahl, um Antigen-Antikörper-Bindungen zu verifizieren¹⁵⁸. Die Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (wenige Stunden im Gegensatz zu 2 d für einen Western Blot) und der hohen Parallelisierung vieler, gleichzeitig analysierbarer

Parameter durch die Verwendung von 96-Well-Platten¹⁷⁴. Die Immobilisierungsposition des Antigens ist willkürlich, und die Immobilisierung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen, also nicht kovalent, an das Polystyren. In der Literatur sind mehrere ELISA für den Nachweis von FVIII-Antikörpern beschrieben^{175–178}, wodurch eine erfolgreiche Immobilisierung wahrscheinlich schien.

Das Ziel war es, den spezifischsten und sensitivsten FVIII zu ermitteln, also das Protein der drei Hemmkörperplasmen, welches die geringsten unspezifischen Bindungen und gleichzeitig die stärkste spezifische Anbindung zeigt. Vier verschiedene FVIII-Proteine wurden als Antigene verwendet (siehe Tabelle 9), darunter jeweils zwei rekombinante und zwei plasmatische FVIII (Abbildung 28 A-D). Dies entsprach zum Zeitpunkt der Arbeit aller *inhouse* vorhandenen FVIII-Proteine.

Tabelle 9: Details zu den unterschiedlichen FVIII-Präparaten

FVIII-Präparat (Firma)	Quelle	Modifikation	Andere Proteine/ Zelllinie
BDD-FVIII (Cedarlane)	rekombinant	<i>B-domain-deleted</i> (BDD)	- /CHO
Advate® (Baxter)	rekombinant	<i>full-length</i>	- / BHK
Plasma-FVIII (Lexo)	humanes Plasma	<i>full-length</i>	-
Haemate® (CSL Behring)	humanes Plasma	<i>full-length</i>	von-Willebrand-Faktor, Albumin / -

Neben den Patientenplasmen wurden für weitere Kontrollen auch kommerzielle Antikörper und lyophilisierte Hemmkörperplasmen, die für Bethesda-Assays eingesetzt werden, als Primärantikörper genutzt. Die lyophilisierten Patientenplasmen dienen als Positivkontrolle, da sie aus gepoolten Patientenplasmen mit einem Inhibitortiter zwischen 16 – 17 BU/ml bestanden und kommerziell erwerblich waren. Nach Rekonstitution mit 1 ml destilliertem Wasser konnte das Inhibitorplasma der Firma Technoclone wie ein Patientenplasma behandelt werden.

Die besten Ergebnisse im ELISA zeigte der BDD-FVIII (Cedarlane®) (Abbildung 28 A). Die Kontrollplasmen gesunder Menschen wiesen ein schwaches Signal auf, wohingegen die Antikörper der Patientenplasmen stark angebonden haben. Bei Advate®, ein *full-length* FVIII der Firma Baxter, interagieren die Antikörper von Pat 1935 weniger mit dem FVIII als die Bethesda-Negativkontrolle (Abbildung 28 D). Das Patientenserum 1928 zeigte eine nur sehr schwache Interaktion. Auch Haemate® war für dieses Verfahren aufgrund der vielen anderen Proteine, wie HSA und vWF, die in dem Kryopräzipitat vorlagen, nicht geeignet (Abbildung 28 C)¹⁷⁹. Die generierte Oberfläche mit Haemate® war zu heterogen und damit sehr unspezifisch. Der plasmatische FVIII (Abbildung 28 B)

wäre prinzipiell geeignet gewesen, ließ sich jedoch in ersten Vorversuchen auf dem Biacore® nicht erfolgreich kovalent immobilisieren (Daten nicht gezeigt). Somit kam er auch nicht als Antigen in Betracht.

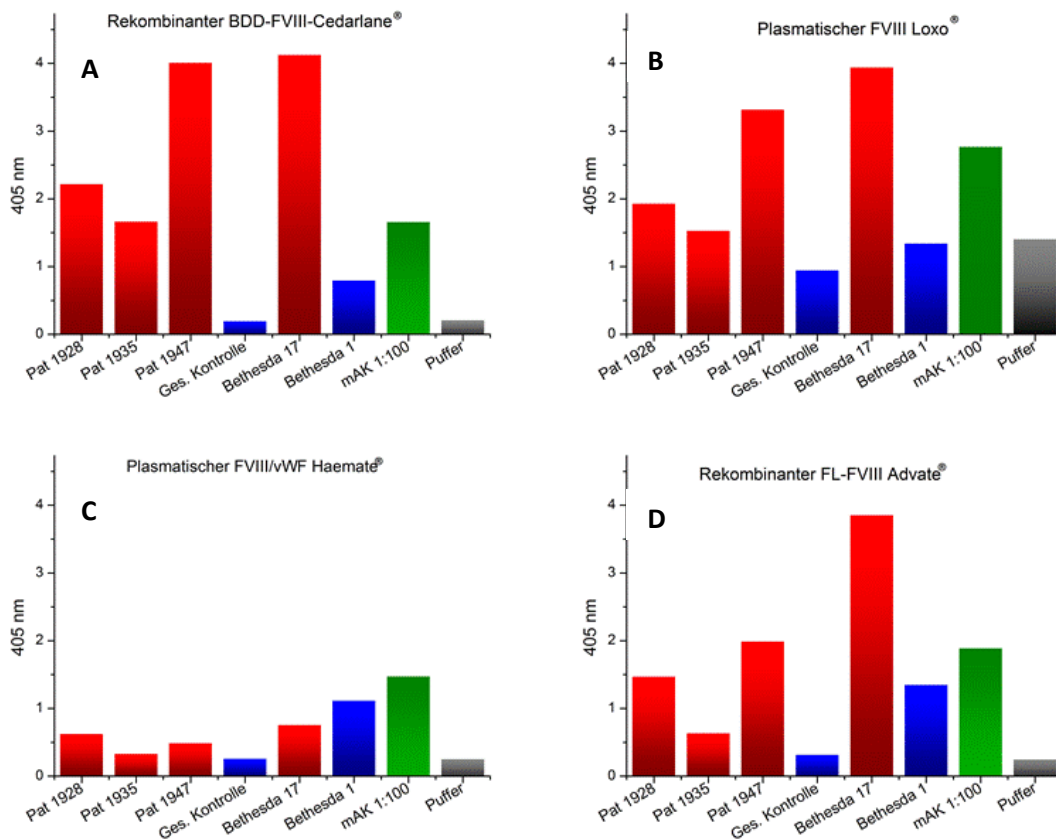


Abbildung 28: Analyse von vier verschiedenen FVIII-Präparaten hinsichtlich ihrer Antigenität mittels ELISA. In rot sind die Hemmkörperplasmen, in blau die Kontrollplasmen, in grün der monoklonale anti-FVIII-Ak, in grau ist Puffer, dargestellt. Primär-Antikörper-Serum 1:100 in PBS-Puffer verdünnt und 2 h inkubiert. Sekundär-Antikörper: Anti-Human IgG 1:5.000 in PBS-Puffer; Inkubation 2 h bei 37 °C (n=2).

Das Experiment zeigte eindeutig, dass der BDD-FVIII das vielversprechendste Protein für die Anwendungen mit der neuen SPR-Methode war. Die Bedingungen am Biacore® mussten folglich variiert werden, damit auch in der kurzen Inkubationszeit und ohne sekundäre Antikörper, die humanen Antikörper an den BDD-FVIII detektierbar waren.

4.1.6 Etablierung der FVIII-Immobilisierung auf der HC (*Hydrogel Coating*)-Polycarboxylat-Oberfläche

Nachdem der ELISA gezeigt hatte, dass die humanen Antikörper den BDD-FVIII sehr gut erkannten und er von den vier untersuchten Proteinen der spezifischste und sensitivste war, wurde nach einer geeigneten Sensor-Oberfläche gesucht. Im Falle einer geringen Antikörperkonzentration ist es entscheidend, möglichst viele Antigene zu präsentieren. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit der Bindung zwischen Ligand und Analyt trotz der kurzen Laufzeiten, die im Biacore X[®] nicht verlängert werden können¹⁸⁰.

Als Alternative zu den bisher eingesetzten Chipoberflächen wurde eine lineare Polycarboxylat-Hydrogel-Oberfläche gewählt. Sie ist nicht schwammartig aufgebaut wie Dextran, sondern hat 1.000 nm lange Ketten mit seitenständigen COO⁻-Gruppen. Diese sind sehr hydrophil und halten aufgrund der Kompaktheit Störproteine außerhalb der Detektionsgrenze von 200 nm¹⁴¹.

Wie beim pH-*Scouting* beschrieben (Kap. 4.1.1), sollte die Ionenkonzentration so niedrig wie möglich gehalten werden, weswegen für die Immobilisierung Millipore[®]-Wasser als Laufpuffer und 5 mM Essigsäure als Verdünnungspuffer für den BDD-FVIII verwendet wurde. Die Immobilisierung verlief erfolgreich mit einer Immobilisierungsmenge von ca. 13.000 RU (Abbildung 29).

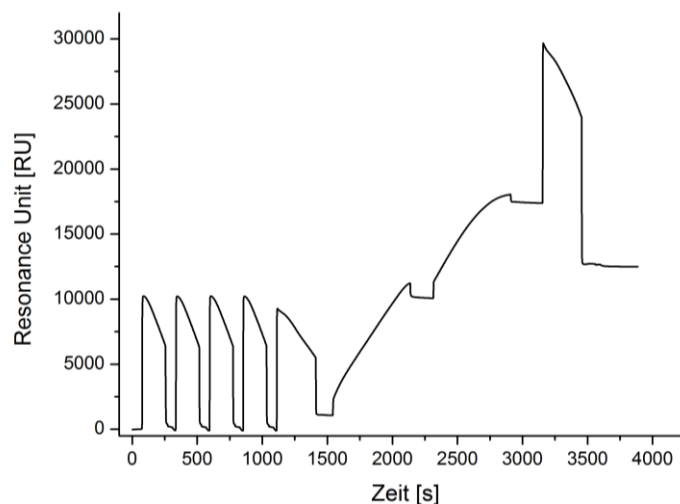


Abbildung 29: Immobilisierung des BDD-FVIII auf einer Polycarboxylat-Oberfläche. Zuerst 3-mal 30 µl Borat-Puffer (0,1 mM Borate, 1 M NaCl, pH 9,0), dann 50 µl EDS/NHS, anschließend 2-mal 50 - 100 µl FVIII-Lösung (1:4 in 5 mM Essigsäure, pH 4,5) und zum Schluss 50 µl 1 M Ethanolamin (pH 8,5) in Millipore[®]-Wasser als Laufpuffer, Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Im folgenden Versuch sollte die Anbindung des monoklonalen Antikörpers auf der Polycarboxylat-Oberfläche überprüft werden. Das Signal dafür stieg von 300 RU auf 800 RU (Daten nicht gezeigt). Eine Verdünnungsreihe mit dem Antikörper zeigte bereits bei niedrigen Konzentrationen eine hohe Sensitivität. Die Nachweisgrenze lag mit ca. 80 RU bei 0,5 ng/ml (Abbildung 30). Darüber hinaus zeigten Doppelbestimmungen auf einem Chip eine sehr gute Reproduzierbarkeit (Daten nicht gezeigt). Das waren gute Voraussetzungen für nachfolgende Plasmamessungen.

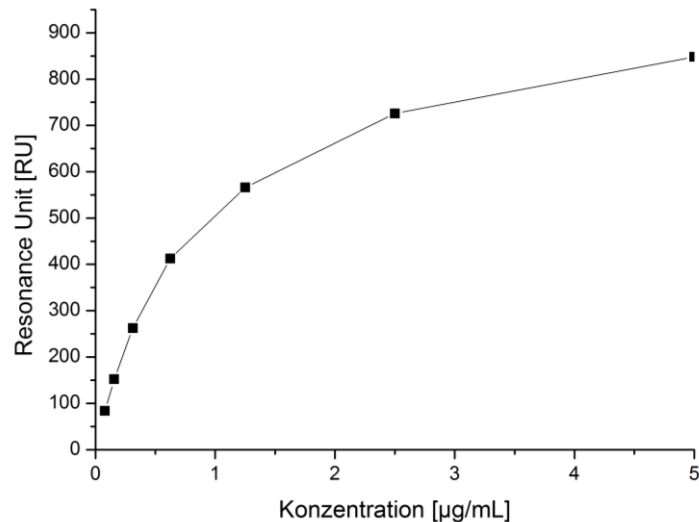


Abbildung 30: Anbindung verschiedener Konzentrationen des monoklonalen anti-FVIII-AK auf einer Polycarboxylat-Oberfläche. Injektion: je 45 µl; Immobilisierung (kovalente Bindung): 300 µl BDD-FVIII; Verdünnungen mit HEPES-Laufpuffer; Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

4.1.7 SPR-Messungen von Patientenplasmen auf der Polycarboxylat-Oberfläche

Die Chipbedingungen wurden zunächst so nah wie möglich an die ELISA-Konditionen angepasst (Kapitel 4.1.5). Doch komplett ließen sich die Versuchsbedingungen nicht übernehmen. In ersten Versuchen auf der HC-Oberfläche zeigte sich, dass HEPES-Puffer besser geeignet war als PBS-Puffer⁷², weswegen der HEPES-Puffer für die weiteren Versuche ausgewählt wurde (Daten nicht gezeigt). Ein anderer entscheidender Punkt war der Temperatureinfluss. Physiologisch herrschen 37 °C, die auch im ELISA verwendet wurden. Jedoch waren 37 °C am Biacore X[®] nicht praktikabel, da die Aktivester während der Immobilisierung auf dem Chip zu schnell hydrolysieren¹⁴¹. Das hatte zur Folge, dass keine reproduzierbare Immobilisierung möglich war. Die Temperatur nach der Immobilisierung von 25 °C auf 37 °C zu erhöhen, dauerte bei dem Gerät mindestens 5 h. Daher wurden alle folgenden Messungen bei 25 °C durchgeführt.

Um einen eindeutigen Unterschied zwischen Kontrollproben gesunder Menschen und Proben von Patienten mit Hemmkörpern zu erreichen, wurden verschiedene Plasmaverdünnungen getestet. Die beste Auftrennung zwischen den zwei Kollektiven zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:50 mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Abbildung 31). Die Kurvenverläufe waren typisch für die jeweilig erwartete Antikörperbindung.

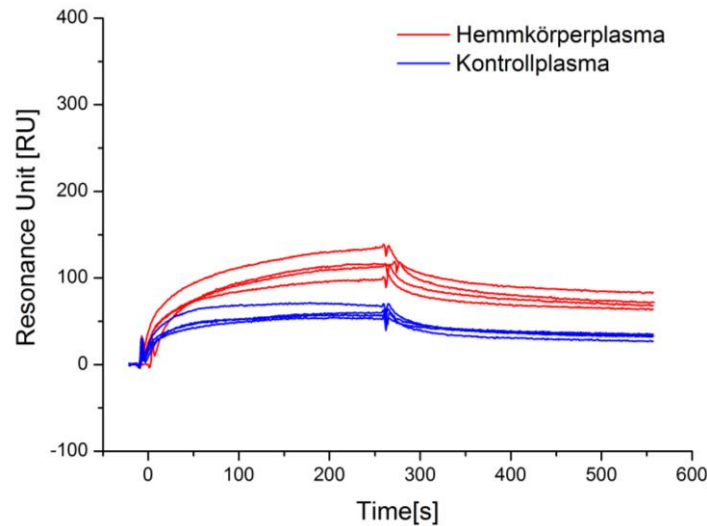


Abbildung 31: Anbindung von vier Humanplasmen mit Hemmkörpern und vier Kontrollplasmen auf einer Polycarboxylat-Oberfläche (100 μl immobilisierte BDD-FVIII). Injektion: Plasmen (45 μl) 1:50 in HEPES-Laufpuffer verdünnt. Kontrollen: Plasma gesunder Menschen. Flussrate: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 25 $^{\circ}\text{C}$.

Mit diesen Optimierungen der Messmethodik (Oberflächenimmobilisierung Kap. 3.2.2.2.2) war es erstmals möglich, eine eindeutige Separation in „gesund oder erkrankt“ unter Verwendung realer Patientenproben zu erreichen.

4.1.8 Immobilisierung des *full-length* (FL) FVIII (Kogenate[®]) auf der Polycarboxylat-Oberfläche

Nachdem der BDD-FVIII in Verbindung mit der auf der Polycarboxylat-Oberfläche so gute Ergebnisse lieferte, sollten auch andere FVIII-Proteine immobilisiert und getestet werden. Die Patienten erhalten generell in der Hämophilie-A-Behandlung unterschiedlichste FVIII-Präparate verschrieben. Von daher war es interessant zu untersuchen, ob Antikörper verschiedener Patientenproben ein unterschiedliches Anbindungsverhalten zeigen.

Um einen Unterschied zwischen verschiedenen Präparaten zu zeigen, wurde auch der FL-FVIII-Kogenate[®] von Bayer (Kap. 3.1.2) als Antigen verwendet. Die Immobilisierung des BDD-FVIII und

Kogenate® unter analogen Bedingungen (siehe Kap. 3.2.2.2) war ebenfalls sehr erfolgreich. Das Signal dafür variierte für den FL-FVIII zwischen 15.000-21.000 RU (Abbildung 32) und für den BDD-FVIII-Cedarlane® zwischen 10.000-14.000 RU (Daten nicht gezeigt).

Die Immobilisierung des FL-FVIII erfolgte unverdünnt, da diese FVIII-Präparation in der sauren 5 mM Essigsäure denaturiert wurde. Viele Proteine werden bei diesen niedrigen pH-Werten denaturiert. In solchen Fällen kann das Protein alternativ auch in niedrig molarem HEPES-Puffer (maximal 10 mM) gelöst werden. Doch der FL-FVIII wurde unverdünnt erfolgreich immobilisiert.

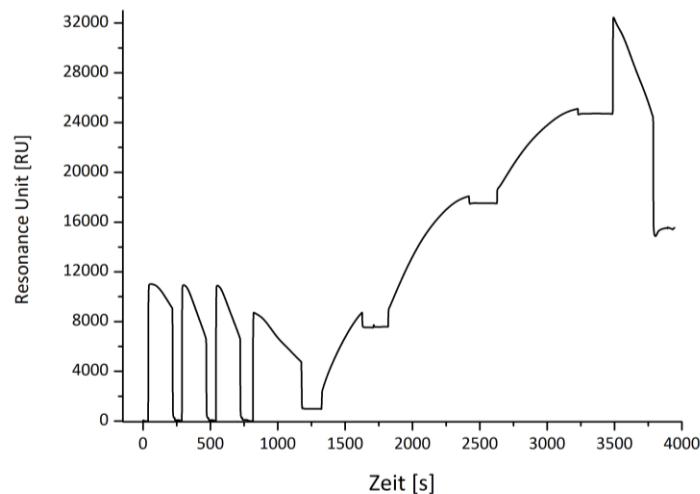


Abbildung 32: Immobilisierung des FL-FVIII auf einer Polycarboxylat-Oberfläche. Zuerst 3-mal 30 µl Borate-Puffer (0,1 mM Borate, 1 M NaCl, pH 9,0), dann 50 µl EDS/NHS, anschließend 3-mal 50 - 100 µl FVIII-Lösung und zum Schluss 50 µl 1 M Ethanolamin (pH 8,5) in Millipore®-Wasser als Laufpuffer, Flussrate 10 µl/min, 25 °C.

Die Antigenität des Liganden wurde mit dem polyklonalen anti-FVIII-Ak in einer 1:100 Verdünnung überprüft. Das Signal für die Bindung bei dem FL-FVIII lag bei ca. 2.000 RU und für den BDD-FVIII bei 1.500 RU (Daten nicht gezeigt). Diese reproduzierbare, starke Bindung der kommerziell erworbenen Antikörper zeigte, dass viel Antigen auf der Oberfläche vorhanden war. Diese gewünschte, hohe Antigendichte ist Voraussetzung, um Patientenplasmen auf dem Chip zu vermessen.

Die guten Bindungen an den FVIII zeigten unter den gegebenen Konditionen, dass die Abspaltung erneut optimiert werden musste. Es war nachvollziehbar, dass eine neue Oberfläche neue Assay-Konditionen forderte.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen Bethesda-positiven und -negativen Plasmen auch mit diesen Assay-Bedingungen erreicht werden konnte.

Einzig die etwas geringe Stabilität des Chips war noch nicht zufriedenstellend und wurde, wie nachfolgend beschrieben, weiter optimiert.

4.1.9 Stabilitätsoptimierung mittels Abspalllösung und Laufpuffer des immobilisierten FL-Faktor VIII

Die gute Antigenpräsentation des FVIII lieferte hohe Anbindungen der Antikörper (siehe Kap. 4.1.7). Doch ließen sich diese nur unvollständig abspalten, was die Genauigkeit der Messwerte und deren Reproduzierbarkeit beeinträchtigte. Deswegen wurden sämtliche, in Andersson et al.¹⁶⁷ beschriebene Abspaltungslösungen getestet. In Abbildung 33 sind nur die Abspalllösungen gezeigt, die den polyklonalen Antikörper vollständig vom FVIII lösten. Die Bedingungen waren in Bezug auf ihre Signaländerung nicht optimal (Abbildung 33 A), was auf eine verringerte Aktivität und einer damit verbundenen möglichen Denaturierung des Proteins hindeutete.

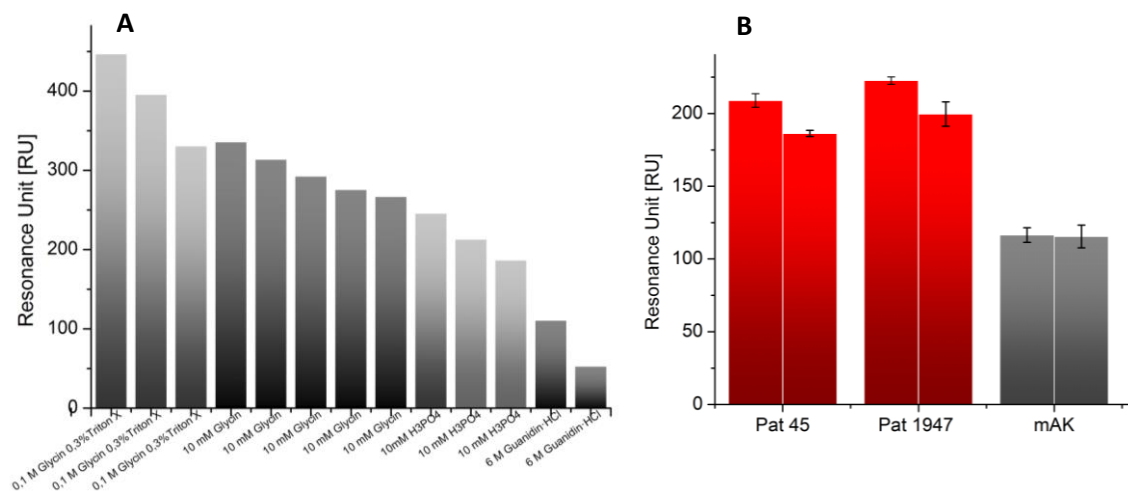


Abbildung 33: Überprüfung verschiedener Abspalllösungen. A) Anbindung des polyklonalen Antikörpers (45 µl; 1:100 in HEPES-Puffer verdünnt). Die aufgelisteten Regenerationslösungen wurden nacheinander verwendet; je 10 µl bei einer Flussrate von 10 µl/min. B) Stabilitätsmessung im Vergleich zu A nach Assay-Optimierung von zwei Patientenplasmen (1:50 verdünnt) und dem monoklonalen Antikörper (1:100 in HEPES-Puffer mit 10 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 300 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 80, pH 6,9) auf kovalent immobilisierten FL-FVIII; Polycarboxylat Chip; 10 µl/min, 25 °C (n=4).

Um ein stabiles, gefaltetes Protein auf der Oberfläche zu gewährleisten, können prinzipiell zwei Faktoren variiert werden. Auf der einen Seite ist es die Regeneration, welche die Bindung trennen soll, aber nicht die Konformation des Liganden ändern darf¹⁸¹. Auf der anderen Seite kann der

Laufpuffer verändert werden. Für viele Enzyme sind Cofaktoren essentiell, die in dem zugehörigen Puffer enthalten sein müssen¹⁸². Für FVIII wird in vielen Publikationen von verschiedenen Metallionen berichtet, welche die kurze und lange Kette über ionische Wechselwirkung miteinander verbinden^{88,169}. In der vorliegenden Arbeit wurde CaCl_2 eingesetzt, welches auch in der Pufferzusammensetzung von Kogenate® und Advate® vorhanden ist¹⁸³⁻¹⁸⁵. Die Konzentration wurde von 1-10 mM variiert. Dabei stellte sich eine Konzentration von 5 mM CaCl_2 als optimal heraus (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer wichtiger Punkt ist eine hinreichend hohe NaCl-Konzentration, die entscheidend für die FVIII-Stabilität ist⁷².

Die Pufferbedingungen, die einen sehr stabilen FVIII gewährleisten, wurden sukzessive erarbeitet¹⁸⁶. Die besten Ergebnisse ergaben sich bei der Zusammensetzung aus 10 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 und 0,05 % (v/v) Tween 80. Als Abspalllösung wurde 70 mM NaOH mit 1 M NaCl gewählt, denn diese trennte die zwei Proteine am besten unter Aufrechterhaltung einer guten Chipstabilität. Abbildung 33 B visualisiert die Anbindung von zwei hochtitrigen Patienten und dem monoklonalen Antikörper. Der Variationskoeffizient (CV) war niedrig und lag bei 5,3 %. Ein Vergleich der Sensorgramme (Abbildung 33) zeigte die Bedeutung der Assay-Validierung in Bezug auf die Chipstabilität. Der immobilisierte FVIII ist bei diesen Konditionen ca. 2-3 Tage stabil. Das entspricht ca. 70 kontinuierlich hintereinander durchgeführten Messungen. Der Aktivitätsverlust lag bei nur 10 % (Daten nicht gezeigt), was für die qualitativen und quantitativen Messungen sehr zufriedenstellend war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zwei rekombinante Präparate, der BDD-FVIII von Cedarlane® und der FL-FVIII von Bayer, identifiziert worden waren, um FVIII-Antikörper im Plasma nachzuweisen. Beide konnten unter Erhalt der Antigenität immobilisiert werden. Die Polycarboxylat-Hydrogel-Oberfläche ermöglichte eine hohe Immobilisierungsdichte, sodass niedrige Plasmakonzentrationen an anti-FVIII-Ak detektiert werden konnten. Das bedeutete eine gute Auftrennung zwischen den Kollektiven in einer 1:50 Verdünnung. Nach einer intensiven Abspaltungs- und Pufferoptimierung wurden Bedingungen validiert (Abspaltung mit 70 mM NaOH; Laufpuffer: 10 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,02 % (v/v) Tween 80, pH 6,9), die einen stabilen Chip mit bis zu 70 Messungen erlaubten. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, viele Patientenplasmen zu untersuchen.

4.1.10 Erster Screen mit 13 Hemmkörperplasmen unter optimierten Assay-Bedingungen

Nachdem geeignete Oberflächen (Kap.4.1.6) und optimierte Assay-Bedingungen (Kap. 4.1.9) entwickelt worden waren, die es erlaubten, die Antikörper zu detektieren und für mind. 70 Messungen stabil blieben, sollten die 13 eingesetzten Hemmkörperplasmen und die 4 Kontrollplasmen gesunder Menschen (Kap.3.1.3) analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass die als gesund klassifizierten Plasmen stärker an FVIII banden als einige Plasmen mit Hemmkörpern (Abbildung 34). Dieses Resultat erforderte eine genaue Analyse der möglichen Bindungspartner im Plasma.

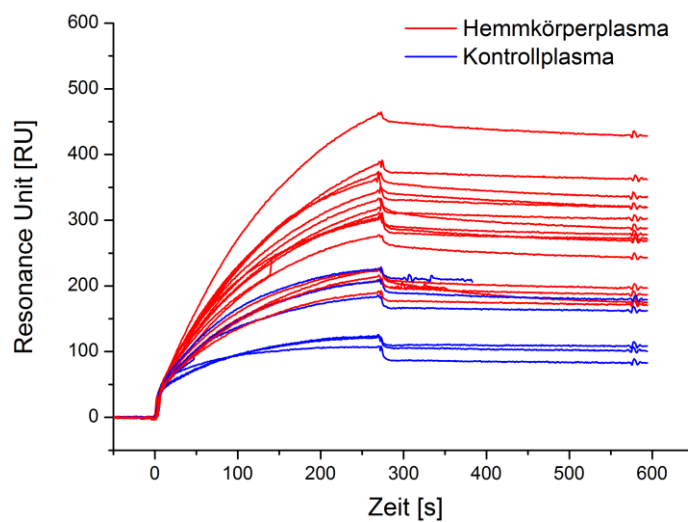


Abbildung 34: Anbindung von 13 Plasmen mit Hemmkörpern und 5 Kontrollen auf einer Polycarboxylat-Oberfläche an den kovalent immobilisierten FL-FVIII. Kontrollen: Plasmen gesunder Menschen; Injektion: 45 μ l Plasma (1:50 in 10 mM HEPES, 5 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl, 0,05 % Tween 80, pH 6,9 verdünnt); Flussrate 10 μ l/min, 25 °C.

4.2 Untersuchung der im Plasma vorliegenden Bindungspartner von FVIII - Überprüfung auf nichtinhibitorische Antikörper

Aufgrund des Ergebnisses, dass die Plasmen gesunder Menschen stärker an FVIII banden als einige Plasmen mit Hemmkörpern (Kap. 4.1.10), wurde überprüft, ob die Kontrollplasmen nicht-inhibitorische Antikörper enthielten, die die Messung beeinflussten. In vielen Publikationen wird diese Antikörper-Klasse beschrieben¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Im Bethesda-Assay werden diese nicht detektiert, da sie an Epitope binden, die unter Umständen nicht relevant für die physiologische Aufgabe des FVIII sind¹⁸⁷. Um nichtinhibitorische Antikörper zu detektieren, wurde auf dem SPR-Chip ein sekundärer Antikörper gegeben. Dazu wurde direkt nach der Patientenprobe anti-Human-IgG injiziert. Die Abbildung 35 zeigt eindeutig, dass nur im Patientenplasma FVIII-Antikörper vorlagen und nicht in den Kontrollplasmen.

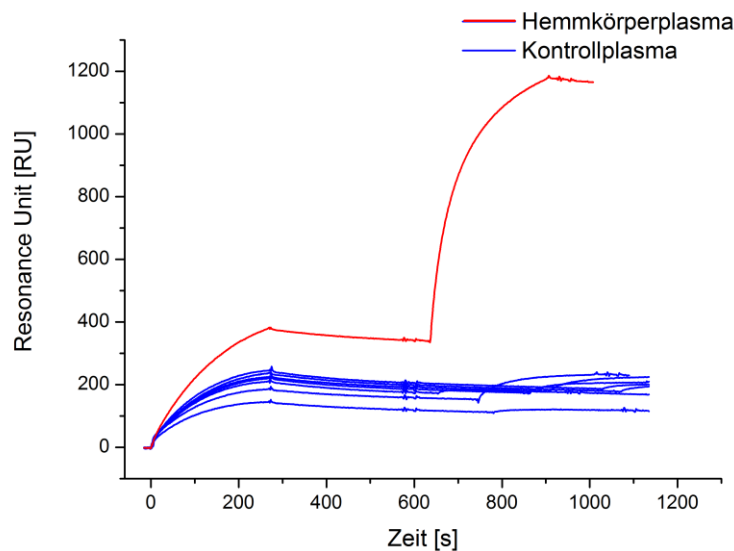


Abbildung 35: Anbindung von 12 Kontrollplasmen (blau) und einem Patientenplasma (rot, 1:50 in HEPES-Laufpuffer) je mit anschließender Injektion eines anti-Human-IgG (1:100) zur Überprüfung der unspezifischen Bindungen. HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Flussrate: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 25 $^{\circ}\text{C}$.

Alle Kontrollplasmen, die im vorherigen Test (Kap. 4.1.10) am stärksten angebunden hatten, wurden untersucht. Mit diesem Sandwich-Verfahren konnten die FVIII-Antikörper im Plasma alle zweifelsfrei nachgewiesen werden. Doch in diesem Format hatte der Assay keinen großen Neuwert. Es machte

keinen Sinn auf einem markierungsfreien Gerät einen sekundären Nachweis-Antikörper zu benutzen. Somit bestand weiterhin das Ziel die FVIII-Antikörper direkt nachzuweisen.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass andere Plasmaproteine für die unspezifischen Bindungen an den FVIII verantwortlich waren. Es konnte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit belegt werden, dass nicht nur der anti-FVIII-AK an den FVIII banden, sondern auch die Proteine, die physiologisch an ihn binden. Dies sollte durch weitere Versuche näher untersucht werden.

4.2.1 Überprüfung der Tenasekomplex-Faktoren mittels Mangelplasmen auf dem FVIII-Chip

Zur weiteren Charakterisierung der ungewollten Bindung von physiologischen Proteinen an FVIII wurden Mangelplasmen eingesetzt, bei denen es sich um chromatographisch gereinigte Plasmen handelte, denen jeweils ein spezielles Protein fehlte. Drei verschiedene Mangelplasmen wurden verwendet: ein vWF-, ein FX- und ein FIX-defizientes Plasma (Kap. 3.1.3). Diese Plasmen wurden ausgesucht, da der FX und FIXa physiologisch im Tenasekomplex an den FVIII binden¹⁶⁹. Der vWF umhüllt den inaktiven FVIII und war somit auch ein relevantes Protein für diese Fragestellung^{190,191}. Für Biacore®-Messungen war es wichtig, kein lyophilisiertes Plasma zu benutzen. Bei Verwendung einer anderen Matrix verändert sich der Brechungsindex¹⁹². Dadurch wären die Messungen nicht mit den anderen Kurven vergleichbar gewesen. Aus diesem Grund wurde chromatographisch gereinigtes, eingefrorenes Plasma verwendet. Abbildung 36 zeigte eindeutig, dass der vWF für die unspezifischen Bindungen an den FVIII verantwortlich war.

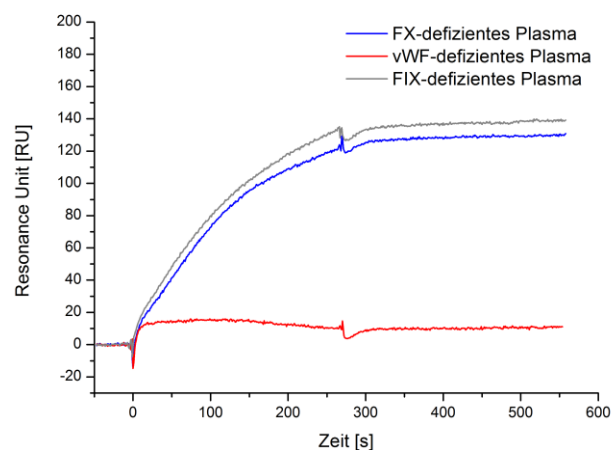


Abbildung 36: Anbindung von 3 verschiedenen, chromatographisch gereinigten Mangelplasmen auf einer HC-Oberfläche mit kovalent immobilisiertem FL-FVIII. Injektion: 45 µl 3 Mangelplasmen je 1:50 in Laufpuffer verdünnt. vWF-defizientes Plasma (rot), FX-defizientes Plasma (blau), FIX-defizientes Plasma (grau). Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Dadurch, dass nur ein rein vWF-defizientes Plasma verwendet wurde, war belegt, dass andere Proteine als der vWF nicht an den immobilisierten Gerinnungsfaktor banden. Die beiden anderen Mangelplasmen verhielten sich gleich. Damit stellte sich die Frage, wie eine Zugabe des vWF-defizienten Plasmas sich auf die Anbindung der Patientenplasmen auswirken würde. Hierzu wurden 3 Kontrollplasmen gewählt, von denen 2 eingangs sehr stark unspezifisch angebonden hatten (Kap. 4.1.10 – Abbildung 34). Als Positivkontrolle wurde ein hochtitriges Hemmkörperplasma benutzt. Der nächste Versuch sollte klären, ob die Verdünnung mit dem Mangelplasma, eine Unterscheidung zwischen den zwei Patientengruppen ermöglichen würde. Dafür wurde das Patientenplasma 1:1 mit dem Mangelplasma gemischt, um eine Endverdünnung von 1:50 mit HEPES-Puffer inkl. Zusätze zu erhalten. Die Versuche der Abbildung 37 bestätigten das Bindungsverhalten, das in Abbildung 36 schon gezeigt wurde. Der vWF war für die unspezifischen Bindungen verantwortlich, weswegen die Anbindungen geringer waren, wenn das vWF-defiziente Plasma zugegeben wurde. Es galt, je weniger vWF, desto weniger Anbindung (Abbildung nicht gezeigt).

Als Konsequenz dieser Ergebnisse ergab sich, dass die zweifache Menge an zugemischtem, vWF-defizienten Plasma das Signal der Kontrollen mit Plasmen gesunder Menschen verringerte, aber eben nicht im gleichen Maße wie bei Plasmen von Patienten mit Hemmkörpern. Somit hatte das Mangelplasma nicht nur einen reinen Verdünnungseffekt, wie ein Puffer es hätte, sondern der vWF spielte eine entscheidende Rolle in der Biosensoranbindung. Die Signalreduzierung prägte sich bei den Kontrollproben um ca. 70 % deutlich stärker aus (Abbildung 37- blaue Balken). Somit galt es zu klären, ob mit dieser Methode eine Unterscheidung in „gesund oder erkrankt“ möglich wäre.

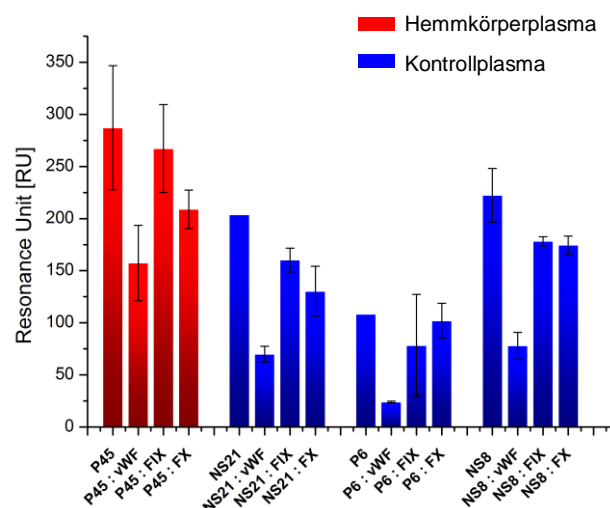


Abbildung 37: Bindung von 3 Kontrollplasmen (blau) und einem Patientenplasma (rot), 1:1 versetzt mit den 3 defizienten Plasmen und dem unbehandelten Plasma. HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Injektion: 45 µl Plasma (1:50 in HEPES-Laufpuffer verdünnt), Flussrate: 10 µl/min; 25 °C; (n=3).

Allerdings war es nicht möglich, die unspezifischen Bindungen so stark zu unterdrücken, dass die Kontrollen weniger banden als die Hemmkörperproben (Abbildung 38). Im Endeffekt wurden alle Signale unterdrückt. Damit reichte dieser Verdünnungsschritt leider nicht aus, obwohl die Bindungen der Kontrollplasmen stärker reduziert wurden, als die der Hemmkörperpatienten.

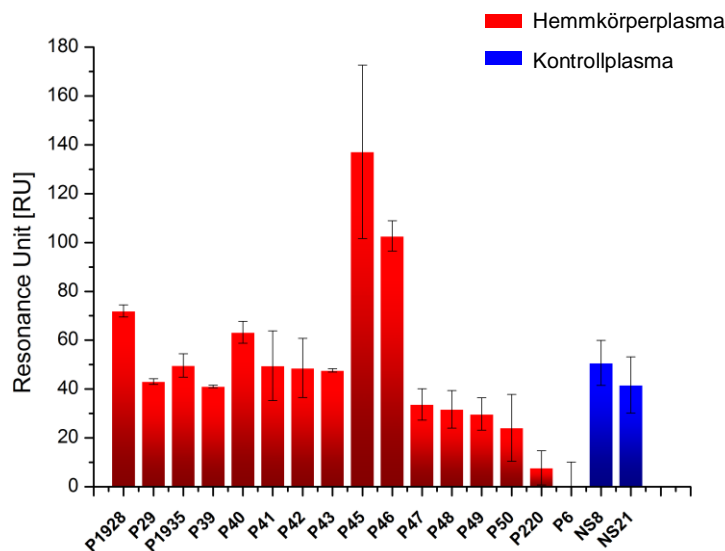


Abbildung 38: Anbindung der vorhandenen 15 Hemmkörperplasmen und 2 Kontrollplasmen 1:1 mit vWF-defizienten-Plasma versetzt. HC-Oberfläche mit kovalent immobilisiertem FL-FVIII. Injektion: 45 µl Plasma (1:50 in HEPES-Laufpuffer verdünnt), Flussrate: 10 µl/min; 25 °C; (n=3).

Als Konsequenz musste eine andere Methode gefunden werden, um den vWF aus den Plasmenproben zu entfernen. Es wurde nach vWF-Antikörpern gesucht, die spezifisch an die FVIII-Bindestelle D3 des vWF binden¹⁹⁰. Doch es gab keine kommerziell erwerblichen Antikörper, welche spezifisch diese Domäne erkannten. Ein anderer Ansatz war die Eliminierung des großen Glykoproteins mit Hilfe von Filtermembranen. Es wurden 100-kDa- und 300-kDa-Membranen eingesetzt, um die bis zu 20 Millionen Da großen vWF-Multimere zu entfernen. Eine derartige Elimination konnte nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt), denn der vWF wurde vermutlich aufgrund von Scherkräften vom globulären Protein zu einem Proteinfaden gezogen. Dass dies möglich ist, belegen die Untersuchungen von Siedlecki et al.¹⁰². Der vWF konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit die Membranporen passieren, weshalb die Filtrationsversuche nicht erfolgreich waren.

4.2.2 Antikörperisolierung aus humanen Plasmen mittels Protein-A/G-Säulen

Die vorangegangenen Versuche zeigten die für die SPR-Methode nachteilige Anbindung des vWF an den FVIII (Kap. 4.2.1). Der vWF konnte nicht aus dem Plasma eliminiert werden, um so die unspezifischen Bindungen zu reduzieren (Kap. 4.2.1). Deswegen sollten nun die Antikörper aus dem Plasma isoliert werden. Dafür wurden Protein-A/G-Zentrifugationssäulen verwendet (Kap. 3.2.1.6). Protein A bindet mit sehr hoher Affinität humanes IgG sowie IgA und Protein G bindet IgM^{155,193}. Damit war gewährleistet, dass alle Subklassen dieser Antikörper isoliert wurden. FVIII-Antikörper sind zum größten Teil IgG-Antikörper, die zugehörige Subklasse ist die IgG₄¹⁷⁶. Auch alle anderen Klassen sind beschrieben^{194,195}.

Nach der Antikörperbindung an Protein A/G, wurden sie mittels pH-Verschiebung in 3 Elutionsschritten gelöst. Nur im 1. und 2. Elutionsschritt befand sich ca. 0,5 mg/ml Protein, das in HEPES-Puffer umgepuffert und weiter analysiert wurde. In der Detailuntersuchung jedes einzelnen Schritts zeigte sich, dass in der ersten Fraktion Proteine enthalten waren, die keine Antikörper waren, aber an FVIII gebunden hatten (Daten nicht gezeigt). Auch verschiedene Waschschrte mit Tween 20 oder Triton X-100 als Detergenz, haben die unspezifischen Proteine nicht eliminiert (Daten nicht gezeigt). SDS-Gele zeigten, dass viele andere Proteine außer den gewünschten Antikörpern zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). Deswegen musste ein anderer Weg gefunden werden, um die störenden Proteine zu eliminieren.

4.2.3 Inkubation der Protein-A/G-Säulen in Ethanolamin zur Minimierung unspezifischer Anbindungen

Mit Hilfe einer Literaturrecherche wurde eine weitere Methode zur selektiven Entfernung störender Faktoren gefunden: eine Vorbehandlung der Protein-A-Sepharose-Säulen (siehe Kap.3.2.1.6), die laut Literatur sehr gute Ergebnisse lieferte¹⁹⁶. Hierbei wurden die Säulen über Nacht in einem Ethanolaminpuffer bei 4° C inkubiert. Das Protein-A/G-Konstrukt wurde kovalent an die Sepharose gekoppelt. Falls die aktivierten Gruppen nicht ausreichend geblockt worden waren, wurde dieser Schritt mit Hilfe von Ethanolamin nachträglich durchgeführt. Es konnte leider nicht geklärt werden, warum dieser Schritt vor jeder Antikörperisolierung durchgeführt werden musste (Daten nicht gezeigt). Vielleicht beeinflusste der hohe pH von 10,5 oder das Ethanolamin das Protein A/G, sodass nur die hochaffinen Antikörper banden und nicht unspezifisch andere Plasmaproteine. In der Literatur ist das Problem jedoch bekannt¹⁹⁶ und konnte, wie in Abbildung 39 ersichtlich, durch diesen

Schritt behoben werden. Die Kontrollgruppe (blau) zeigte so gut wie keine unspezifische Anbindung in dem 1. und 2. Elutionsschritt nach 12 h in der Ethanolamin-Lösung.

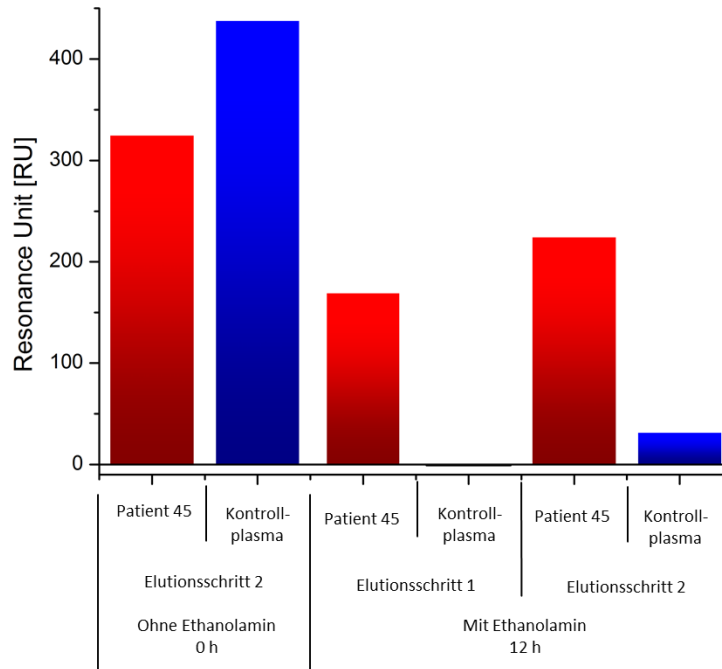


Abbildung 39: Anbindung der isolierten Antikörper eines Kontrollplasmas (blau) und eines Patientenplasmas (rot). Zuerst ohne Säulenvorbehandlung und anschließend nach 12 h Inkubation in 200 mM Ethanolamin mit 0,5 % Tween 20 (pH 10,5). HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Injektion: 45 µl Probe (in HEPES-Laufpuffer umgepuffert). Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Nachdem die unspezifische Bindung im ersten und zweiten Elutionsschritt fast komplett eliminiert war, sollten alle 3 Elutionsschritte verwendet werden. Für eine solide Darstellung des Antikörperspektrums war es sehr wichtig, alle im Plasma enthaltenen Antikörper zu detektieren.

Um ein besseres Verständnis für die Isolierung der Antikörper zu erhalten, ist in Abbildung 40 die Herangehensweise aufgezeichnet.

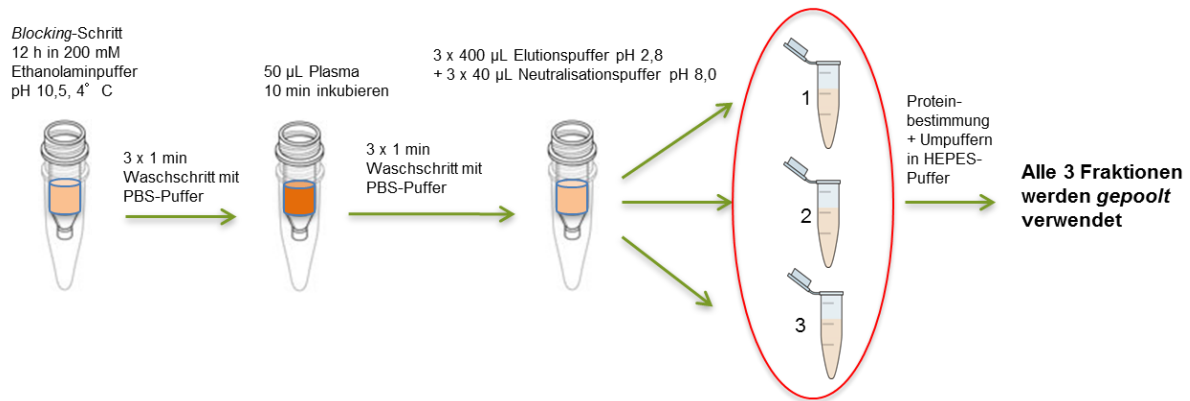


Abbildung 40: Antikörperisolierung mittels Thermo®-Protein-A/G-Säulen mit vorangehendem *Blocking*-Schritt in Ethanolaminpuffer und anschließendem Elutionsschritt mittels pH-Verschiebung.

Nachdem eine zuverlässige Methode gefunden worden war, um die unspezifischen Anbindungen an das Sepharose-Protein A/G zu vermeiden, konnte mit der Säulvalidierung begonnen werden.

4.3 Validierung der Protein-A/G-Säulen für die Antikörperisolierung

Zur Validierung der Protein-A/G-Säulen für die anti-FVIII-Ak-Isolierung wurden zuerst die Plasmen der 13 Patienten mit Hemmkörpern und die 4 Kontrollen, die zuvor sehr stark angebinden hatten (siehe Kap 4.1.10) untersucht. Nach der Isolierung aller Antikörper aus den Patientenplasmen sowie Kontrollen mit vorheriger Inkubation mit Ethanolaminpuffer, war eine sehr gute Auftrennung zwischen den zwei Kollektiven möglich (Abbildung 41). Die Ergebnisse belegten auch, dass die Antikörperisolierung die Immunglobuline nicht denaturierte, da sie eindeutig an den immobilisierten FVIII gebunden hatten.

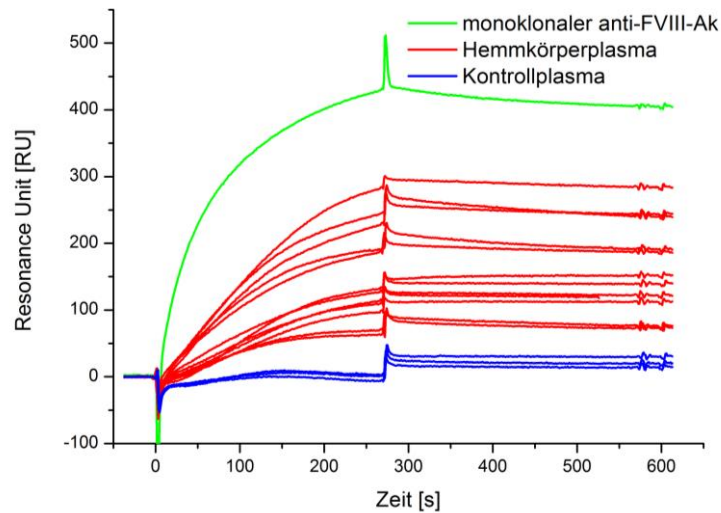


Abbildung 41: Anbindung der isolierten Antikörper von 12 Hemmkörperplasmen (rot), 3 Kontrollplasmen (blau) und dem monoklonalen Ak 1:100 (grün) mit vorheriger Inkubation der Protein-A/G-Säulchen in Ethanolaminpuffer. Injektion: 45 µl Probe auf HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Da die Plasmenaufarbeitung ein sehr wichtiger Schritt für die SPR-Ergebnisse war, mussten alle Parameter, wie inter- und intra-Assay-Varianz sowie Stabilität und Reproduzierbarkeit, validiert werden. Zuerst wurde eine Säule 4-mal hintereinander verwendet (Abbildung 42). Sie hatte eine Standardabweichung von 35,1 RU. Das entsprach einem CV von 10 %, was die Herstellerangaben bestätigte.

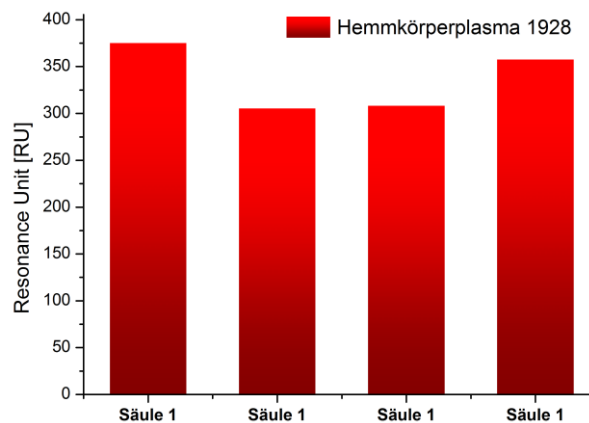


Abbildung 42: Intra-Assay-Säulen-Abweichung der isolierten Antikörper von einem Patientenplasma (rot) auf einer Protein-A/G-Säule nach 12 h Inkubation in 200 mM Ethanolamin mit 0,5 % (v/v) Tween 20 (pH 10,5). HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Injektion: 45 µl Probe (in HEPES-Laufpuffer umgepuffert). Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von 5 Säulen war ebenfalls zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt). Sie lag unter einer SD von 10 %. Eine Abweichung unter 10 % war auch erforderlich, um das System für die Reinigung zu verwenden. Säulen anderer Hersteller, wie Sartorius oder Life-Technologies®, erbrachten keine vergleichbar guten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Nicht nur die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war ein wichtiger Punkt, sondern auch die Stabilität der Proteine. Es ist bekannt, dass Antikörper in Plasma bei -20 °C über Jahre stabil sind. Bei 4 °C sind Antikörper für ungefähr 6 Monate und bei RT nur ca. 2 Tage stabil. Wenn das Medium, hier Plasma, entfernt wird, muss die Stabilität erneut getestet werden.

Zur Überprüfung der Stabilität wurde eine größere Menge an Antikörpern isoliert und bei RT alle 30 min über 6 h gemessen. Nach 2 h zeigte sich ein starker Aktivitätsabfall (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurden weitere Lagertemperaturen getestet. Die Antikörper von einem Patientenplasma wurden isoliert und vor der Lagerung die Aktivität erfasst. Diese Messung wurde nach 24 h nochmals wiederholt. Als Lagertemperaturen eigneten sich -20°C sowie -80°C (Abbildung 43). Die Stabilität war bei diesen Temperaturen fast unverändert, und die SD liegt unter 10 %.

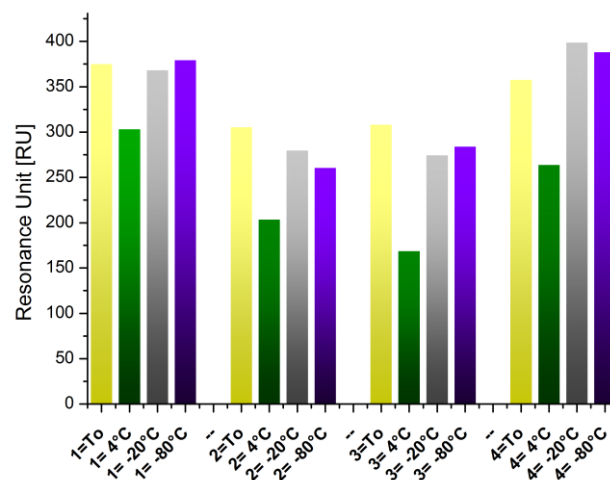


Abbildung 43: Anbindung der isolierten Antikörper zu Beginn T_0 und nach 24 h Lagerung bei 3 verschiedenen Temperaturen (4 °C, -20 °C und -80 °C). Es wurde das gleiche Patientenplasma verwendet wie für die Analyse der Intra-Assay-Abweichung, hier aber auf 4 verschiedene Säulen aufgetragen. Vorbehandlung der Säulen: 12 h Inkubation in 200 mM Ethanolamin mit 0,5 % (v/v) Tween 20 (pH 10,5); HC-Oberfläche mit kovalent immobilisiertem FL-FVIII; Injektion: 45 µl Probe (in HEPES-Laufpuffer umgepuffert). Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Zusammenfassung der kompletten Plasmenvorbereitung:

Nach intensiver Chipcharakterisierung wurde eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit sowie hohe Chipstabilität (70 Messungen mit nur 10 % Aktivitätsverlust) erreicht. Aufgrund der vielen möglichen Proteininteraktionspartner zeigten sich hohe unspezifische Bindungssignale an den immobilisierten FVIII bei den Kontrollplasmen. Die Ursache der Anbindung wurde mittels Mangelplasmen geklärt. Das vWF-defiziente Plasma zeigte im Gegensatz zu den FIX- und FX-Mangelplasmen eine ganz schwache Anbindung an den FVIII. Das große Glykoprotein vWF konnte leider nicht gezielt aus dem Plasma entfernt werden, weshalb als alternative Option die Isolierung der Antikörper gewählt wurde. Nachdem die chromatographische Reinigung optimiert und anschließend validiert wurde, konnte eine Charakterisierung der Antikörper mittels Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgen. Zu dem Zeitpunkt waren noch nicht genug Patientenplasmen für eine klinische Validierung vorhanden. Deswegen sollten die Antikörper weiter charakterisiert werden.

Der große Vorteil der SPR-Methode ist die online-Bestimmung von Affinitätskonstanten, die Auskunft über die Bindung zwischen Antigen und Antikörper geben.

4.3.1 Entwicklung eines anti-FVIII-Biosensors für die Validierung von kinetischen Parametern der Patientenantikörper

Der ausschlaggebende Vorteil der markierungsfreien Echtzeitmessung mittels SPR ist die Bestimmung von Affinitäts- und Gleichgewichtskonstanten. Die Stärke der Anbindung zwischen Antigen und Antikörper ist ein sehr entscheidendes Charakterisierungsmerkmal. Es ist bekannt, dass die Affinität des Antikörpers mit der Schwere der Krankheit korreliert. Deswegen sollte in dieser Arbeit die Affinität von Patientenantikörpern untersucht werden. Ein Antikörper bindet mit der Assoziationsgeschwindigkeit k_a an das Antigen, und der Immunkomplex wird gebildet. Die Rückreaktion erfolgt mit der Dissoziationsgeschwindigkeit k_d . Wird k_a durch k_d dividiert, erhält man die Gleichgewichtskonstante K_A . Je stabiler der ganze Komplex ist, desto höher ist die, auch als Affinitätskonstante beschriebene, Konstante K_A (Einheit: M^{-1} ; bei monovalenter Anbindung von Antigen an Antikörper). Bei Antikörpern schwanken die Werte zwischen $10^5 - 10^{12} M^{-1}$ ¹⁹⁷. Um die Affinitätsparameter berechnen zu können, muss die Konzentration des Analyten bekannt sein. Doch das ist bei Patientenantikörpern im Serum weder trivial noch exakt genug. Deswegen wurde das System invertiert: Die Antikörper wurden immobilisiert und FVIII diente als Analyt.

Aus Vorversuchen und Arbeiten von Nogami, Raut und anderen Arbeitsgruppen war die Bindung vieler Proteine an den FVIII bekannt ^{94,198,199}. Deswegen sollten die Assay-Bedingungen erst einmal so

optimiert werden, dass keine unspezifische Anbindung zwischen Antikörper und dem FVIII stattfanden. Angefangen wurde mit einem Carboxymethyldextran (CMD)-Chip, auf dem kovalent das Protein A immobilisiert war. Der Vorteil von Protein A ist die gerichtete Anbindung über den F_c -Teil der Antikörper an den Chip²⁰⁰. Außerdem muss keine weitere Behandlung, wie die kovalente Immobilisierung oder Aufreinigung der Antikörper, erfolgen. Der Ansatz war jedoch nicht erfolgreich, da FVIII an die Patientenantikörper genauso wie Kontrollantikörper gebunden hat (Daten nicht gezeigt).

Folglich sollten die Antikörper direkt an die Oberfläche immobilisiert werden. Dafür wurden verschiedene Oberflächen ausprobiert:

- Self-assembling monolayer (SAM),
- Polycarboxylat 1000 (HC),
- Carboxymethyldextran 50 (CMD).

Für die Bestimmung kinetischer Parameter soll die Antigendichte so gering wie möglich gehalten werden. Dies hat das Ziel, eine Sättigung des Liganden zu erreichen und so die Massentransfer-Effekte zu minimieren²⁰¹. Außerdem soll das sogenannte *Rebinding* verhindert werden. Das bedeutet, dass bei einer hohen Immobilisierungsdichte, das Antigen zweimal hintereinander an den immobilisierten Antikörper bindet. Damit das nicht passiert, wurde zuerst eine SAM-Oberfläche gewählt. Die isolierten Antikörper wurden kovalent über die Lysin-Reste immobilisiert. Doch der FVIII hatte an die Antikörper beider Gruppen gleich stark gebunden (Daten nicht gezeigt). Alle anderen Chipoberflächen brachten ebenfalls nicht die gewünschte Auftrennung. Deswegen wurde ein weiterer Schritt eingefügt. Nach der Antikörperisolierung über die Protein-A/G-Säulen wurde eine Affinitätschromatographie mit dem immobilisierten FVIII durchgeführt. Mit dem Schritt sollten alle unspezifischen Antikörper entfernt werden. Dieser zusätzliche Prozess wurde angelehnt an Publikationen von Lacroix-Desmazes sowie Moreau et al. durchgeführt^{202,203}. Es konnte festgestellt werden, dass nach chromatographischer Reinigung der anti-FVIII-Ak die Auftrennung zwischen dem Patientenplasma und der Kontrolle erfolgreich war (Abbildung 44). Bei der Kontrolle gab es ein Hintergrundsignal von ca. 100 RU. Doch dieses war mehr oder weniger konzentrationsunabhängig und konnte deswegen als unspezifisch angesehen werden. Außerdem war der Unterschied zwischen den Patientenantikörpern (max. 100 RU) und den Antikörpern der Kontrolle (max. 600 RU) so groß, dass dies als signifikant betrachtet werden konnte.

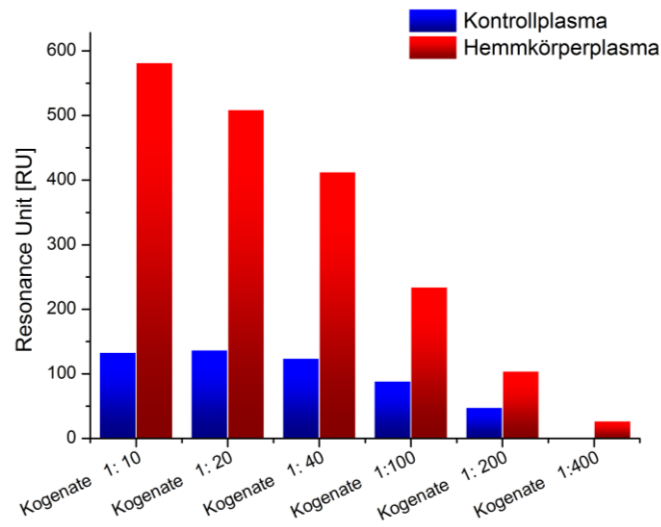


Abbildung 44: Anbindung des FL-FVIII (Kogenate®) in verschiedenen Verdünnungen auf den immobilisierten isolierten Patienten- und Kontrollplasma-Antikörpern. Die Ak wurden über 2 verschiedene Säulen, erst eine Protein-A/G-Säule und anschließend eine FVIII-Säule, gereinigt. CMD-Oberfläche mit kovalent immobilisierten humanen anti-FVIII-Antikörpern; Injektion: 100 µl FI-FVIII (in HEPES-Laufpuffer verdünnt). Flussrate: 30 µl/min, 25 °C.

Nachdem eine Methode gefunden worden war, die die zwei Kollektive voneinander trennte, sollten nun einzelne Patientenplasmen untersucht werden, um deren Affinitätskonstanten zu bestimmen.

4.3.2 Kinetische Bestimmungen für zwei Patientenplasmen

Es gibt zwei bekannte Wege, kinetische Parameter zu bestimmen. Der klassische Weg ist, eine Konzentrationsreihe mit dazwischen liegenden Abspaltungen zu messen. Anschließend werden die Kurven übereinander gelegt und mit einem globalen Fit die Affinitätskonstanten bestimmt¹⁴⁷.

Als weitere Möglichkeit publizierte 2006 Karlsson et al.²⁰⁴ die Kinetik-Titration. Hierzu wird die Konzentrationsreihe von der geringsten Analytmenge aufsteigend injiziert ohne zwischendurch abzuspalten. Die Oberfläche wird mit einer höheren Konzentration des Liganden immobilisiert, damit während der gesamten Messung ausreichend Epitope vorhanden ist. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sehr robust ist, keine Optimierung der Abspaltung benötigt und deshalb eine unveränderte Oberfläche gewährleistet. Jedoch war diese Titration für die vorliegende Arbeit nicht geeignet, da die Injektion automatisiert ablaufen muss, damit die Dissoziationsphasen immer gleich sind. Beim Biacore® X können alle Volumina nur händisch injiziert werden und somit ist die Abweichung zu groß. Daher wurde die klassische Abspaltmethode gewählt. Als Regenerationslösung diente 10 mM NaOH,

da es normalerweise wirksam ist und die biologische Aktivität des immobilisierten Proteins nicht beeinflusst²⁰⁵.

Vier Patientenplasmen mit Hemmkörpern wurden untersucht, doch werden exemplarisch nur die Ergebnisse für zwei Patientenplasmen gezeigt (Abbildung 46). Patientenplasma 44 hatte einen hohen Inhibitor-Titer von 37 BU und der zweite Patient E5 galt als sogenannter *Low-Responder* mit 3 BU. Beide Patienten wiesen erworbene anti-FVIII-Ak auf. Als Antigen wurde Kogenate® verwendet. Die Sensoroberfläche war ein CMD-50-Chip, da die kurzen Dextransketten eine geringere Immobilisierungsdichte ermöglichten und gleichzeitig der Massentransfer minimiert wurde. Um eine Sättigung der Oberfläche mit dem Analyten zu erreichen, wurden nur 200 - 400 RU Patientenantikörper (Ligand) immobilisiert (Kap. 3.2.2.2.3). Die Orientierung der Antikörper wurde mit einem sekundären anti-Human-F_c und -F_{ab}-Ak, mit dem Ergebnis einer 1:1 Verteilung bestimmt (Abbildung 45).

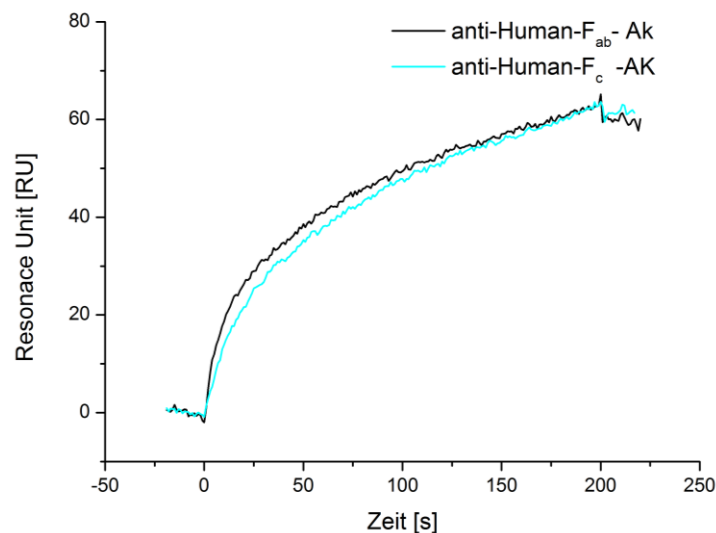


Abbildung 45: Anbindung von anti-Human F_{ab} und anti-Human F_c-Ak (1:200) auf einer CMD-Oberfläche mit kovalent immobilisierten Patientenantikörpern nach chromatographischer Reinigung. Flussrate: 30 µl/min; 25 °C.

Alle Messungen wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min durchgeführt, um auch so den Massentransfer zu minimieren. Des Weiteren minimiert die geringe Immobilisierungsdichte den Massentransfer bei der Assoziationsphase sowie *Rebinding*-Phänomene in der Dissoziationsphase. Angenähert wurden die Kurven mit einem globalen Fit in einem „heterogenen Liganden-Detektionsmodell“. Die BIAevaluation Software stellt diesen Modus bereit. Die Fits der Kurven sind die Summe aus zwei unabhängigen, biospezifischen Reaktionen. Daher wurden die Geschwindigkeits-

konstanten der Assoziation und der Dissoziation doppelt angegeben. Da im Plasma verschiedene Antikörper vorhanden waren, generierte nur dieses Modell akzeptabel passende Fits mit zufriedenstellenden niedrigen Abweichungen (Abbildung 46).

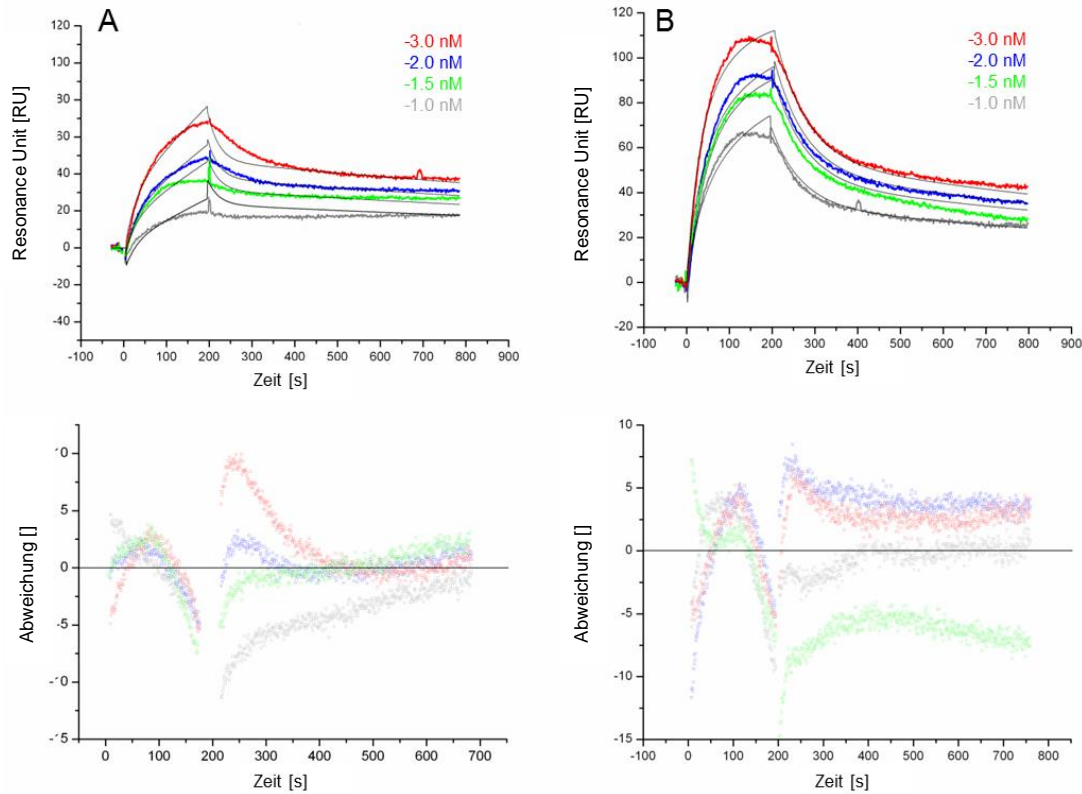


Abbildung 46: Kinetische Messungen mit Kogenate® als Analyt. A) Patientenantikörper mit 37 BU/ml nach doppelter Antikörperreinigung auf CMD-50 nM-Chip kovalent immobilisiert. B) Patientenantikörper mit 3 BU/ml. Injektion: 100 µl FL-FVIII (in HEPES-Laufpuffer wie angegeben verdünnt); Flussrate: 30 µl/min; 25 °C.

Die Halbwertszeit der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe ist medizinisch von größerem Interesse als die Geschwindigkeit der Komplexbildung. Die Halbwertszeit der Komplexbildung zeigt das Ausmaß der Inhibierung eindeutiger an. Deswegen wurde der Fokus auf die Dissoziation des Liganden gelegt. Die berechnete Dissoziationskonstante K_D von $7,82 \times 10^{-10}$ M stimmte gut mit den veröffentlichten Daten von Dimitrov et al. (K_D $8,55 \times 10^{-10}$ M) überein²⁰⁶. Die Zusatzinformation der Affinität ließ den Schluss zu, dass die Inhibitorwerte nicht mit der Menge an Immunglobulinen korrelierten, sondern mit ihrer Affinität. Die Biosensorergebnisse (Tabelle 13) unterstützten diese These. Das Anbindungssignal der Patientenprobe E5 (3 BU) war im Vergleich mit Patienten 44 (37 BU) nicht merklich höher auf dem FL-FVIII-Biosensor und auf dem BDD-FVIII-Chip sogar niedriger. Unter Berücksichtigung der großen BU-Unterschiede sollte die Bindung an die Präparate viel höher sein. Die

Pilot-Versuche der kinetischen Ergebnisse zeigten die heterogene Immunantwort des einzelnen Patienten und wie wichtig diese detaillierte anti-FVIII-Ak-Charakterisierung war. Der monoklonale Antikörper war der affinste Antikörper. Der Grund war unter anderem die Herstellung. Die Antikörper werden auf ihre Affinität hin optimiert. Zusätzlich wurde keine zweifache Reinigung mit ihnen durchgeführt, was die Affinität auf jeden Fall negativ beeinflusst hätte.

Tabelle 10: Kinetische Bestimmung von zwei Hemmkörperpatientenplasmen mit zwei unterschiedlichen Dissoziationswerten. Berechnet wurden die Konstanten mit einem heterogenen Liganden-Detektionsmodell von Biacore®.

	Pat 44	Pat E 5	Monoklonaler anti-FVIII 2 <i>ESH8</i>
K_D 1 [mol L ⁻¹]	7.82×10^{-10}	4.39×10^{-10}	9.43×10^{-11}
K_D 2 [mol L ⁻¹]	4.60×10^{-10}	7.85×10^{-9}	

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine kinetische Analyse der Patientenantikörper mit großem Aufwand möglich war. Die Intra-Assay-Validierung war mit einer SD von 6,5 % zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte die Inter-Assay-Validierung in den Bindungssignalen sehr große Schwankungen (18,8 % CV) (Daten nicht gezeigt). Das konnte verschiedene Gründe haben. Zum einen schwankten die Immobilisierungsraten stark, da jedes Mal die Antikörper frisch isoliert wurden. Aufgrund der geringen anti-FVIII-Konzentration war eine Quantifizierung mittels Bradford nicht möglich. Zum anderen wurden die Patientenantikörper zuerst mit einer Protein-A/G-Säule aus dem Patientenplasma mittels pH-Verschiebung isoliert und, nachdem sie 2 h an den FVIII gebunden hatten, mit pH 2,8 abgetrennt. Das waren recht harsche Bedingungen, welche die Affinität von Antikörpern verändern konnten. Die Arbeitsgruppen von Lacroix-Desmazes und Moreau^{202,203} führten die Messungen zur Bestimmung der Kinetiken zwar analog durch, doch hatte das dort verwendete, große Volumen vermutlich einen stabilisierenden Effekt. Einen anderen positiven Einfluss könnten auch die frisch in Zellkultur produzierten Antikörper gehabt haben. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Plasmen wurden bei -80 °C gelagert und aufgetaut. Nicht zu vernachlässigen ist der Punkt, dass in der Publikation ein monoklonaler Patientenantikörper in Zellkultur produziert wurde und nicht ein ganzer Pool an verschiedenen Antikörpern vorhanden war. Außerdem wurde von keiner der beiden Arbeitsgruppen von Abweichungen innerhalb der Chips berichtet.

Schlussfolgernd ließ sich für die vorliegenden kinetischen Versuche festhalten, dass ein Weg gefunden worden war, aus 100 µl Patientenplasma die spezifischen Antikörper zu isolieren und die Affinitätskonstanten als Orientierungsgrößen zur Charakterisierung zu bestimmen.

4.4 Klinische Validierung des SPR-Biosensors

Zur klinischen Validierung des SPR-Biosensors unter möglichst realitätsnahen Bedingungen wurden ein Patientenkollektiv und eine Kontrollgruppe ausgesucht. Um genderspezifische Unterschiede^{207–209} auszuschließen, wurden die Teilnehmenden den zwei Gruppen entsprechend gleichermaßen zugeordnet. Zudem wurde das Alter berücksichtigt. So wurden im Klinikum rechts der Isar 30 Kontrollplasmen gesunder Menschen ausgewählt. Aus dem Hämophiliezentrum in München wurden 21 Hemmkörperplasmen gegen den FVIII und 9 Hemmkörperplasmen aus dem Hämophiliezentrum in Frankfurt eingesetzt.

4.4.1 Antikörperbestimmung mittels GTI-ELISA

Bevor die umfangreiche Messreihe auf dem FVIII-Chip durchgeführt werden konnte, galt es zu klären, ob die Kontrollplasmen eventuell nichtinhibitorische Antikörper enthalten. Am schnellsten und mit sehr wenig Plasmamaterial war die Überprüfung mittels ELISA möglich. Dieser Test hat zudem den Vorteil, dass er der SPR-Chip-Methode sehr ähnelt, da ebenso ein rekombinanter FVIII auf der Oberfläche immobilisiert wurde. Zudem ist der ELISA ein reiner Antikörpernachweis mit einem sekundären anti-Human-IgG. Das Verfahren unterscheidet sich prinzipiell vom Bethesda-Assay, in dem nicht nur die klinisch relevanten Antikörper detektiert werden, sondern alle bindenden Immunglobuline. Um die Messfehler so gering wie möglich zu halten, wurde ein kommerziell erwerblicher ELISA gewählt. Auf dem Markt gab es unterschiedliche Produkte. Die Wahl fiel auf den Immunoassay von Immucor (GTI ELISA), da er für die meisten Publikationen verwendet wurde und die Assay-Bedingungen von den Mitarbeitern der Firma sehr gut beschrieben wurden^{175,177}.

Für die erste Validierung sollte nur zwischen den klinisch relevanten und keinen FVIII-Antikörpern unterschieden werden. Erst in der weiteren Arbeit sollte auf die nichtinhibitorischen Antikörper eingegangen werden. Der GTI-ELISA besitzt laut Herstellerangaben eine Selektivität von 95,8 % und eine Spezifität von 89,1 %²¹⁰. Doch in der Publikation von Martin et al. wurden schlechtere Daten publiziert¹⁷⁵. Deswegen war es wichtig, für das hier eingesetzte Kollektiv eine eigene Spezifität und Sensitivität zu ermitteln. Die Spezifität eines Tests beschreibt den Anteil der Test-negativen Personen

unter allen Nicht-Erkrankten/Gesunden einer Stichprobe. Sie wird definiert als der Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus allen gemessenen Testergebnissen. Eine hohe Spezifität wird angestrebt, wenn eine Erkrankung bestätigt werden soll. Die Sensitivität beschreibt, die richtig-positiv Rate eines Tests. Berechnet wird sie in dem die „richtig als krank Erkannten“ durch die Anzahl aller Kranken geteilt wird. Eine hohe Sensitivität ist wichtig, wenn die Krankheit ausgeschlossen werden soll.

Die erzielten Ergebnisse waren schlechter als die der Herstellerangaben. Die Sensitivität mit den 30 eingesetzten Patientenplasmen und den 30 Kontrollen betrug für den GTI-ELISA 93,7 % und die Spezifität 88,2 %. Dies konnte verschiedene Gründe haben. Es konnte an dem vorliegenden Kollektiv liegen oder aber auch an den vom Hersteller eingesetzten vorgescreenten Proben. Ein weiterer Einflussfaktor war die Anzahl der Proben. Wenn bei 30 Proben einer als falsch positiv gilt, ergibt sich bereits eine Spezifität von 97 %. In diesem Fall können keine Werte >97 % erreicht werden.

4.4.2 FVIII-Antikörperdetektion mit vier verschiedenen FVIII-Präparaten auf einer Polycarboxylat-Oberfläche

Hämophilie-A-Patienten erhalten die unterschiedlichsten FVIII-Präparate²¹¹. Das Spektrum reicht von Kryopräzipitaten, wie Haemate®, was neben FVIII noch den von-Willebrand-Faktor, Albumin und weitere Proteine enthält, bis hin zu plasmatischen oder hoch gereinigten rekombinanten FVIII-Präparaten. Diese rekombinanten Präparate gibt es als sogenannte *full-length* Konzentrate oder *B-domain* entfernte Proteine. Präparate der älteren Generation werden durch die Zugabe von Albumin stabilisiert. Wobei die aktuellen Medikamente der 3. Generation ohne Zusatzproteine stabil sind und nur Salze und Zucker als Stabilisatoren zugefügt werden. Da in Fachkreisen weiterhin kontrovers diskutiert wird, welches Präparat die geringste Immunogenität hat, werden gegenwärtig alle Präparate verschrieben¹²⁰.

Für das Projekt war es interessant nachzuweisen, ob die Patientenantikörper unterschiedliche Anbindungen an die unterschiedlichen FVIII-Proteine zeigen. Dafür sollten möglichst viele Antigene auf einzelnen Chips immobilisiert werden. Es stellte sich heraus, dass nur die rekombinant hergestellten Proteine sich an die Oberfläche koppeln ließen (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden vier Proteine erfolgreich immobilisiert: zwei *B-domain-deleted*-FVIII-Präparate und zwei *full-length*-FVIII (Tabelle 11). Die Antigenität auf der Oberfläche wurde immer mit zwei verschiedenen, kommerziellen Antikörpern getestet. Erst wenn diese positive Ergebnisse zeigten, wurden die Patientenproben vermessen.

Tabelle 11: Übersicht der 4 verschiedenen FVIII-Proteine

Hersteller- name	Typ	Zelllinie	Pufferzusätze	Nährmedium
Kogenate®	<i>full-length</i>	Babyhamster- Nierenzellen	Glycin, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Histidin, Polysorbat 80, Saccharose	Humanes Albumin, rekombinantes Insulin
Advate®	<i>full-length</i>	Chinesische Hamster- Ovarien	Mannitol, Natriumchlorid, Histidin, Trehalose, Calciumchlorid, Trometamol, Tween 80, Glutathion (reduziert)	Nährstoffe pflanzlichen Ursprungs
ReFacto®	<i>B-domain- deleted</i>	Chinesische Hamster- Ovarien	Succrose, Natriumchlorid, L-Histidin, Calciumchlorid Dihydrat, Tween 80	Humanes Albumin, rekombinantes Insulin
Cedarlane®	<i>B-domain- deleted</i>	Chinesische Hamster-Ovarien	Histidin, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Tween 80	unbekannt

Kogenate® und Cedarlane® erbrachten sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Beide Proteine lagen in einer hochantigenen Struktur auf der Chipoberfläche vor, was an den hohen Bindungen der Hemmkörperplasmen an den FVIII erkennbar war (Abbildung 47 A/B). Die niedrigen Signale bei der Kontrollgruppe belegten im Umkehrschluss ebenfalls die native Proteinstruktur. Anders sahen die Messergebnisse mit den zwei anderen FVIII-Konzentraten aus. Es konnte nicht zwischen den zwei Kollektiven unterschieden werden. Advate® und ReFacto® waren in aminhaltigem Puffer gelöst. Die Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Moleküle banden mit einer höheren Affinität an die aktivierten Ester der Sensoroberfläche und machten damit eine Proteinimmobilisierung sehr ineffizient. Ein Pufferaustausch zu HEPES-Puffer erlaubte zwar eine gute Beladung der Oberfläche, jedoch war eine Messung mit den Patientenantikörpern nicht möglich (Abbildung 47 C/D). Die schlechte Bindung muss an dem Antigen gelegen haben und nicht an der Antikörperpräparation, da ein Ansatz in vier gleiche Teile aliquotiert wurde, sodass jedes Antigen die identische Probe erhielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immobilisierung dieser zwei Präparate nicht optimiert. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurde auf dem FL-FVIII Kogenate® und BDD-FVIII Cedarlane® durchgeführt (Kap. 4.4.3).

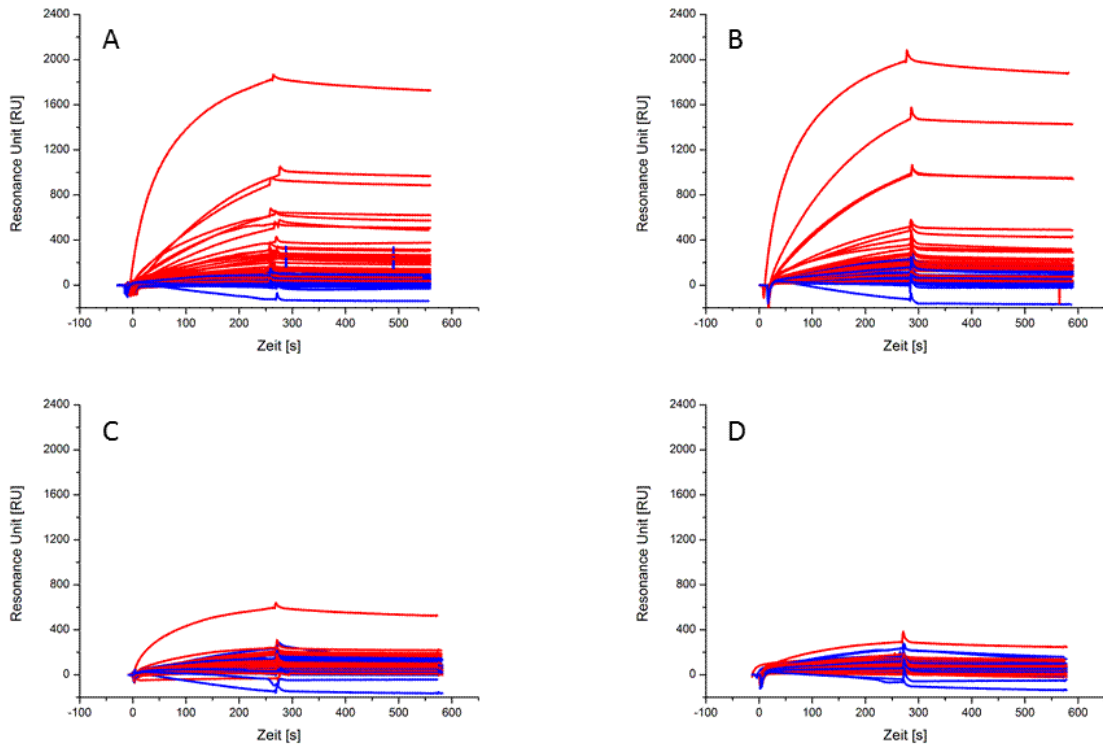


Abbildung 47: Umfassende Messreihe mit 4 verschiedenen FVIII-Antigenen auf Polycarboxylat-Chip. A: Kogenate®, B: Cedarlane®, C: ReFacto®, D: Advate®. Dargestellt ist die Anbindung der isolierten Antikörper von 30 Patientenplasmen (rot), 30 Kontrollplasmen (blau) (vorherige Inkubation der Protein-A/G-Säulen in Ethanolamin). Injektion: 45 µl Probe auf HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Die Spezifität wurde mit Hilfe der „receiver operating characteristic“ (ROC)-Kurve visualisiert und ausgerechnet (Tabelle 12) und der optimale *cut-off* mit dem Youden-Index berechnet (Formel 7):

$$\text{Youden-Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1 \quad \text{Formel 7:}$$

Der *cut-off* betrug bei FL-FVII 139 RU und beim BDD-FVII bei 96 RU.

Tabelle 12: Berechnung der Spezifität und Sensitivität anhand von ROC-Kurven des FL-FVIII und BDD-FVIII mit 30 Hemmkörperplasmen und 30 Kontrollplasmen.

	<i>Area under the Curve</i> (AUC)	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
FL-FVIII	0,95	90,0	85,7
BDD-FVIII	0,83	96,4	60,0

4.4.3 Reproduzierbarkeit der Messungen auf dem FL-FVIII- und BDD-FVIII-Sensorchip

Von großer Bedeutung war die Reproduzierbarkeit der Messungen. Alle Messungen wurden auf unterschiedlichen Chips und mit unterschiedlichen Protein-A/G-Säulen 4 mal wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass der CV zwischen 10-30 % variiert (Tabelle 13). Dabei war zu beachten, dass die intra-Assay-Varianz, also die Schwankung eines Messwertes innerhalb einer Messserie auf einem Chip, bei 9 % lag. Die Schwankungen eines Patientenplasmas von Chip zu Chip, die sogenannte inter-Assay-Varianz, lag bei ca. 20 %. Es war oft der Fall, dass die selbsthergestellten Biosensoren untereinander eine höhere Varianz zeigten als innerhalb einer Messreihe. Aufgrund der vielen Schritte der Versuche wurden möglicherweise Fehler addiert. Die Protein-A/G-Säulen wiesen eine Standardabweichung von 10 % nach Herstellerangaben auf, was sich mit den experimentellen Ergebnissen deckte.

Tabelle 13: Übersicht zu drei anti-FVIII-Ak Bestimmungsmethoden (ELISA, Bethesda-Assay und SPR-Sensor) ohne nicht-inhibitorische Antikörperplasmen

Patienten- bezeichnung	ELISA	Bethesda	Kogenate®	CV	Cedarlane®	CV
	[OD]	cut-off 0,6 [BU/ml]	[RU]	[%]	[RU]	[%]
E 1	2,74	466	1462,9	33,6	1252,3	35,8
E 10	1,21	2	551,6	34,3	455,8	39,7
E 11	0,92	1	464,7	25,4	332,9	28,3
E 12	0,8	0,7	345,5	17,4	260,8	41,8
E 2	0,7	0,6	301,3	28,8	181,9	38,1
E 3	1,17	2	347,6	22,3	188,2	19,4
E 4	1,91	6	599,6	39,6	572,5	29,1
E 5	1,42	3	419,3	19,8	323,6	17,7
E 6	1,17	2	164,7	15,9	222,3	10,3
E 7	1,27	3	482,5	30,4	490	28,5
E 8	0,84	1	368,5	47	362,1	31,1
E 9	1,27	1	561,6	24,2	480,4	31,2
Frankfurt 1	0,86	9,7	247,2	27,8	542,9	54,3
Frankfurt 2	2,49	153,6	777,8	20,8	1065,2	24,5
Frankfurt 3	2,49	48,1	530,6	35,2	734,3	22
Frankfurt 4	0,83	7	586,6	35,3	757,8	20,9
Frankfurt 5	2,21	16	646	52,3	845,3	23,1
Frankfurt 6	1,72	37,8	371,2	32,2	598,4	42,3
Frankfurt 7	1,79	8,5	426,2	38,4	492,7	7,4
Frankfurt 8	0,94	3	398,4	27,4	427,1	37,3
Frankfurt 9	1,77	4,9	834,6	38,2	873	32,6
Pat 1928	0,97	3	423,8	21,8	432,6	5,3
Pat 1935	1,07	3	434,2	38,9	590,2	42,1
Pat 1947	2,01	n.b.	517,5	33,4	480,7	9,9
Pat 227	0,59	4	468,6	42,2	460,3	34,2
Pat 39	0,99	2	150,9	33,5	116,4	17,9
Pat 43	2,36	78	414,3	53,2	459	23
Pat 44	2	37	354,4	35,8	431,6	16,9
Pat 45	2,33	45	222,7	31,8	251,5	7,3
Pat 46	1,98	23	426,2	22,5	370,4	19,7

4.4.4 Einordnung der Patienten nach RU-Signalen an die FVIII-Proteine

Die vielen generierten Daten (Tabelle 13) gaben eine semiquantitative Auskunft über das Anbindungsverhalten der Patientenantikörper an die zwei verschiedenen FVIII-Präparate. Die Anbindungen ließen sich aufgrund der RU-Signale zwischen den zwei Proteinen in 3 Gruppen einteilen:

1. Verstärkte Bindung an den FL-FVIII,
2. Verstärkte Bindung an den BDD-FVIII,
3. Gleich intensive Bindung an beide Präparate.

Das Ergebnis war nicht erstaunlich, denn es wurde bereits in vielen Publikationen beschrieben, dass unterschiedliche Präparate eine unterschiedliche Immunogenität beim Patienten aufweisen. So wurde in einer Metaanalyse mit 29 Kliniken und 2350 Patienten eine erhöhte Antigenität von BDD-FVIII beobachtet²¹²

Viel diskutiert ist das Risiko der Inhibitorenentwicklung bei rekombinanten Produkten im Vergleich zu Plasma-isolierten Produkten. Goudemand et al.²¹³ publizierten 2006 eine Studie mit 148 zuvor unbehandelten Patienten, wovon 62 mit plasmatischen FVIII und 86 mit rekombinanten FVIII (rFVIII) therapiert wurden. Sie beobachteten, dass mehr Patienten, die mit dem rFVIII behandelt worden waren, einen Hemmkörper entwickelten als die Patienten mit plasmatischem FVIII. Eine Publikation aus *The New England Journal of Medicine*²¹⁴ fasst jedoch zusammen, dass das Risiko bei beiden Präparaten gleich hoch ist. Ausgenommen sind rekombinante FVIII der zweiten Generation, also solche mit Zugabe von Plasmaproteinen in der Zellkultur. Die dritte Generation ist komplett frei von Blutadditiven während der Expression. Somit bleibt die Diskussion, welches Produkt das bessere in Bezug auf die Inhibitorenentwicklung ist, wahrscheinlich noch lange offen, da die Krankheit so selten ist. Letztere Tatsache erschwert es, die Kollektive wirklich gleich zu verteilen und große Kohorten zu rekrutieren.

Hieraus resultiert, dass es nicht trivial ist, eine klare Aussage über die Medikamentenwahl zu treffen. Ein Biosensor mit mehreren Antigenen könnte weiterhelfen. Es wäre denkbar, mit der entwickelten SPR-Methode Bindungsereignisse von Patientenantikörpern an verschiedene FVIII-Präparate zu untersuchen und zu evaluieren, welches Medikament das kleinste Signal zeigt. Während der Arbeit wurde kein direkter Präparatewechsel bei einzelnen Patienten durchgeführt, da es dafür eines Ethikvertrages bedarf. Es wäre jedoch vielversprechend dieser Problematik in zukünftigen Arbeiten nachzugehen.

Zusammenfassend ließ sich bezüglich der Etablierung des FVIII-Chips folgern, dass die anti-FVIII-Ak mit der gleichen Sensitivität und Spezifität detektiert werden konnten wie mit der ELISA-Methode. Zusätzlich hatte die Biosensorchip-Methode den Vorteil, dass die Anbindung in Echtzeit verfolgt und eine semiquantitative Aussage über die Affinität getroffen werden konnte.

Da die FVIII-Proteine auf dem Biosensorchip von den Antikörpern erkannt wurden, sollte überprüft werden, ob sich der physiologische Tenasekomplex auf der Oberfläche darstellen lässt.

4.5 Etablierung eines biomimetischen FVIII-Biosensors

Die markierungsfreie Echtzeitmessung der SPR-Technologie ermöglicht die Visualisierung mehrerer Bindungspartner parallel an einem Protein, wie es z.B. aus der *Capture*-Methode bekannt ist²¹⁵⁻²¹⁷. Eine andere Mehr-Schritt-Anwendung ist das *Epitop-Mapping* von Proteinen mittels unterschiedlicher Antikörper. Bestätigen lässt sich dies mit der Studie von Christensen et al.²¹⁸, in der verschiedene Antikörper untersucht wurden, die gleichzeitig in der Lage waren, zwei verschiedene Epitope zu erkennen, ohne sich sterisch zu behindern. In Analogie dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konzept eines biomimetischen Biosensors entworfen. Die physiologischen Interaktionspartner des FVIII wurden sofort nach der Injektion der anti-FVIII in die Durchflusszelle auf den immobilisierten FVIII-Liganden gegeben. Mit dieser Assay-Erweiterung könnte eine mögliche Antikörper-induzierte Inhibierung der relevanten Bindungsstellen des FVIII auf dem Sensor überprüft werden, was zuvor nur in einem funktionalen Test möglich war.

4.5.1 Vorversuche mit einer Mischung aus Gerinnungsfaktoren (Cofact®)

Die Etablierung wurde mit dem Cofact®-Präparat (Kap. 3.1.2) begonnen, da dieses Präparat alle relevanten Gerinnungsfaktoren enthielt (3.1.2). Als ein Thrombinkomplex-haltiges Präparat besaß es laut Herstellerangaben die Blutgerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie Protein C und S. Das Mischpräparat hatte, wie erwartet, mit einem sehr hohen Signal (ca. 3.000 RU) an den FVIII gebunden (Abbildung 48). Es zeigte sich aber auch, dass eine andere Abspaltlösung benötigt wurde, da nach 4 Injektionen die Anbindung bereits um 50 % abgenommen hatte (Abbildung 48). Aus diesen Ergebnissen ließ sich auf eine Konformationsänderung des Gerinnungsfaktors schließen. Deswegen musste die Regeneration optimiert werden. Mit 10 mM NaOH und 1 M NaCl ließen sich alle Gerinnungsfaktoren entfernen, da sie eine geringere Affinität zu FVIII als FVIII-Antikörper haben⁹⁴. Der Anbindungsverlust war bei 10 konsekutiven Messungen nur 9,6 % (Daten nicht gezeigt). Die Werte entsprachen denen, die bei der Antikörper-Messung erzielt worden waren. Ein stabiler Chip mit reproduzierbaren Ergebnissen ist die Grundlage für eine zuverlässige Messung.

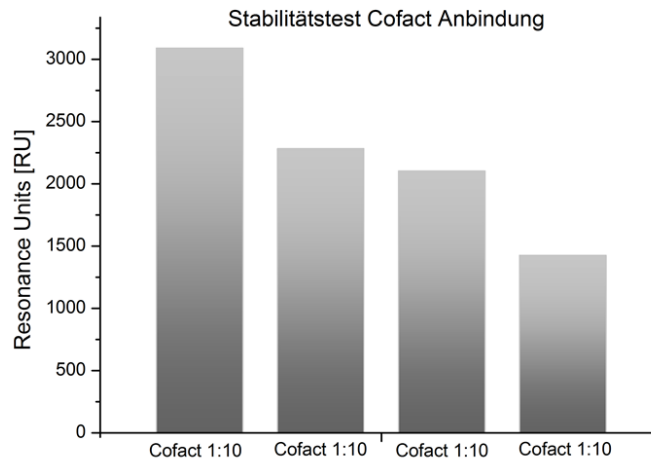


Abbildung 48: Bindung des Cofact-Präparates (1:10 verdünnt) an den kovalent immobilisierten FL-FVIII auf einer Polycarboxylat-Oberfläche. Injektion: 45 µl Cofact® (in HEPES-Laufpuffer verdünnt). Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Die wichtige Frage, ob Patientenantikörper die Anbindung der relevanten Interaktionspartner hemmen, galt es weiterhin zu klären. Deswegen wurden zuerst die isolierten FVIII-Antikörper und sofort im Anschluss das verdünnte Prothrombin-Komplex-Präparat injiziert. Die Cofact®-Kurven in Abbildung 49 zeigten eindeutig, dass es keinen Bindungsunterschied des Cofact®-Präparates zwischen den Kontrollen und den Patientenantikörpern nach der Injektion der Antikörper gab. Die zweite Bindungskurve war bei beiden Kollektiven gleich hoch. Erklären ließ sich diese Bindung mit den physiologischen Wechselwirkungen des FVIII. Die Inhibitoren hemmen die Gerinnung. Das bedeutet, dass vermutlich die Interaktion mit FIX und FX, nicht aber der Kontakt mit den antikoagulatorischen Proteinen C und S, gehemmt ist. Die Kurven spiegelten die Summe der Anbindungen wider, weswegen kein Unterschied zwischen den Antikörpern der Patienten bzw. der Kontrollen zu erkennen war. Aus diesem Grund mussten die Versuche mit reinen Faktoren-Präparaten durchgeführt werden.

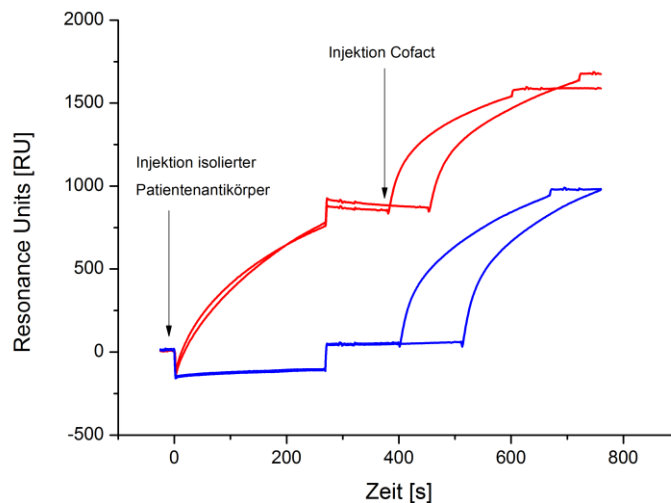


Abbildung 49: Bindung der isolierten Antikörper von 2 Patientenplasmen (rot) und von 2 Kontrollplasmen (blau) mit anschließender Injektion von Cofact®. Injektion: 45 µl isolierte Antikörper und 1:100 verdünntes Cofact in HEPES-Laufpuffer auf HC-Oberfläche mit kovalent immobilisierten FL-FVIII. Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

4.5.2 Erweiterung des anti-FVIII-Assays mit FIX und FXa Injektion

Aus den Vorversuchen (Kap. 4.5.1) konnte abgeleitet werden, dass reine FIX und FX Konzentrate verwendet werden müssen, um die exakten Wechselwirkungen zu bestimmen. Als FIX Präparat wurde der rekombinante BeneFIX® verwendet (siehe Kap 3.1.2). Zu dieser Zeit gab es in Deutschland keinen zugelassenen, rekombinanten FX. Folglich wurde ein aus humanem Plasma gereinigter FXa verwendet. Beide Produkte waren laut Herstellerangaben zu 95 % rein. Die Bedingungen der Messungen waren ansonsten analog zu den Cofact®-Versuchen (Kap. 4.5.1).

Angefangen wurde mit FIX, weil dieser die meisten Bindungsstellen am FVIII aufweist²¹⁹. FIX ist eine 57 kDa große Serinepeptidase. Sie hydrolysiert ein Arginin im FX zu Isoleucin und aktiviert ihn somit²²⁰. Außerdem wird in vielen Publikationen von starken Blutungen berichtet, wenn Antikörper die FIX-Bindedomäne A2 und die A3 blockieren^{219,221,222}. Die Hemmkörper blockieren sterisch die Bindung des FIX und unterdrücken damit die katalytische Wirkung des FVIII²²³. Das Ergebnis der Komplexbildung von FVIIIa, FIXa und FX mit Phospholipiden und Calcium-Ionen wird als Tenasekomplex bezeichnet. Dieser befindet sich an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und sorgt für die Aktivierung des FX²²⁴. Die Aktivierung des FX kann daraufhin mit 200.000fach stärkerer Reaktionsgeschwindigkeit stattfinden^{225,226}. Folglich sollte geklärt werden, ob die Antikörper wirklich die Bindungsstellen blockieren.

Zuerst wurde die prinzipielle Bindung an den immobilisierten FVIII kontrolliert. Diese Ergebnisse waren positiv (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden isolierte Antikörper, wie für den Antikörpernachweis, injiziert. Im direkten Anschluss wurde das BeneFIX®-Präparat auf den Sensorchip gegeben. Ohne jegliche Optimierung war sofort eine klare Differenzierung zwischen den beiden Kollektiven zu erkennen. Abbildung 50A veranschaulicht die Bindung der nichtinhibitorischen Antikörper an den FVIII mit konsekutiver Bindung des FIX. Abbildung 50B zeigt, dass eine Diskriminierung zwischen physiologisch aktiven und irrelevanten Antikörpern uneingeschränkt möglich war. Das hieß, die Überprüfung der Gerinnung war mit dem entwickelten Biosensor *in vitro* möglich. Dieser Nachweis gelang zuvor nur mit einem funktionellen Test.

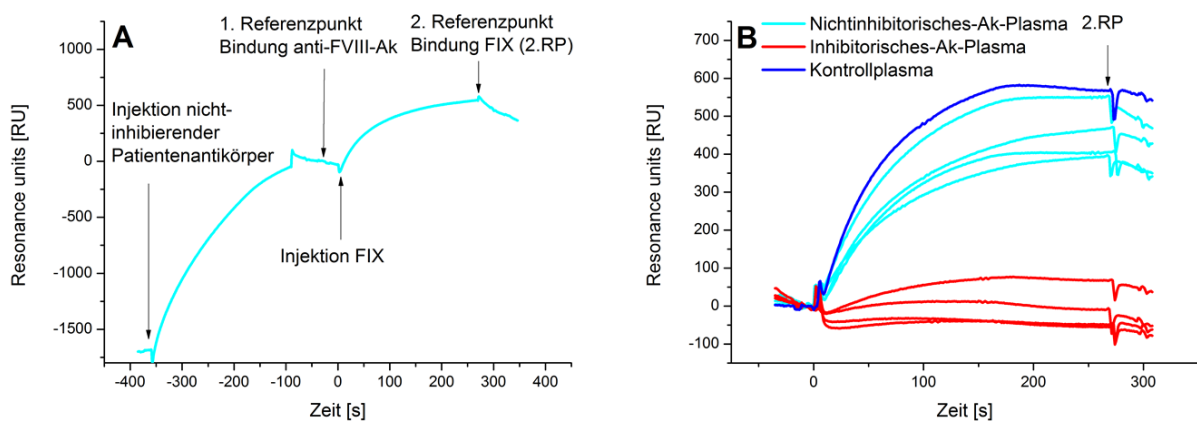


Abbildung 50: Sensorgramme des erweiterten anti-FVIII-Ak-Assays. A) Bindung der isolierten, nichtinhibitorischen FVIII-Antikörper eines Patienten mit anschließender Bindung von FIX (BeneFIX®). B) Sensorgramm-Ausschnitt der BeneFIX®-Anbindung am Beispiel von 4 inhibitorischen Antikörpern (rot), 4 nichtinhibitorischen Ak (türkis) und eines Kontrollplasmas (blau). Immobilisiert war der FL-FVIII auf der Polycarboxylat-Oberfläche. Flussrate: 10 µl/min, 25 °C.

Nachdem FIX erfolgreich an den immobilisierten FVIII komplexiert werden konnte, galt es zu klären, ob die Anbindung des FXa ebenfalls nachgewiesen werden kann. Auch hier zeigte sich die inhibierende Wirkung der Immunglobuline (Abbildung 51). Der FVIIIa, FIXa, Phospholipide und Calcium-Ionen aktivieren zusammen den FX. Wenn die A1- und C2-Domäne blockiert sind, kann FX nicht an FVIII binden²¹⁹.

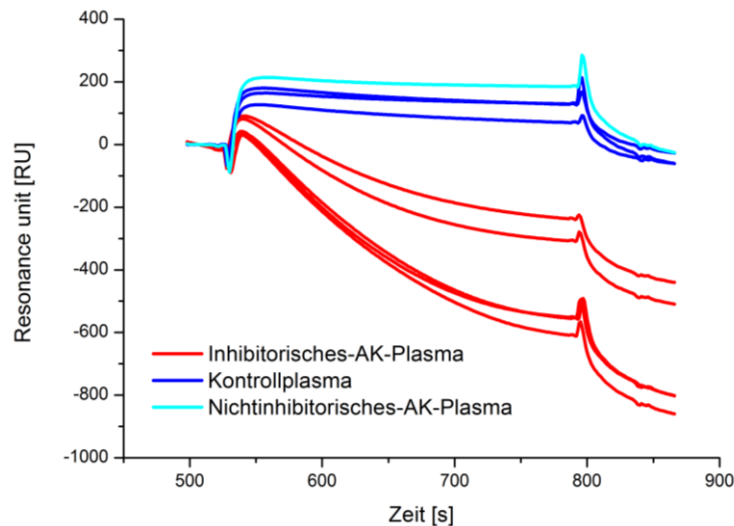


Abbildung 51: Bindung von Faktor Xa nach Injektion der verschiedenen isolierten Patientenantikörper (Sensogramm-Ausschnitt). 4 inhibitorische Antikörper (rot), 1 nichtinhibitorischer Ak (türkis) und 3 Kontrollplasma (blau). Immobilisiert war der FL-FVIII auf der Polycarboxylat-Oberfläche. Flussrate: 10 μ l/min, 25 °C.

Für diese biomimetrische Mehr-Schritt-Analyse wurden nun 16 Patientenplasmen, 12 Kontrollen und 5 nichtinhibitorische Patientenplasmen eingesetzt. Die Versuche konnten nicht mit den zuvor verwendeten 30 Hemmkörperplasmen durchgeführt werden, weil nicht mehr alle Plasmen zu der Zeit vorhanden waren.

Um alle Messungen in einer Abbildung übersichtlich darzulegen, wurde eine Box-Plot-Darstellung gewählt. Dafür wurde der RU-Wert nach Ende der Injektion von FIX bzw. FXa verwendet. Dieser Punkt wurde als Referenzpunkt 2 bezeichnet. Bei den Messungen zeigte sich eine klare Auftrennung zwischen den zwei anti-FVIII-Typen. Es gab keine Überschneidung der Kollektive, sodass kein *cut-off* berechnet werden musste (Abbildung 52A). Die Ergebnisse der Interaktionsmessungen mit FXa glichen größtenteils den Ergebnissen der Interaktionsmessungen mit FIX (Abbildung 52B). Ausnahmen bildeten die Hämophilie-A-Patienten 85 und 29, welche Interaktionen mit FXa, aber keine Interaktionen mit FIX zeigten. Das ist damit zu begründen, dass Patienten bluten, wenn sie Antikörper gegen die A2 Domäne haben. Das heißt, dass der FIX nicht anbinden kann. In vielen Publikationen wird die Bindung zwischen FVIII und FIX als Schlüsselfunktion bezeichnet^{219,224}. Wenn diese Bindung nicht stattfinden kann, besteht bei den Patienten eine ausgesprochene Blutungs-Diathese.

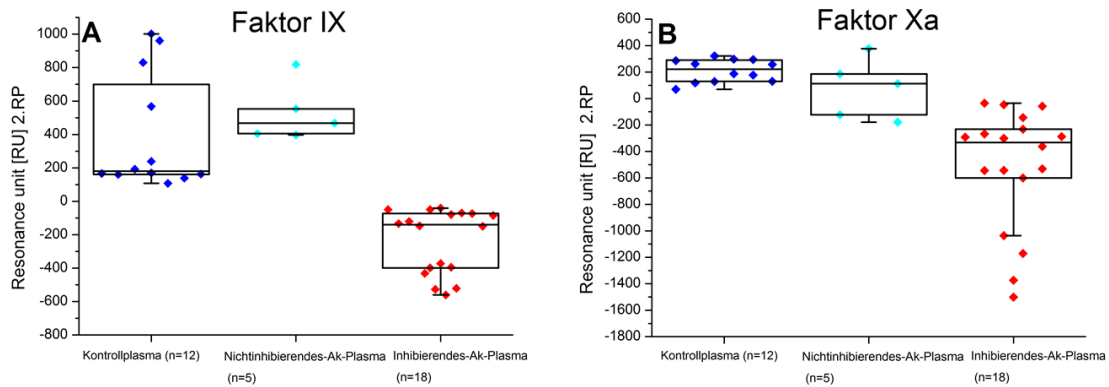


Abbildung 52: Bindung der isolierten Antikörper aus 2 Patientenkollektive (Plasma) und den Kontrollplasmen, jeweils wiedergegeben mit dem zweiten Referenzpunkt nach Injektion von FIX oder FXa (Box Plot Diagramme). Immobilisiert war der FL-FVIII auf der Polycarboxylat-Oberfläche, Flussrate: 10 μ l/min, 25 $^{\circ}$ C.

Den Inhibitionsmechanismus, welcher durch die Antikörper initiiert wird, versuchten Matsumoto et al.²²⁴ 2012 zu klären. Sie postulierten, dass die Bindung des FVIII-C2-Antikörpers die Tenasekomplexbildung sterisch hindert. Das belegt, dass die Bindung von FVIII zu FIXa ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der inhibitorischen Eigenschaften ist. Die Erkenntnisse von Matsumoto et al. konnten durch die Messung der Interaktionen von FIX bzw. FXa bestätigt werden. Die Ergebnisse gaben interessante Einblicke in die FVIII-Komplexbildung, die mit den üblichen Methoden nicht visualisiert werden können. Der biomimetische Biosensor integrierte die Informationen eines ELISA und gab einen Hinweis auf die inhibitorischen Eigenschaften der gebundenen Antikörper in einer einzigen Messung. Die Interaktion konnte auch ohne Phospholipide stattfinden, weil der FVIII kovalent an die Biosensoroberfläche gebunden war.

Leider konnte das Protokoll mit der zusätzlichen Anbindung des vWFs nicht erweitert werden, da es technische Probleme gab. Der rekombinante vWF präzipitierte beim Auftauen und konnte erst nach Erwärmen oder mit Ultraschall gelöst werden. Das beeinflusste aber seine tertiäre Struktur, sodass er nicht an FVIII band (Daten nicht gezeigt). Haemate[®] konnte als Mischpräparat nicht die richtige Aussage liefern, da es zusätzlich FVIII und Albumin enthielt und das Bindungsprotein an den FVIII nicht identifiziert werden konnte. Jedoch ist beschrieben, dass viele Antikörper gegen die C2-Region binden und somit die Bindung von vWF und Phospholipide hemmen^{227,228}. Somit bleibt diese Assay-Erweiterung eine sehr spannende Aufgabe für nachfolgende Arbeiten. Eine weitere Anwendung des biomimetischen Biosensor wäre die Analyse der Antikörper in Bezug auf den Epitopenverlauf des einzelnen Patienten über die Zeit, wie von Fulcher et al. beschrieben¹⁹⁵. Damit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass der biomimetische SPR-Biosensor ein äußerst spannendes Testformat ist, mit dem sich einfach und im Online-Verfahren physiologische Reaktionen beobachten lassen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensor entwickelt, um humane Faktor VIII-Antikörper detektieren und charakterisieren zu können. FVIII-Antikörper treten bei rund 30 % der Hämophilie-A-Patienten gegen ihr FVIII-Konzentrat auf⁹. Zusätzlich können, meistens im höheren Lebensalter, sogenannte erworbene Hemmkörper gegen den intrinsischen FVIII auftreten. Beide, allo- und auto-anti-FVIII, führen zu lebensgefährlichen Blutungen²²⁹. Eine analytisch sensitive Methode, um diese sogenannten Hemmkörper zu verifizieren, ist sehr wichtig, um eine geeignete Therapie einzusetzen und die Patienten so vor Blutungen zu schützen. Nicht zu vernachlässigen sind die enormen Kosten, die mit einer gezielten Therapie eingespart werden könnten.

Im ersten Teil der Arbeit stand die Generierung einer geeigneten Oberfläche für vier verschiedene rekombinante FVIII-Präparate im Fokus. Die verschiedenen Antigene wurden kovalent mithilfe von EDC/NHS-Biokonjugationschemie an die Carboxygruppen der Polycarboxylat-Hydrogel-Oberfläche immobilisiert. Verschiedene Antigene wurden ausgewählt, da Patienten unterschiedlichste FVIII-Präparate erhalten. Die Frage sollte beantwortet werden, ob die anti-FVIII-Ak verschiedene Epitope erkennen. Immobilisiert wurden zum einen zwei *full-length*-FVIII und zum anderen zwei *B-domain-deleted*-FVIII als Antigen. Zuerst wurden Antikörperkontrollen in Form von monoklonalen und polyklonalen anti-FVIII-Ak eingesetzt. Sie zeigten das gewünschte positive Bindungsverhalten.

Es ist bekannt, dass FVIII mit vielen anderen Gerinnungsproteinen interagiert⁶³. Um zu überprüfen, welche Proteine auf dem Chip interagieren, wurden unter Verwendung von drei verschiedenen Mangelplasmen unspezifische Bindungen an den FVIII verifiziert. Es stellte sich heraus, dass der von-Willebrand-Faktor entscheidend für diese unspezifischen Anbindungen war. Um diese zu eliminieren, wurden die anti-FVIII-Ak mittels Protein-A/G-Säulen aus den Patientenplasmen isoliert. Die Probenaufarbeitung wurde hinsichtlich der Stabilität der Antikörper und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Säulen validiert. Gleichzeitig wurden die Assay-Bedingungen optimiert, sodass bis zu 70 Messungen pro Chip mit max. 10 % Aktivitätsverlust durchführbar waren. Dies ermöglichten ein optimierter Puffer und optimierte Regenerationsbedingungen. Die Assay-Bedingungen zeigten stabile und valide Konditionen.

Um die Sensorgramme der Antikörperanbindung vertiefend zu charakterisieren, wurde ein Analysekonzept, nämlich die Oberflächenimmobilisierung von humanen anti-FVIII mit sukzessiver Anbindung von FVIII als Ligand, angewandt. Hierfür wurden die kinetischen Konstanten von zwei Patientenantikörpern und einem monoklonalen Antikörper bestimmt. Als Proben wurden ein

hochtitriges und ein niedrigtitriges Patientenplasma gewählt. Die Ergebnisse waren so gut, dass eine qualitative Aussage über die Komplexbildung der zwei Proteine gemacht werden konnte.

Um unter den erarbeiteten Bedingungen eine klinische Validierung zu beginnen, wurden zwei Kollektive, Hemmkörperplasmen und Kontrollplasmen, mit gleichverteilter Geschlechtszugehörigkeit und gleichem Altersspektrum zusammengestellt. Hämophilie A ist eine seltene Krankheit. Um statistisch relevante Daten zu generieren, wurden 30 Hemmkörperplasmen und 30 Kontrollplasmen verwendet. Als Referenzmethode wurden alle Plasmen mittels GTI anti-FVIII-ELISA nach Antikörpern untersucht. Bethesda-negative Plasmen und Kontrollplasmen, die im ELISA positiv waren, zählten als nichtinhibitorische Antikörperplasmen. Somit ergaben sich 3 Gruppen von Antikörpern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die vier FVIII-Oberflächen mit verschiedenen Patientenplasmen, die Hemmkörper enthielten, evaluiert. Es stellte sich heraus, dass Advate® (FL-FVIII) und Refacto® (BDD-FVIII) nicht für den Nachweis von anti-FVIII-Ak geeignet waren. Deswegen wurden nur Kogenate®(FL-FVIII) und Cedarlane® (BDD-FVIII), die eine sehr gute Auftrennung zwischen den zwei Kollektiven zeigten (4fach-Bestimmungen), für die folgenden Versuche verwendet. Die Sensitivität für Kogenate® betrug 90,0 % und die Spezifität 85,7 %. Cedarlane® erreichte einer Sensitivität von 96,4 % und eine Spezifität von 60,0 %. Das Ergebnis war sehr zufriedenstellend für ein sensibles System. Trotz der vielen Aufarbeitungsschritte war das System genau so gut wie der kommerziell erwerbliche ELISA. Der SPR-Biosensor hatte sich als sehr valides Tool für die Detektion von allo-, auto- und nichtinhibitorischen Antikörpern erwiesen.

Um den Mehrwert der Echtzeitdetektion der SPR-Technologie auszunutzen und gleichzeitig die Patientenantikörper besser zu charakterisieren, wurde der Assay erweitert. Nicht nur eine Antigen-Antikörper-Bindung, sondern auch eine weitere Mehrschritt-Reaktion sollte analysiert werden. Im Detail sollte geklärt werden, welche Epitope die Antikörper blockieren und welche ihre Funktionsweise nicht beeinträchtigen. Dafür wurde sofort nach der Antikörperinjektion der Faktor IX bzw. der FXa injiziert. Eindeutig konnte gezeigt werden, dass die Bindung des FIX komplett durch die inhibierenden FVIII-Antikörper unterdrückt wurden. Beim FXa gab es 2 nichtinhibitorische Patientenproben, bei denen eine Bindung von FXa an FVIII beobachtet wurde.

Der in der Arbeit entwickelte FVIII-Biosensor ist ein sehr vielseitiges Instrument zur Diagnose von erworbenen und hereditären FVIII-Antikörpern. Gleichzeitig ließen sich die Antikörper unter Verwendung von Interaktionspartnern charakterisieren und die blockierten Epitope verifizieren.

In Zukunft wäre ein Multiplex-Biosensor mit vielen FVIII-Präparaten denkbar, um für jeden Patienten das am wenigsten immunogene Präparat herauszufinden. Das wäre ein Schritt in Richtung personalisierte Medizin. Ein anderer interessanter Ansatz wäre die Charakterisierung der Antikörper,

um den Verlauf der Inhibitoren zu beobachten und daraus Schlussfolgerungen hinsichtlich der Blutungshäufigkeit des Patienten zu ziehen oder um die inhibierende Wirkung besser zu verstehen. Außerdem könnte der Assay in Bezug auf die anderen Interaktionspartner, wie vWF und Phospholipide, erweitert werden.

Die möglichen Anwendungsfelder des neuen SPR-Assay könnten zukünftig nicht nur helfen die Behandlung für den Patienten effizienter und damit angenehmer zu gestalten, sondern ggfs. auch zu einer Senkung der Behandlungskosten beizutragen.

6 Summary

In this work, a novel surface plasmon resonance biosensor was developed to detect as well as to characterize human factor VIII antibodies. FVIII antibodies are being developed by about 30 % of hemophilia A patients as a consequence of therapy with FVIII concentrates, and are directed against these supplements. Additionally, mostly in the elderly, so-called acquired inhibitors occur against the intrinsic FVIII. Both allo- and auto-anti-FVIII antibodies lead to life threatening bleedings. A sensitive analytical method to detect and quantify these inhibitors is very important to decide for an appropriate treatment and minimizing the risk of bleeding episodes. Furthermore, with a targeted therapy, high costs could be prevented.

First, a suitable surface had to be found for the immobilization of four different recombinant FVIII proteins. The proteins were covalently attached to a polycarboxylate hydrogel surface using amine coupling reaction with EDC/NHS. Different antigenic proteins were chosen, because patients receive a wide variety of FVIII preparations. The question was, whether anti-FVIII antibodies from different patients taking different therapeutics, recognize different epitopes. Therefore, two full-length FVIII and two B-domain-deleted FVIII were chosen. Functional immobilization of the proteins and specific recognition was ascertained with a monoclonal as well as a polyclonal anti-FVIII antibody.

FVIII interacts with many other coagulation factors. This leads to elevated background signals when measuring human plasma samples. Identification of the respective interfering proteins was accomplished by using three different deficient plasmas. The experiments showed, that von Willebrand factor was responsible for the unspecific interaction. To eliminate this, the anti-FVIII antibodies from patient samples were isolated with protein A/G columns and stability of the purified proteins as well as reproducibility of the chromatographic columns was validated. Assay conditions were optimized and showed for up to 70 measurements on one chip with less than 10 % loss of binding signal.

A characterization of the patients' antibodies in terms of kinetic parameters was the next step. To this end, two patients' antibodies as well as a monoclonal antibody were covalently immobilized and interaction with a FVIII protein-solution of defined concentration was monitored. A high-titre sample and a low-titre patient plasma were selected. This set up allowed a qualitative statement about the complex formation of the two proteins, namely the anti-FVIII with the FVIII protein.

Evaluation of the biosensor was performed with a set of hemophilia patients plasma (n=30) and control plasma (n=30). As a reference, all samples were analyzed with an anti-FVIII antibody ELISA.

Bethesda negative and control plasmas, positive in the ELISA, are defined as "non-inhibitory" antibody samples.

Following on that, the patient samples and the control samples were investigated on the four different FVIII surfaces. Advate[®], a full-length (FL) FVIII and ReFacto[®] a B-domain deleted (BDD) FVIII were not suitable for the detection of anti-FVIII. Kogenate (FL-FVIII) and Cedarlane[®] (BDD-FVIII) showed a good discrimination between the two collectives. Sensitivity for Kogenate was calculated as 90.0 % with a specificity of 85.7 %. Cedarlane[®] gave a sensitivity of 96.4 % and a specificity of 60.0 %. Although many processing steps are necessary, the biosensor gives excellent results and is as good as the commercially available ELISA system.

After the SPR biosensor had proved to be a valid tool for the detection of allo-, auto- and non-inhibitory antibodies the assay was extended to a multi-step binding reaction. Thereby, the real-time detection of the SPR technology is a great advantage. In detail, it should be clarified, which physiological interactions, e.g. with other coagulation factors, are hindered due to binding of the pathological antibodies. To this end, FIX and FXa were injected immediately after the antibody sample injection, respectively. Clearly it was shown that the binding of FIX was completely suppressed by the inhibitory FVIII antibodies. For FXa, only two non-inhibitory patient samples did not prevent the binding of FXa to the immobilized FVIII.

The FVIII biosensor, developed in this work was a very versatile tool for the detection of hereditary and acquired FVIII antibodies. At the same time, the antibodies could be characterized, using multi-step interaction analysis.

Future developments could include a multiplex biosensor with several FVIII therapeutics to determine the least immunogenic drug for each patient, providing a more personalized medicine. Another interesting approach would be to characterize the antibody in terms of changing epitopes over time. From the course of antibody development, one could draw conclusions regarding the incidence of bleeding episodes, or gain a better understanding of their inhibitory effects. In addition, the assay could be extended with respect to the other interaction partners, such as the vWF and phospholipids.

7 Abkürzungsverzeichnis

2D / 3D	Zweidimensional / dreidimensional
AAV	Adeno-assoziiertes Virus, <i>adeno-associated virus</i>
AK	Antikörper
anti-Faktor VIII	Antikörper mit Spezifität für Faktor VIII
aPTT	Aktivierter, partieller Thromboplastinzeit, <i>activated partial thromboplastin time</i>
avWS	Erworbenes von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, <i>acquired von Willebrand Syndrome</i>
BDD-FVIII	Faktor VIII ohne B-Domäne, <i>B-domain Deleted Factor VIII</i>
BSA	Albumin aus bovinem Serum, <i>bovine Serum Albumin</i>
BU	Bethesda-Einheit, <i>Bethesda Unit</i>
CMD	Carboxymethyldextran
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F _{ab}	Antigen-bindender Anteil eines Antikörpers, <i>fragment antigen binding</i>
FC	Flusszelle, <i>flow cell</i>
F _c	Konstanter Teil eines Antikörpers
F1a	Fibrin
F11a	Thrombin
FIX	Faktor IX, Christmas-Faktor, Antihämophiles Globulin B
FL-FVIII	Volllängen-Faktor VIII, <i>full-length factor VIII</i>
FVa	Aktivierter Faktor V, Proaccelerin
FVIII	Faktor VIII, antihämophiles Globulin A
FX	Faktor X, Stuart-Prower-Faktor, Thrombokinase
FXIII	Faktor XIII, Fibrin-stabilisierender Faktor
GPIb	Thrombozyten-Rezeptor Glykoprotein Ib
HC	<i>Hydrogel Coating with polycarboxylate</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus, <i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin

ip	Isolelektrischer Punkt
IU	Internationale Einheit, <i>international unit</i>
kDa	Kilodalton, <i>kilo dalton</i>
LED	Leuchtdiode, <i>light-emitting diode</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
NHS	N-Hydroxysuccinimid, 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROC	Grenzwert-Optimierungskurve, <i>receiver operating characteristic</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit, <i>resonance unit</i>
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht, <i>self-assembled monolayer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz, <i>surface plasmon resonance</i>
TF	Gewebefaktor, <i>tissue factor</i>
TFPI	Gewebefaktor-Inhibitor, <i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tPA	Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator, <i>tissue factor plasminogen activator</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
Tween 80	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
vWF	Von-Willebrand-Faktor

8 Literaturverzeichnis

1. Dahlbäck, B. Blood coagulation. *Lancet* **355**, 1627–1632 (2000).
2. Soucie, J., Evatt, B. & Jackson, D. Occurrence of hemophilia in the United States. *Am. J. Hematol.* **59**, 288–294 (1998).
3. Franchini, M. & Mannucci, P. M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 1–8 (2012).
4. Pierce, G. F., Lillicrap, D., Pipe, S. W. & VandenDriessche, T. Gene therapy, bioengineered clotting factors and novel technologies for hemophilia treatment. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 901–906 (2007).
5. Franchini, M. & Mannucci, P. M. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 553–562 (2011).
6. Berntorp, E. & Shapiro, A. D. Modern haemophilia care. *Lancet* **379**, 1447–1456 (2012).
7. Auerswald, G. *et al.* Treatment patterns and cost-of-illness of severe haemophilia in patients with inhibitors in Germany. *Haemophilia* **10**, 499–508 (2004).
8. Johnson, K. A. & Zhou, Z.-Y. Costs of care in hemophilia and possible implications of health care reform. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2011**, 413–418 (2011).
9. Wight, J. & Paisley, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia* **9**, 418–435 (2003).
10. Oldenburg, J., Schwaab, R. & Brackmann, H. H. Induction of immune tolerance in haemophilia A inhibitor patients by the ‘Bonn Protocol’: predictive parameter for therapy duration and outcome. *Vox Sang.* **77 Suppl 1**, 49–54 (1999).
11. Tanaka, K. A., Key, N. S. & Levy, J. H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth. Analg.* **108**, 1433–1446 (2009).
12. Shapiro, G. A., Huntzinger, S. W. & Wilson, J. E. Variation among commercial activated partial thromboplastin time reagents in response to heparin. *Am. J. Clin. Pathol.* **67**, 477–480 (1977).
13. Kasper, C. *et al.* Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* **34**, 612 (1975).
14. Verbruggen, B. & Novakova, I. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb. Haemost.* **73**, 247–251 (1995).
15. Verbruggen, B., Dardikh, M., Polenewen, R., van Duren, C. & Meijer, P. The factor VIII inhibitor assays can be standardized: results of a workshop. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 2003–2008 (2011).
16. Otto, J. C. An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Med Repos* **328**, 1–4 (1803).

17. Patek, A. J. & Taylor, F. H. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J. Cinical Investig.* **16**, 113–124 (1937).
18. Pavlovsky, A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. *Blood* **2**, 185–191 (1947).
19. Biggs, R., Douglas, A. & Macfarlane, R. Christmas disease; A condition previously mistaken for haemophilia. *Br. Med. J.* **2**, 1378–1382 (1952).
20. Bolton-Maggs, P. H. B. & Pasi, K. J. Haemophilias A and B. *Lancet* **361**, 1801–1809 (2003).
21. Zimmerman, B. & Valentino, L. A. Hemophilia: In review. *Pediatr. Rev.* **34**, 289–294 (2013).
22. Lane, S. Successful transfusion of blood. *Lancet* **869**, 185–188 (1840).
23. Bidlingmaier, C., Olivieri, M. & Kurnik, K. Hämophilie – Erfolgsgeschichte mit Hindernissen. *Hauner J.* 1–8 (2007).
24. Mannucci, P. M. Hemophilia and related bleeding disorders: A story of dismay and success. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr.* 1–9 (2002).
25. Key, N. S. & Negrier, C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. *Lancet* **370**, 439–448 (2007).
26. Mannucci, P. & Tuddenham, E. The hemophilias—from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1773–1779 (2001).
27. Azzi, A. *et al.* Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *Am. J. Hematol.* **39**, 228–230 (1992).
28. Ginn, S. & Alexander, I. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *J. Gene Med.* **15**, 65–77 (2013).
29. Chuah, M. K., Evens, H. & VandenDriessche, T. Gene therapy for hemophilia. *J. Thromb. Haemost.* **11 Suppl 1**, 99–110 (2013).
30. Förstermann, U. Gentherapie : Erste Erfolge , viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Dtsch. Arztebl.* **100**, 1–35 (2003).
31. Ponder, K. P. Gene therapy for hemophilia. *Curr. Opin. Hematol.* **13**, 301–307 (2006).
32. Niidome, T. & Huang, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* **9**, 1647–1652 (2002).
33. High, K. H., Nathwani, A., Spencer, T. & Lillicrap, D. Current status of haemophilia gene therapy. *Haemophilia* **20 Suppl 4**, 43–49 (2014).
34. Brunetti-Pierri, N. & Ng, P. Adenoviral vectors for hemophilia gene therapy. *J Genet Syndr Gene Ther* **2**, 1–13 (2013).

35. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).
36. Mount, J. D. *et al.* Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* **99**, 2670–2676 (2002).
37. High, K. A. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Blood* **120**, 4482–4487 (2012).
38. Burton, M. *et al.* Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12725–12730 (1999).
39. Chao, H., Mao, L., Bruce, A. T. & Walsh, C. E. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood* **95**, 1594–1599 (2000).
40. Sabatino, D. E. *et al.* Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol. Ther.* **19**, 442–449 (2011).
41. McIntosh, J. *et al.* Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* **121**, 3335–3344 (2013).
42. Kitazawa, T. *et al.* A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* **18**, 1570–1574 (2012).
43. Muto, A. *et al.* Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 206–213 (2014).
44. Bauer, A. W. & Mall, K. Hämostase, Thrombose und Embolie: Historische Konzepte zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. *Hamostaseologie* **15**, 92–99 (1995).
45. Gerabek, W. *Enzyklopädie Medizingeschichte.* (De Gruyter, 2007).
46. Macfarlane, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**, 498–499 (1964).
47. Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **145**, 1310–1312 (1964).
48. Adams, R. L. C. & Bird, R. J. Review article: coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* **14**, 462–470 (2009).
49. Quick, A. J., Stanley-Brown, M. & Bancroft, F. W. The prothrombin time in hemophilia and in obstructive jaundice. *J. Biol. Chem.* **109**, 73–72 (1935).
50. Langdell, R. D., Wagner, R. H. & Brinkhous, K. M. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J. Lab. Clin. Med.* **41**, 637–647 (1953).

-
51. Hoffman, M. & Monroe, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **21**, 1–11 (2007).
 52. Osterud, B. & Rapaport, S. I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5260–5264 (1977).
 53. Hoffman, M. & Monroe, D. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* **85**, 958–965 (2001).
 54. Hoffman, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J. Thromb. Thrombolysis* **16**, 17–20 (2003).
 55. Smith, S. A. The cell-based model of coagulation. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **19**, 3–10 (2009).
 56. Lutze, G., Naumann, C. & Zawata, B. *Wissenswertes zur Gerinnung*. (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, 2010).
 57. Nemerson, Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* **71**, 1–8 (1988).
 58. Morrissey, J. H. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb. Haemost.* **86**, 66–74 (2001).
 59. Komiyama, Y., Pedersen, A. H. & Kisiel, W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* **29**, 9418–9425 (1990).
 60. Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J. W., Zwaal, R. F. & Hemker, H. C. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 274–283 (1980).
 61. Mann, K. G., Brummel, K. & Butenas, S. What is all that thrombin for? *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1504–1514 (2003).
 62. Gilbert, G. E. *et al.* Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J. Biol. Chem.* **266**, 17261–17268 (1991).
 63. Saenko, E. L., Shima, M. & Sarafanov, A. G. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 185–192 (1999).
 64. Oliver, J. A., Monroe, D. M., Roberts, H. R. & Hoffman, M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 170–177 (1999).
 65. Sakariassen, K. S., Fressinaud, E., Girma, J. P., Meyer, D. & Baumgartner, H. R. Role of platelet membrane glycoproteins and von Willebrand factor in adhesion of platelets to subendothelium and collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516**, 52–65 (1987).

-
66. Spiegel, P. C., Jacquemin, M., Saint-Remy, J. M., Stoddard, B. L. & Pratt, K. P. Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* **98**, 13–19 (2001).
 67. Ariëns, R., Lai, T., Weisel, J. W., Greenberg, C. S. & Grant, P. J. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* **100**, 743–754 (2002).
 68. Siebenlist, K. R. & Mosesson, M. W. Progressive cross-linking of fibrin gamma chains increases resistance to fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 28414–28419 (1994).
 69. Dufner, G. S. & Marbet, G. A. Der Faktor XIII des Menschen: eine Übersicht. *Hamostaseologie* **22**, 1–8 (2002).
 70. Preissner, K. T. Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Transfusionsmedizin* **5**, 259–271 (2008).
 71. Cesarman-Maus, G. & Hajjar, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **129**, 307–321 (2005).
 72. Wang, W., Wang, Y. J. & Kelner, D. N. Coagulation factor VIII: structure and stability. *Int J Pharm* **259**, 1–15 (2003).
 73. Gitschier, J. *et al.* Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**, 326–330 (1984).
 74. Vehar, G. *et al.* Structure of human factor VIII. *Nature* **312**, 337–342 (1984).
 75. Peake, I. Molecular genetics and counselling in haemophilia. *Thromb. Haemost.* **74**, 40–44 (1995).
 76. Church, W. R. *et al.* Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6934–6937 (1984).
 77. Lenting, P. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **92**, 3983–3996 (1998).
 78. Eaton, D. *et al.* Characterization of recombinant human factor VIII. *J. Biol. Chem.* **262**, 3285–3290 (1987).
 79. Wion, K., Kelly, D., Summerfield, J., Tuddenham, E. & Lawn, R. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* **317**, 726–729 (1985).
 80. Elder, B., Lakich, D. & Gitschier, J. Sequence of the murine factor VIII cDNA. *Genomics* **16**, 374–379 (1993).
 81. Shaw, E., Giddings, J. C., Peake, I. R. & Bloom, A. L. Synthesis of procoagulant factor VIII, factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Br. J. Haematol.* **41**, 585–596 (1979).
 82. Owen, C. A., Bowie, E. J. & Fass, D. N. Generation of factor VIII coagulant activity by isolated, perfused neonatal pig livers and adult rat livers. *Br. J. Haematol.* **43**, 307–315 (1979).

-
83. Marchioro, T., Hougie, C., Ragde, H., Epstein, R. & Thomas, E. Hemophilia: Role of organ homografts. *Science* **163**, 188–190 (1969).
 84. Lewis, J., Bontempo, F., Spero, J., Ragni, M. & Starzl, T. Liver transplantation in a hemophiliac. *N. Engl. J. Med.* **312**, 1189–1190 (1985).
 85. Dorner, A. J., Bole, D. G. & Kaufman, R. J. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J. Cell Biol.* **105**, 2665–2674 (1987).
 86. Nichols, W. C. *et al.* Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* **93**, 61–70 (1998).
 87. Nerich, V. *et al.* Cost-of-illness study of severe haemophilia A and B in five French haemophilia treatment centres. *Pharm. World Sci.* **30**, 287–292 (2008).
 88. Fay, P. J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev.* **18**, 1–15 (2004).
 89. Mikaelsson, M., Forsman, N. & Oswaldsson, U. M. Human factor VIII: a calcium-linked protein complex. *Blood* **62**, 1006–1015 (1983).
 90. Tagliavacca, L., Moon, N., Dunham, W. R. & Kaufman, R. J. Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* **272**, 27428–27434 (1997).
 91. Bihoreau, N., Pin, S., de Kersabiec, A. M., Vidot, F. & Fontaine-Aupart, M. P. Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-delta II. *Eur. J. Biochem.* **220**, 41–48 (1994).
 92. Vlot, A. J., Koppelman, S. J., van den Berg, M. H., Bouma, B. N. & Sixma, J. J. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood* **85**, 3150–3157 (1995).
 93. Saenko, E. L. & Scandella, D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **272**, 18007–18014 (1997).
 94. Lenting, P. J., Donath, M. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J. Biol. Chem.* **269**, 7150–7155 (1994).
 95. Thompson, A. R. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin. Thromb. Hemost.* **29**, 11–22 (2003).
 96. Koedam, J. A., Hamer, R. J., Beeser-Visser, N. H., Bouma, B. N. & Sixma, J. J. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur. J. Biochem.* **189**, 229–234 (1990).

97. Spaargaren, J. *et al.* Binding of blood coagulation factor VIII and its light chain to phosphatidylserine/phosphatidylcholine bilayers as measured by ellipsometry. *Biochem. J.* **310**, 539–455 (1995).
98. Wagner, D. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 217–246 (1990).
99. Chopek, M. W., Girma, J. P., Fujikawa, K., Davie, E. W. & Titani, K. Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**, 3146–3155 (1986).
100. Jaffe, E. A., Hoyer, L. W. & Nachman, R. L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 1906–1909 (1974).
101. Ruggeri, Z. M., De Marco, L., Gatti, L., Bader, R. & Montgomery, R. R. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* **72**, 1–12 (1983).
102. Siedlecki, C. *a et al.* Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* **88**, 2939–2950 (1996).
103. Schneppenheim, R. Von-Willebrand-Syndrom. *Pädiatrische Hämatologie und Onkol.* 1–9 (2006).
104. Von Willebrand, E. A. Hereditary pseudohaemophilia. *Haemophilia* **5**, 223–231 (1999).
105. Ruggeri, Z. & Zimmerman, T. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* **70**, 895–904 (1987).
106. Lillicrap, D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood* **122**, 3735–3740 (2013).
107. Franchini, M. & Lippi, G. Acquired von Willebrand syndrome: an update. *Am. J. Hematol.* **82**, 368–375 (2007).
108. Federici, A. *et al.* Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb. Haemost.* **84**, 345–349 (2000).
109. Rodeghiero, F., Castaman, G. & Dini, E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* **69**, 454–459 (1987).
110. Retief, F. & Cilliers, L. The epidemic of Athens, 430-426 BC. *S Afr Med J* **88**, 50 – 53 (1998).
111. Kaufmann, S. H. E. & Schaible, U. E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* **13**, 469–475 (2005).
112. Plotkin, S. A. Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* **11**, 5–11 (2005).
113. Linke, R. P. in *Bioanalytik* (Lottspeich, F. & Engels, J. W.) 77–82 (Springer Spektrum, 2012).
114. Ahmad, Z. A. *et al.* ScFv antibody: principles and clinical application. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–15 (2012).

-
115. Edelman, G. M. *et al.* The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *J. Immunol.* **63**, 78–85 (1969).
 116. Leitner, A., Bidwell, E. & Dike, G. An anti-haemophilic globulin (factor VIII) inhibitor: purification, characterization and reaction kinetics. *Br. J. Haematol.* **9**, 245–258 (1963).
 117. Biggs, R. & Bidwell, E. A method for the study of antihaemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. *Br. J. Haematol.* **5**, 379 – 395 (1959).
 118. Green, D. Factor VIII inhibitors: a 50-year perspective. *Haemophilia* **17**, 1–8 (2011).
 119. Meijer, P. & Verbruggen, B. The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**, 786–793 (2009).
 120. Gouw, S. *et al.* Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* **109**, 4693–4697 (2007).
 121. Gouw, S. C. *et al.* Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood* **121**, 4046–4055 (2013).
 122. Oldenburg, J., El-Maarri, O. & Schwaab, R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* **8**, 23–29 (2002).
 123. Ghosh, K. & Shetty, S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **37**, 58–66 (2009).
 124. Fischer, K., Lewandowski, D., Marijke van den Berg, H. & Janssen, M. P. Validity of assessing inhibitor development in haemophilia PUPs using registry data: the EUHASS project. *Haemophilia* **18**, 241–246 (2012).
 125. Kurnik, K. *et al.* New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia* **16**, 256–262 (2010).
 126. Wood, R. A suspected case of the electrical resonance of minute metal particles for light-waves. A new type of absorption. *Philos. Mag. Ser. 4*, 396–402 (1902).
 127. Wood, R. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of Intensity. *Philos. Mag. Ser. 6* **23**, 310–317 (1912).
 128. Ritchie, R. H. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Phys. Rev.* **106**, 874–881 (1957).
 129. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Phys.* **216**, 398–410 (1968).
 130. Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch.* **23**, 2135–2136 (1968).
 131. Kooyman, R. P. H. in *Handb. Surf. Plasmon Reson.* (Schasfoort, R. B. M. & Tudos, A.) 15–34 (RSC Publishing, 2008).
-

-
132. Steiner, G. in *Immunoassay* (Raem, A. & Rauch, A.) 55–67 (Spektrum Akademischer Verlag, 2006).
 133. Kretschmann, E. Die Bestimmung der optischen Konstanten dünner Schichten in der Nähe der Plasmafrequenz aus Kurvenfeldern konstanter Transmission. *Zeitschrift für Phys.* **221**, 346–356 (1969).
 134. Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Phys.* **241**, 313–324 (1971).
 135. Homola, J., Vaisocherová, H., Dostálek, J. & Piliarik, M. Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods* **37**, 26–36 (2005).
 136. Malmqvist, M. Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 282–286 (1993).
 137. Schasfoort, R. B. M. & McWhirter, A. in *Handb. Surf. Plasmon Reson.* (Schasfoort, R. B. M. & Tudos, A. J.) 35–80 (RSC Publishing, 2008).
 138. GE Healthcare. Biacore Sensor Surface Handbook. 1–100 (2008).
 139. Zschieschang, U. Selbstorganisierende Monolagen als Gate-Dielektrika für organische Feldeffekttransistoren. (2006).
 140. Ringsdorf, H., Schlarb, B. & Venzmer, J. Architektur und Funktion von polymeren orientierten Systemen—Modelle für das Studium von Organisation, Oberflächenerkennung und Dynamik bei Biomembranen. *Angew. Chemie* **100**, 117–162 (1988).
 141. Gedig, E. in *Handb. Surf. Plasmon Reson.* (Schasfoort, R. B. M. & Tudos, A. J.) 173–220 (RSC Publishing, 2008).
 142. Schreiber, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **65**, 151–256 (2000).
 143. Schuck, P., Boyd, L. F. & Andersen, P. S. Measuring protein interactions by optical biosensors. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **20**, 1–22 (1999).
 144. Johnsson, B., Löfås, S. & Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **198**, 268–277 (1991).
 145. Kim, D. & Herr, A. E. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics* **7**, 1–47 (2013).
 146. Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* **145**, 229–240 (1991).
 147. Oshannessy, D. J., Brighamburke, M., Sonesson, K. K., Hensley, P. & Brooks, I. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface

- plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal. Biochem.* **212**, 457–468 (1993).
148. Stenberg E., Persson B, R. C. & Urbaniczky, H. Quantitative determination of surface concentration of protein with SPR using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513–526 (1991).
149. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
150. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
151. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350–4354 (1979).
152. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 3116–3120 (1979).
153. Romero-Calvo, I. *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **401**, 318–320 (2010).
154. Okutucu, B., Dinçer, A., Habib, O. & Zihnioglu, F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. Biochem. Biophys. Methods* **70**, 709–711 (2007).
155. Richman, D. D., Cleveland, P. H., Oxman, M. N. & Johnson, K. M. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **128**, 2300–2305 (1982).
156. Krudysz-Amblo J. *et al.* Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood* **113**, 2587–2594 (2009).
157. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
158. Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* **31**, 507–520 (1978).
159. Jönsson, U. *et al.* Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620–627 (1991).
160. Bain, C. D. *et al.* Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **335**, 321–335 (1989).
161. Schlichtiger, A. *et al.* Covalent attachment of functionalized cardiolipin on a biosensor gold surface allows repetitive measurements of anticardiolipin antibodies in serum. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 275–285 (2013).
162. Pattnaik, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **126**, 79–92 (2005).

-
163. Tudos, A. & Schasfoort, R. B. M. in *Handb. Surf. plasmon Reson.* (Schasfoort, R. B. M. & Tudos, A. J.) 1–14 (RSC Publishing, 2008).
164. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533–1554 (1996).
165. Gilles, J. *et al.* In vivo neutralization of a C2 domain-specific human anti-Factor VIII inhibitor by an anti-idiotypic antibody. *Blood* **103**, 2617–2623 (2004).
166. Saenko, E. L., Shima, M., Gilbert, G. E. & Scandella, D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J. Biol. Chem.* **271**, 27424–27431 (1996).
167. Andersson, K., Hämäläinen, M. & Malmqvist, M. Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach. *Anal. Chem.* **71**, 2475–2481 (1999).
168. Andersson, K., Areskoug, D. & Hardenborg, E. Exploring buffer space for molecular interactions. *J. Mol. Recognit.* **12**, 310–315 (1999).
169. Fay, P. J. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol* **83**, 103–108 (2006).
170. Shetty, S., Ghosh, K. & Mohanty, D. An ELISA assay for the detection of factor VIII antibodies – comparison with the conventional Bethesda assay in a large cohort of haemophilia samples. *Acta Haematol.* **109**, 18–22 (2003).
171. Franchini, M. & Mannucci, P. M. Acquired haemophilia A: A 2013 update. *Thromb. Haemost.* **110**, 1114–1120 (2013).
172. Pierce Thermo Scientific. Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. *Pierce Thermo Sci.* 1–52 (2004).
173. Goldzstein, A. *et al.* Ligand-receptor interactions in complex media: a new type of biosensors for the detection of coagulation factor VIII. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1831–1836 (2009).
174. Ferroglio, E., Centaro, E., Mignone, W. & Trisciuglio, A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet. Parasitol.* **144**, 162–166 (2007).
175. Martin, P. G., Sukhu, K., Chambers, E. & Giangrande, P. L. F. Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. *Clin Lab Haem* **21**, 125–128 (1999).
176. Towfighi, F. *et al.* Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. *Acta Haematol.* **114**, 84–90 (2005).
177. Lindgren, A., Wadenvik, H. & Tengborn, L. Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A. *Haemophilia* **8**, 644–648 (2002).
-

-
178. Vianello, F. *et al.* Prevalence of anti-FVIII antibodies in severe haemophilia A patients with inversion of intron 22. *Br. J. Haematol.* **97**, 807–809 (1997).
179. CSL Behring GmbH. Fachinformation Haemate® P. 1–14 (2009).
180. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775–1789 (2007).
181. Chatelier, R. C., Gengenbach, T. R., Griesser, H. J., Brigham-Burke, M. & O’Shannessy, D. J. A general method to recondition and reuse BIAcore sensor chips fouled with covalently immobilized protein/peptide. *Anal. Biochem.* **229**, 112–118 (1995).
182. Wittung-Stafshede, P. Role of cofactors in protein folding. *Acc. Chem. Res.* **35**, 201–208 (2002).
183. Bovenschen, N., Rijken, D. C., Havekes, L. M., van Vlijmen, B. J. M. & Mertens, K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1257–1265 (2005).
184. Bayer Pharma AG. Gebrauchsinformation Kogenate 500 I.E. 197–205 (2014).
185. Baxter AG. Advate Fachinformation. 1–6 (2014).
186. Fatouros A, Österberg T & Mikaelsson M. Recombinant factor VIII SQ—influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution. *Int J Pharm* **155**, 121–131 (1997).
187. Lebreton, A. *et al.* Prevalence and epitope specificity of non-neutralising antibodies in a large cohort of haemophilia A patients without inhibitors. *Thromb. Haemost.* **105**, 954–961 (2011).
188. Vincent, A. M. *et al.* Non-neutralizing anti-FVIII antibodies: different binding specificity to different recombinant FVIII concentrates. *Haemophilia* **15**, 374–376 (2009).
189. Nilsson, I. M., Berntorp, E., Zettervall, O. & Dahlbäck, B. Noncoagulation inhibitory factor VIII antibodies after induction of tolerance to factor VIII in hemophilia A patients. *Blood* **75**, 378–383 (1990).
190. Sadler, J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 395–424 (1998).
191. Terraube, V., O’Donnell, J. S. & Jenkins, P. V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* **16**, 3–13 (2010).
192. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 54–61 (2000).
193. Björck, L. & Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**, 969–974 (1984).
194. Lollar, P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1082–1095 (2004).
-

-
195. Fulcher, C. A., Lechner, K. & de Graaf Mahoney, S. Immunoblot analysis shows changes in factor VIII inhibitor chain specificity in factor VIII inhibitor patients over time. *Blood* **72**, 1348–1356 (1988).
 196. Williams, A. J. K., Norcross, A. J., Chandler, K. A. & Bingley, P. J. Non-specific binding to protein A Sepharose and protein G Sepharose in insulin autoantibody assays may be reduced by pre-treatment with glycine or ethanolamine. *J Immunol Methods* **314**, 170–173 (2006).
 197. Wollenberger, U., Renneberg, R., Bier, F. F. & Scheller, F. W. *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*. (Wiley-VCH Verlag, 2012).
 198. Raut, S., Weller, L. & Barrowcliffe, T. W. Phospholipid binding of factor VIII in different therapeutic concentrates. *Br. J. Haematol.* **107**, 323–329 (1999).
 199. Nogami, K. *et al.* Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J. Biol. Chem.* **274**, 31000–31007 (1999).
 200. Kessler, S. W. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* **115**, 1617–1624 (1975).
 201. Myszka, D. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 50–57 (1997).
 202. Lacroix-Desmazes, S. *et al.* Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat. Med.* **5**, 1044–1047 (1999).
 203. Moreau, a *et al.* Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood* **95**, 3435–3441 (2000).
 204. Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. & Myszka, D. G. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal. Biochem.* **349**, 136–147 (2006).
 205. Gesellchen, F., Zimmermann, B. & Herberg, F. W. Direct optical detection of protein-ligand interactions. *Methods Mol. Biol.* **305**, 17–45 (2005).
 206. Dimitrov, J. D. *et al.* Kinetics and thermodynamics of interaction of coagulation factor VIII with a pathogenic human antibody. *Mol. Immunol.* **47**, 290–297 (2009).
 207. Yacoub Wasef, S. Z. Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend. Med.* **1**, 12–17 (2004).
 208. Geer, E. B. & Shen, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend. Med.* **6**, 60–75 (2009).
 209. Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E. & Mahmoodzadeh, S. Gender aspects of the role of the metabolic syndrome as a risk factor for cardiovascular disease. *Gend. Med.* **4**, 162–177 (2007).
 210. GTI-Diagnostics. Factor VIII antibody screen instruction. 1–7 (2009).
-

-
211. Mannucci, P., Mancuso, M. E. & Santagostino, E. How we choose factor VIII to treat hemophilia. *Blood* **119**, 4108–4114 (2012).
212. Aledort, L. M., Navickis, R. J. & Wilkes, M. M. Can B-domain deletion alter the immunogenicity of recombinant factor VIII? A meta-analysis of prospective clinical studies. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 2180–2192 (2011).
213. Goudemand, J. *et al.* Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* **107**, 46–51 (2006).
214. Gouw, S. C. *et al.* Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* **368**, 231–239 (2013).
215. Katayama, M., Sato, T. & Kuromitsu, J. Capture molecules preconditioned for kinetic analysis of high-affinity antigen-antibody complex in Biacore A100. *Anal. Biochem.* **424**, 168–77 (2012).
216. Cooper, M. A., Hansson, A., Löfås, S. & Williams, D. H. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal. Biochem.* **277**, 196–205 (2000).
217. Grancha, S. *et al.* Kinetics of the interaction between anti-FVIII antibodies and FVIII from therapeutic concentrates, with and without von Willebrand factor, assessed by surface plasmon resonance. *Haemophilia* **18**, 982–989 (2012).
218. Christensen, L. H., Holm, J., Lund, G., Riise, E. & Lund, K. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 298–304 (2008).
219. Shima, M. Characterization of factor VIII inhibitors. *Int J Hematol* **83**, 109–118 (2006).
220. Di Scipio, R. G., Kurachi, K. & Davie, E. W. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J. Clin. Invest.* **61**, 1528–1538 (1978).
221. Zhong, D., Saenko, E. L., Shima, M., Felch, M. & Scandella, D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* **92**, 136–42 (1998).
222. Scandella, D. *et al.* Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6152–6156 (1988).
223. Scandella, D., Mattingly, M., de Graaf, S. & Fulcher, C. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* **74**, 1618–1626 (1989).
224. Matsumoto, T., Nogami, K., Ogiwara, K. & Shima, M. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb. Haemost.* **107**, 288–301 (2012).
-

225. Dieijen, G. Van, Tans, G., Rosing, J. & Hemker, H. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J. Biol. Chem.* **256**, 3433 – 3442 (1981).
226. Fay, P. J. & Scandella, D. Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J. Biol. Chem.* **274**, 29826–29830 (1999).
227. Jacquemin, M. *et al.* A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* **95**, 156–163 (2000).
228. Healey, J. F. *et al.* Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood* **92**, 3701–3709 (1998).
229. Franchini, M., Gandini, G., Di Paolantonio, T. & Mariani, G. Acquired hemophilia A: a concise review. *Am. J. Hematol.* **80**, 55–63 (2005).

