

**Bestimmung von Infliximab und Anti-Infliximab-Antikörpern im Rahmen
des Therapeutischen Drug- und Immunogenitäts-Monitoring bei chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen**

Anna Felicitas Langmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Peter B. Lupp
2. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen

Die Dissertation wurde am 02 . 06 . 2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11 . 10 . 2022 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	6
2. Einleitung.....	7
2.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	7
2.1.1. Definition, Epidemiologie und Pathogenese	7
2.1.2. Klinik und Diagnostik	8
2.1.3. Therapieprinzipien bei CED.....	11
2.1.4. Bedeutung monoklonaler Antikörper bei der Therapie von CED.....	13
2.1.5. Immunogenität: Entwicklung von Anti-Drug Antikörpern.....	15
2.1.6. Therapeutisches Drug- und Immunogenitätsmonitoring bei CED.....	16
2.2. Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie	18
2.2.1. Grundlagen der Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie.....	18
2.2.2. Sensorchip	19
2.2.3. Optisches Detektionssystem.....	19
2.3. Ziele der Arbeit.....	21
3. Studienpatienten, Material und Methoden	22
3.1. Studienpatienten und Materialien	22
3.1.1. Patientendaten	22
3.1.2. Negativserum	23
3.1.3. Antikörper, Proteine und Medizinprodukte	23
3.1.4. Chemikalien	24
3.1.5. Puffer und Lösungen	25
3.1.6. Regenerationslösungen.....	25
3.1.7. Kits und Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.8. Geräte und Software.....	26
3.2. Methoden	27
3.2.1. Aufbau und Vorbereitung des Sensorchips.....	27
3.2.2. Immobilisierung des Liganden.....	28
3.2.2.1. Anbindungsziel.....	29
3.2.2.2. Aktivierung der Sensoroberfläche	29

3.2.2.3.	Immobilisierung des Liganden	29
3.2.2.4.	Deaktivierung der Sensoroberfläche	30
3.2.3.	Bestimmung der IFX- und ATI-Konzentrationen	30
3.2.3.1.	Testprinzip	30
3.2.3.2.	Kalibrierung und Qualitätskontrollen	31
3.2.3.3.	Spezifische Anbindung an die Flusszellen	32
3.2.3.4.	Kalibriermethoden	33
3.2.3.5.	Für die SPR-Messungen benutzte Patientenproben.....	33
3.2.4.	Gesamtes CED-Patientenkollektiv	33
3.2.4.1.	Einschlusskriterien und Beschreibung der Studienpopulation	33
3.2.4.2.	Klinisch-chemische Analytik und TDIM der Seren des Patientenkollektivs	35
3.2.4.3.	TDIM: Dynamische und statische Variablen	35
3.2.4.4.	Definitionen	36
3.2.4.4.1.	Remission	36
3.2.4.4.2.	Outcome und Behandlungsdauer	36
3.2.4.4.3.	Komedikation	37
3.2.4.4.4.	Nebenwirkungen	37
3.2.4.5.	Statistische Auswertung	37
4.	Ergebnisse	39
4.1.	Analyse der Patientenseren mithilfe des SPR-basierten Biosensors	39
4.1.1.	IFX-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor.....	39
4.1.1.1.	Prinzip der Messung	39
4.1.1.1.1.	Spezifische Anbindung an die Flusszellen.....	39
4.1.1.1.2.	Kalibrierung	40
4.1.1.1.3.	Validierung des IFXmon-Biosensors	42
4.1.1.1.4.	Messung der Patientenproben	42
4.1.1.1.5.	Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA.....	46
4.1.2.	Versuche zur ATI-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor	48
4.1.2.1.	Prinzip der Messung	48
4.1.2.1.1.	Spezifische Anbindung an die Flusszellen.....	48
4.1.2.1.2.	Kalibrierung	49
4.1.2.1.3.	Messung der Patientenproben	51
4.1.2.1.4.	Bestimmung der freien ATI mittels SPR-Biosensor.....	53

4.1.2.1.5. Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA.....	54
4.2. Retrospektive Auswertung des TDIM bei den CED-Patienten	56
4.2.1. Patientenkollektiv.....	56
4.2.2. Vergleich der S _{ATI} Gruppen.....	56
4.2.3. Zeit bis zum sekundären Therapieversagen und Therapieabbruch	58
4.2.4. Cox Regression	59
4.2.5. Optimales Zeitintervall zur S _{ATI} Bestimmung	61
4.2.6. Festlegung des S _{ATI} -Grenzwerts.....	62
4.2.7. Exemplarische Patientenverläufe	62
5. Diskussion.....	65
5.1. IFX- und ATI-Messungen mit dem SPR-Biosensor.....	65
5.1.1. IFX-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor.....	65
5.1.2. ATI-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor	65
5.2. Prognostische Relevanz der ATI-Bestimmung im Rahmen der TDIM-Studie bei CED- Patienten	69
5.2.1. Patientenkollektiv.....	69
5.2.2. S _{ATI} als neuer Parameter zur Vorhersage des LOR.....	70
5.2.3. Beurteilung weiterer Parameter hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft zum LOR	70
5.2.4. Evidenzbasierter Einsatz des TDIM.....	72
5.2.5. Transiente vs. persistente ATI.....	73
5.2.6. S _{ATI} als Hilfe bei der klinischen Entscheidungsfindung.....	74
5.3. Limitationen und Möglichkeiten der Labordiagnostik beim TDIM.....	75
5.4. Ausblick.....	76
6. Literaturverzeichnis	78
7. Abkürzungsverzeichnis.....	91
8. Danksagung.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nomenklatur therapeutischer monoklonaler Antikörper	13
Abbildung 2: Übersicht therapeutischer Antikörper zur Therapie von CED.....	15
Abbildung 3: Prinzip der Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie.....	18
Abbildung 4: Sensorgramm der Immobilisierung.....	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immobilisierung des Liganden.....	30
Abbildung 6: Sensorgramm während der Kalibrierung mit Anbindung auf die Flusszelle Fc1 und Fc2.....	32
Abbildung 7: Dynamische und statische TDIM-Parameter	36
Abbildung 8: Spezifische Anbindung an die beiden Flusszellen Fc1 und Fc2 bei Vermessung von Patientenserum 1	40
Abbildung 9: Sensorgramme zu IFX-Kalibratoren	41
Abbildung 10: Fit der Kalibrierkurve.....	41
Abbildung 11: Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA.....	47
Abbildung 12: Bablok-Passing und Bland-Altman-Analyse	48
Abbildung 13: Vergleich verschiedener Kalibriermethoden zur ATI-Quantifizierung	50
Abbildung 14: Sensorgramme zu ADA-Kalibratoren.....	51
Abbildung 15: ATI-Quantifizierung mit ADAmon-Biosensor für native und IFX-gespikte Patientenserum.....	54
Abbildung 16: Korrelation der ATI-Konzentrationen zwischen SPR-Biosensor und ELISA.....	55
Abbildung 17: Korrelation der ATI-Konzentrationen zwischen SPR-Biosensor und ELISA für Patienten mit nicht-detektierbaren IFX-Spiegeln im Vergleichs-ELISA (n=4).....	55
Abbildung 18: Zeit bis zum Therapieabbruch bzw. sekundären Therapieversagen	59
Abbildung 19: Modelle zur S_{ATI} Berechnung.....	61
Abbildung 20: ROC-Analyse für ATI-positive Patienten (n=20).....	62
Abbildung 21: Exemplarische Patientenverläufe.....	63

1. Zusammenfassung

Bei der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wird primär häufig der TNF-Inhibitor Infliximab (IFX) eingesetzt. Ein Problem bei therapeutischen monoklonalen Antikörpern ist die Immunogenitätsentwicklung und die Bildung von Anti-Infliximab-Antikörpern (engl.: *antibodies to infliximab*, ATI). In der klinischen Routine wird für die Messung von IFX- und ATI-Konzentrationen therapeutisches Drug- und Immunogenitätsmonitoring (TDIM) eingesetzt. Es gibt hierfür kein Referenzverfahren, das am häufigsten genutzte Verfahren ist der *Enzyme-like Immunosorbent Assay* (ELISA). Ein alternatives Verfahren stellt die SPR-Biosensorik dar. Diese ermöglicht neben einer markierungsfreien Erfassung von Molekülinteraktionen in Echtzeit auch kinetische Untersuchungen. Dies ist vor allem zur Analyse der Charakteristika der ATI relevant.

In der vorliegenden Dissertation wurden 41 Patienten unter remissionserhaltender Therapie mit IFX proaktiv im Rahmen des TDIM über einen Zeitraum von vier Jahren überwacht, über den klinische und labormedizinische Daten zu insgesamt 552 TDIM-Serumentnahmen vorlagen. Die erfassten Daten wurden retrospektiv analysiert und der Zusammenhang der ATI-Bildung mit verschiedenen klinischen und labormedizinischen Parametern untersucht. Zusätzlich wurden 145 Serumproben dieser Patienten eingesetzt, um einen SPR-basierten Biosensor zur IFX- und ATI Konzentrationsbestimmung zu evaluieren.

Die retrospektive Auswertung liefert Hinweise auf die Relevanz und den Nutzen des proaktiven TDIM. Mit der Steigung der ATI-Konzentration über die Zeit (S_{ATI}) wird ein neuer diagnostischer Parameter repräsentativ für die ATI-Dynamik als Prädiktor des sekundären Therapieversagens (engl.: *loss of response*, LOR) bei CED-Patienten vorgestellt. S_{ATI} wurde anhand von zwei TDIM Bestimmungen über einen kurzen Zeitraum von ca. 17 Wochen bestimmt und bietet zusammen mit einer klinischen Evaluation des Patienten eine Hilfe zum weiteren therapeutischen Management. S_{ATI} ermöglicht eine schnelle und standardisierte Reaktion auf die erste ATI-Detektion. Zur frühen ATI-Detektion empfiehlt sich daher die Durchführung eines proaktiven TDIM.

Die Analyse von 90 Patientenseren mit Hilfe des IFXmon Biosensors korrelierte gut mit ELISA-Werten. Der SPR-Biosensor zur IFX-Konzentrationsbestimmung ist somit zur klinischen Anwendung geeignet. Der ADAMon-Biosensor bedarf weiterer Optimierungen, insbesondere hinsichtlich der Drug-Toleranz, d.h. Nachweis von ATI in Anwesenheit von therapeutischen IFX-Spiegeln. Der IFXmon-Assay hingegen stellt eine valide Grundlage zur Etablierung der SPR-Biosensorik in der klinischen Routinediagnostik für die Anwendung beim TDIM dar.

2. Einleitung

2.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

2.1.1. Definition, Epidemiologie und Pathogenese

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind chronisch verlaufende entzündliche Darmerkrankungen (CED). Definitionsgemäß handelt es sich beim MC um eine transmurale Entzündung, die sich diskontinuierlich im gesamten Gastrointestinaltrakt ausbreiten kann¹. Typisch ist hierbei das Auftreten einer Entzündung des terminalen Ileums (Ileitis terminalis). Die CU ist eine Erkrankung, die auf Mukosa und Submukosa beschränkt ist und sich kontinuierlich vom Rektum nach proximal ausbreitet¹. In der klinischen Praxis ist eine Differenzierung beider Krankheitsbilder in bis zu 20% der Fälle schwierig². Aktuelle Konzepte der Pathogenese definieren eine strikte Trennung zwischen MC und CU möglicherweise neu^{1,2}.

CED sind weltweit stark verbreitet, vor allem in Nordamerika und Europa liegt eine hohe Prävalenz vor. Ungefähr 1,5 Millionen Amerikaner und 2,2 Millionen Europäer sind betroffen³. Auch die Inzidenz ist weltweit steigend, besonders steil jedoch in Schwellenländern, z.B. im asiatischen Raum^{3,4}. Gründe für diese epidemiologische Entwicklung liegen im Einfluss des westlichen Lebensstils, der Urbanisierung und der Industrialisierung^{3,4}.

Pathogenetisch kommt es zur Entstehung von CED durch eine komplexe Interaktion zwischen genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und individuellen Eigenschaften, wie der Beschaffenheit des Darmmikrobioms^{3,5-7}. In genomweiten Assoziationsstudien konnten mehr als 200 Genloci identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko für CED verbunden sind^{4,6}. Interessanterweise sind 70% dieser Genloci auch mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Zöliakie, rheumatoider Arthritis und Psoriasis assoziiert⁴. Des Weiteren konnten als Faktoren, die das Auftreten von CED beeinflussen, beispielsweise Rauchen, Antibiotikatherapie in der Kindheit, Stillen, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Appendektomie, Höhe des Vitamin D-Spiegels und der Konsum von Tee und Kaffee identifiziert werden⁵⁻⁷. Außerdem steht die zunehmende Inzidenz von CED in Zusammenhang mit der Verbreitung von abgepackten Lebensmitteln, Fastfood, dem zunehmenden Konsum von Fett, Zucker und ballaststoffarmer Ernährung und der Verwendung von Lebensmittelzusatzstoffen⁵. Diese Umweltfaktoren beeinflussen unter anderem das Darmmikrobiom und führen bei genetisch suszeptiblen Individuen zu einem erhöhten Risiko für CED⁵.

Das Alter bei Diagnosestellung liegt beim MC zwischen 20-40 Jahren⁶ und für die CU bei 15-30 Jahren⁷. Ein jeweils kleinerer Häufigkeitsgipfel ist zwischen 50-60 Jahren bzw. 50-70 Jahren erfasst worden^{6,7}. Es gibt keine signifikanten geschlechterabhängigen Unterschiede^{6,7}.

2.1.2. Klinik und Diagnostik

Grundsätzlich zeichnet sich die klinische Symptomatik bei CED durch einen schubförmigen Krankheitsverlauf aus. Die klinische Präsentation ist oft variabel mit heterogenen Symptomen, die abhängig von Lokalisation, Schwere und Ausprägung der Erkrankung sind. Gemeinsame Symptome der CED sind abdominale Schmerzen und Diarrhöe. Typisch beim MC sind zusätzlich Gewichtsverlust, Fatigue und ein perianaler Befall⁶, während bei der CU die blutige Diarrhöe ein Leitsymptom ist^{1,7}. Beim MC präsentiert sich bereits ein Drittel der Patienten mit perianaler Beteiligung und die Hälfte der Patienten entwickelt im Verlauf Komplikationen wie Strikturen, Fisteln und Abszesse, die häufig eine operative Intervention notwendig machen⁶.

Bei Patienten mit CED kommt es in 20-40% zu extraintestinalen Manifestationen der Erkrankung. Die häufigste extraintestinale Manifestation ist die Anämie⁸. Hierbei handelt es sich meistens um eine Eisenmangelanämie bzw. einer Anämie bei chronischer Erkrankung, seltener um eine Anämie aufgrund von Vitamin B12- oder Folsäuremangel⁹. Die zweithäufigste extraintestinale Manifestation ist eine Gelenkbeteiligung, die zu den Spondylarthritiden gezählt wird und in periphere und axiale Formen unterschieden wird¹⁰. Des Weiteren kann es in bis zu 5% der Fälle zu einer okulären Manifestation in Form einer Episkleritis, Uveitis anterior oder Skleritis kommen^{10,11}. Auch die Entwicklung eines Katarakts als Folge der langjährigen chronischen Entzündung oder einer dauerhaften Steroidtherapie ist möglich. Weiterhin können Hautmanifestationen auftreten. Am häufigsten ist die Entwicklung eines Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum, seltener einer Psoriasis^{10,11}. Wichtig ist hier die Kenntnis dieser extraintestinalen Hautmanifestation und eine differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber potenziellen kutanen Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie treffen zu können. Außerdem sind hepatobiliäre Erkrankungen mit CED assoziiert. Hier sind die Leberverfettung¹² und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC)¹³ zu nennen. Weitere extraintestinale Manifestationen von CED sind Osteopenie und Osteopetrose¹⁴, Nephrolithiasis und die Fatigue¹⁵. Aufgrund der vagen und vielfältigen Symptomatik kommt es vor allem bei Kindern häufig zu einer Verzögerung der Diagnosestellung¹⁶.

Die Diagnosestellung CED erfolgt in Zusammenschau der Befunde aus Anamnese, Klinik, klinisch-chemischer Laborbestimmungen, Endoskopie, Histologie und weiteren bildgebenden Modalitäten.

Anamnestisch sollte eine differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber infektiösen und medikamentös induzierten Colitiden erfolgen. Zudem muss der Impfstatus evaluiert werden, da ca. 50% der Patienten mit CED im Verlauf der Erkrankung eine immunsuppressive Therapie erhält und darunter das Risiko für opportunistische Infektionen erhöht ist^{17,18}. Des Weiteren sollte eine Raucheranamnese erhoben werden, da aktives Rauchen einen protektiven Effekt auf die Entstehung und den Verlauf der CU hat^{19,20}, jedoch mit vermehrten Komplikationen und einem schlechten Therapieansprechen bei MC assoziiert ist^{21,18}. Zudem ist die Frage nach dem familiären Auftreten von CED relevant. Eine familiäre Häufung von MC ist bei ca. 10% der Patienten zu finden²² und das Risiko einer Erkrankung für erstgradige Verwandte von Patienten mit CED ist ca. zehnfach erhöht^{23,24}.

Die initiale Labordiagnostik beinhaltet eine Erhebung des Entzündungsstatus, des Eisenhaushaltes, der Nierenfunktion, der Transaminasen und Cholestaseparameter. Häufige laborchemische Veränderungen bei CED sind eine Anämie und Thrombozytose im Rahmen der chronischen Entzündungssituation. Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sind unspezifische Parameter und können nicht zwischen MC und CU differenzieren und sind zum Beispiel auch bei bakteriellen Komplikationen erhöht. Beim CRP handelt es sich um ein von Hepatozyten produziertes pentameres Akute-Phase-Protein²⁵. Bei deren Stimulation, zum Beispiel durch eine Entzündung, kommt es zu einer vermehrten Produktion. Das CRP hat eine kurze Halbwertszeit von ca. 19 Stunden und steigt somit im Rahmen einer Entzündungsreaktion schnell an²⁵. Studien zeigen, dass sowohl beim MC als auch bei der CU (mit Ausnahme der Proktitis) eine Korrelation mit der Ausdehnung und der klinischen Krankheitsaktivität besteht²⁶⁻²⁸. Insgesamt eignet sich das CRP zur individuellen Verlaufsbeurteilung. Studien konnten einen geringen negativen prädiktiven Wert und eine niedrige Spezifität des CRPs zur Risikoeinschätzung eines akuten Schubs zeigen²⁹. Ein niedriges CRP ist somit nicht gleichzusetzen mit einer Remission³⁰⁻³². Einen weiteren wichtigen Stellenwert in der Labordiagnostik nimmt das fäkale Calprotectin (FC) ein. Beim FC handelt es sich um ein calcium- und zinkbindendes Protein, das 60% der zytosolischen Proteine neutrophiler Granulozyten ausmacht³³. Bei einer Entzündung der Darmschleimhaut kommt es zu einer vermehrten Migration der Granulozyten in die Mukosa und zu einer Freisetzung von FC in den Stuhl. Es konnte gezeigt werden, dass das FC gut mit der klinischen und endoskopischen Entzündungsaktivität korreliert^{34,35}. Es eignet sich besonders gut zur Verlaufsdagnostik in Remission und zur

Früherkennung von Rezidiven, da es im Gegensatz zum CRP auch einen guten negativen prädiktiven Wert aufweist³¹. Bei erhöhtem FC ist das Risiko eines Krankheitsschubs trotz klinischer Beschwerdefreiheit um 53-58% erhöht³⁶. Die Höhe des Cut-offs ist unklar. Neben der Eigenschaft als Screeningparameter kann das FC bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung gegenüber funktionellen Beschwerden, insbesondere dem Reizdarmsyndrom, hilfreich sein³⁷. Die weitere Labordiagnostik sollte individuell je nach Klinik und Ausprägung der Erkrankung erfolgen. Die gamma-Glutamyltransferase (GGT) und die alkalische Phosphatase (AP) können bei Vorliegen einer PSC erhöht sein. Bei einem ausgeprägten Befall des terminalen Ileums sollte an die Bestimmung des Vitamin-B12-Spiegels gedacht werden. Zur Beurteilung des Eisenhaushaltes eignet sich das Ferritin nur bedingt, da es als akute Phase Protein im Rahmen der Entzündungsreaktion erhöht sein kann. Daher sollten alternative Parameter wie die Transferrinsättigung oder der lösliche Transferrinrezeptor bestimmt werden. Im individuellen Kontext kann auch ein Screening auf Mangelerscheinungen, wie zum Beispiel Eisen oder Zink sinnvoll sein³⁸. Bei Erstdiagnose einer CED sollte außerdem immer ein Ausschluss einer Infektion mittels Stuhlprobe auf die häufigsten Erreger, wie *Campylobacter*, *Escherichia coli* und *Clostridium difficile* erfolgen³⁹.

Zur Standarddiagnostik bei Verdacht auf eine CED sollte im nächsten Schritt eine Ileokoloskopie mit Stufenbiopsien erfolgen. Der makroskopische Befund der Ileokoloskopie ist für die Stellung der Diagnose CED und die Differenzierung zwischen MC und CU wesentlich. Initial sollte beim MC zur Erfassung der kompletten Ausdehnung eine Dünndarmdiagnostik erfolgen. Hierfür sollte eine Magnetresonanz (MR)- oder Computertomographische (CT)-Enterographie, wegen der fehlenden Strahlenbelastung jedoch bevorzugt eine MR-Enterographie, erfolgen. Alternativ kann auch eine Sonographie durchgeführt werden. Alle drei Verfahren haben eine hohe Sensitivität zur Detektion von Dünndarmläsionen⁴⁰. Da 30% der Patienten mit MC einen Magenbefall aufweisen, sollte zudem initial eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) erfolgen⁴¹. Bei der CU ist die Durchführung der Sonographie bei Erstdiagnose und zur Verlaufsdagnostik im akuten Schub ausreichend, um Krankheitsaktivität und Ausdehnung zuverlässig zu erfassen^{42,43}.

Im Verlauf sollte zur Evaluation des Therapieansprechens nach drei Monaten eine erneute Beurteilung von Klinik und Entzündungsreaktion mittels Laborkenngrößen (CRP, FC) und die Durchführung einer Darmsonographie erfolgen. Nach Therapiebeginn oder -wechsel kann zusätzlich nach sechs bis neun Monaten eine endoskopische Kontrolle zur Beurteilung der mukosalen Heilung erfolgen, wenn sich hieraus eine klinische Konsequenz ergibt. In Studien konnte gezeigt werden, dass die mukosale Heilung mit der klinischen Remission korreliert⁴⁴. Bei der CU besteht ein erhöhtes Risiko für das kolorektale Karzinom (KRK)^{7,45}. Das Karzinomrisiko

ist deutlich erhöht bei einer ausgedehnten Kolitis, relevant erhöht bei Linksseitenkolitis und nicht relevant erhöht bei einer Proktitis⁴⁵. Insgesamt ergibt sich in Studien ein kumulatives Risiko für CU-assoziierte Karzinome über 30 Jahren von 18% und ein 2,4fach erhöhtes Risiko für ein KRK^{45,46}. Nach dem 6. bis 8- Erkrankungsjahr sollte unabhängig von der Erkrankungsaktivität eine Kontrollkoloskopie durchgeführt werden. Danach erfolgt eine Risikostratifizierung in ein niedriges, mittleres und hohes Karzinomrisiko, wonach sich das Intervall der Kontrollkoloskopien richtet. Auch beim MC besteht ein erhöhtes Risiko für das KRK, aber auch für Adenokarzinome des Dünndarms^{47,48}. Insgesamt sollte bei Kolonbefall die Karzinomprophylaxe analog zur CU erfolgen.

2.1.3. Therapieprinzipien bei CED

Die in diesem Kapitel beschriebenen Therapieprinzipien bei CED basieren auf den aktuellen S3-Leitlinien zur Behandlung von MC und CU^{49,50}.

Die Behandlung von CED folgt einer Stufentherapie. Diese wird individuell an die Krankheitsaktivität des Patienten angepasst. Die Therapie des akuten Krankheitsschubes wird von der Remissionserhaltung unterschieden. Beim akuten Schub des MC mit leichter Krankheitsaktivität kann Mesalazin⁵¹ oder Budesonid⁵² verwendet werden. Liegt eher ein distaler Befall vor, so können auch Klysmen, Suppositorien oder Schäume eingesetzt werden. Auch beim akuten Schub der CU sollte primär bei leichter bis mäßiger Krankheitsaktivität Mesalazin verwendet werden⁵³. Die Applikationsform richtet sich nach dem Befallsmuster. In der Zweitlinientherapie können auch topische Steroide verwendet werden. Beim akuten Schub mit hoher Krankheitsaktivität sollten sowohl beim MC als auch bei der CU systemisch wirksame Steroide verschrieben werden, die im Verlauf ausgeschlichen werden sollten. Das langfristige Therapieziel bei CED ist die steroidfreie Remission. Zur Remissionserhaltung wird beim MC eine Therapie mit Azathioprin (AZA)/6-Mercaptopurin oder Methotrexat (MTX) empfohlen. Bei weiterhin bestehender Symptomatik kann eine Eskalation auf therapeutische Antikörper (Biologika) erfolgen. Es können Tumor-Nekrosefaktor (ehemals TNF α , heute TNF) Antikörper, Ustekinumab oder Vedolizumab verwendet werden. Bei der CU wird zur Remissionserhaltung primär eine Therapie mit Mesalazin empfohlen. Zur Therapieeskalation können anti-TNF-Antikörper, Vedolizumab oder Thiopurine appliziert werden. Beim steroidrefraktären Verlauf wird beim MC die Verwendung der therapeutischen anti-TNF-Antikörper, Vedolizumab oder Ustekinumab empfohlen. Bei vorwiegendem Ileoözkalbefall ist außerdem die chirurgische

Ileozökalresektion zu erwägen. Bei der steroidrefraktären CU können anti-TNF-Antikörper, Tofacitinib, Ustekinumab, Ciclosporin oder Tacrolimus verwendet werden. Die Vor- und Nachteile einer Proktokolektomie sollten in diesem Fall mit dem Patienten besprochen werden, da die CU mit dieser chirurgischen Intervention heilbar ist. Ein steroidabhängiger Verlauf bei CED liegt vor, wenn drei Monate nach Beginn einer Steroidtherapie die Dosis eines Prednisolonäquivalents nicht unter 10 mg/d bzw. bei Budesonid unter 3 mg/d reduziert werden kann, ein erneuter Schub innerhalb von drei Monaten nach Absetzen der Steroidtherapie auftritt oder mehr als eine Steroidtherapie pro Jahr notwendig ist⁵⁴. In diesem Fall sind beim MC oder der CU Thiopurine, anti-TNF-Antikörper, Vedolizumab oder Ustekinumab zugelassen. Bei der CU kann Tofacitinib verwendet werden. Einen Überblick über die Therapieprinzipien gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Stufentherapie bei CED

	MC	CU
Akuter Schub: leicht/mäßige KH-Aktivität	Mesalazin, Budesonid (primär oral, bei distalem Befall topisch)	Mesalazin (je nach Befall topisch und/oder oral) evtl. topische Steroide
Akuter Schub: hohe KH-Aktivität	Systemische Steroide	Systemische Steroide
Remissionserhaltung	AZA/6-Mercaptopurin MTX anti-TNF-Atk Ustekinumab Vedolizumab	Mesalazin (oral und oder topisch) Anti-TNF-Atk Vedolizumab AZA/6-Mercaptopurin
Steroidrefraktär	Anti-TNF-Atk Ustekinumab Vedolizumab Ileozökalresektion	Anti-TNF-Atk Tofacitinib Ustekinumab Ciclosporin Tacrolimus Proktokolektomie
Steroidabhängig	AZA/6-Mercaptopurin MTX anti-TNF-Atk Vedolizumab Ustekinumab	AZA/6-Mercaptopurin anti-TNF-Atk Vedolizumab Tofacitinib Ustekinumab

Die Therapie von CED erfolgt anhand der dargestellten Stufentherapie je nach Krankheitsaktivität und -lokalisation. Die Daten basieren auf der aktuellsten S3-Leitlinie des MC bzw. der CU aus dem Jahr 2021^{49,50}.

Atk = Antikörper

2.1.4. Bedeutung monoklonaler Antikörper bei der Therapie von CED

Wie in Kapitel 2.1.3. bereits dargestellt wurde, nehmen monoklonale therapeutische Antikörper einen wichtigen Stellenwert in der Therapie von CED ein. Die historische Entwicklung der Verbreitung von monoklonalen Antikörpern zeigt, dass diese erstmals in der Transplantationsmedizin verwendet wurden. Muromonab war der erste 1985 zugelassene anti-CD3-Antikörper für Patienten mit Nierentransplantation⁵⁵. Daraufhin fanden monoklonale therapeutische Antikörper schnelle weltweite Verbreitung: 74 Antikörper-basierte Moleküle wurden für verschiedene Erkrankungen bis 2017 in den USA zugelassen⁵⁶. Ein Vorteil der Antikörper-basierten Therapie ist das breite Spektrum an Indikationen und möglichen Einsatzgebieten, wie zum Beispiel bei malignen Tumoren, chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.

Therapeutische Antikörper können hinsichtlich ihrer Molekülstruktur unterschieden werden. Es gibt murine, chimäre (> 65% human), humanisierte (> 80% human) oder vollständig humane (> 95% human) Antikörper⁵⁵. Die Nomenklatur beschreibt den Antikörperaufbau. Eine Erklärung der Nomenklatur der therapeutischen Antikörper gibt Abbildung 1.

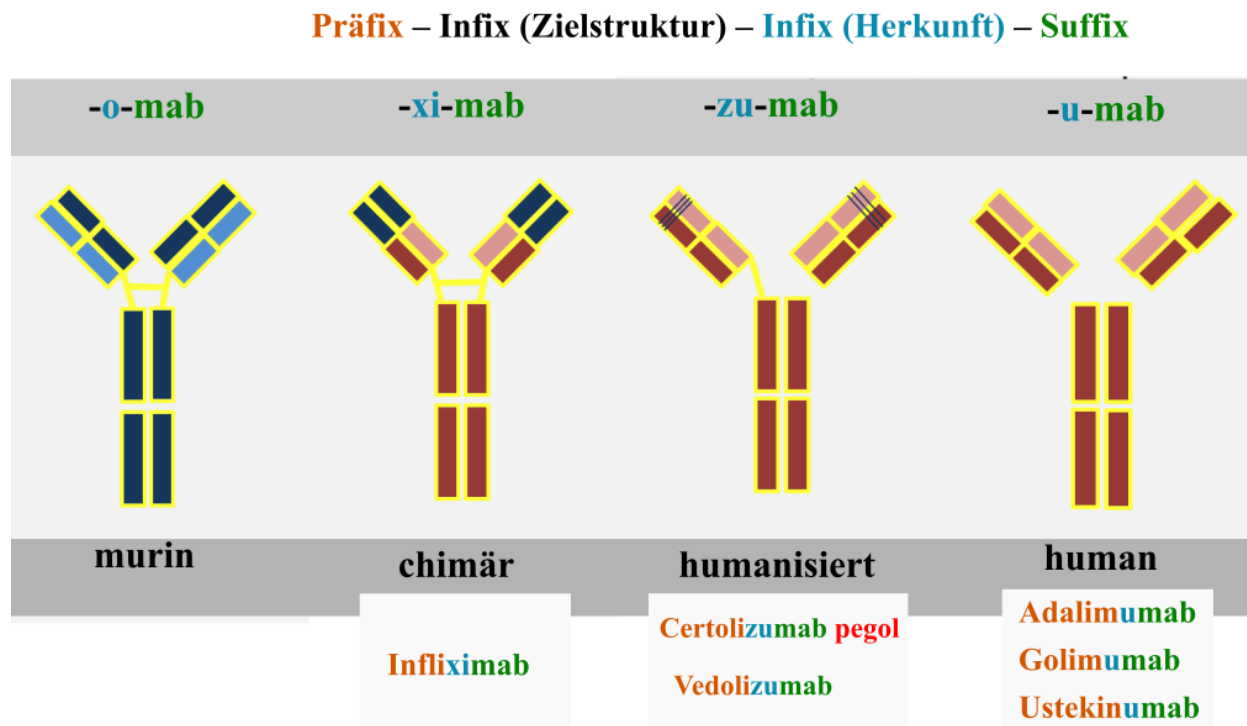


Abbildung 1: Nomenklatur therapeutischer monoklonaler Antikörper

Die Nomenklatur der Antikörper besteht aus einem Präfix, ein Infix je nach Zielstruktur oder Herkunft und den Suffix -mab. Als Beispiele sind die anti-TNF-Antikörper, Vedolizumab und Ustekinumab der jeweiligen Antikörpergruppe zugeordnet.

Grundsätzlich unterscheiden sich therapeutische Antikörper hinsichtlich ihrer Zielstruktur. Für die bei CED eingesetzten therapeutischen Antikörper sind unter anderem TNF, Integrine und Interleukine relevant.

TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das über eine Aktivierung von Signalkaskaden eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von systemischen inflammatorischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA), CED oder der Psoriasisarthritis einnimmt⁵⁷.

Anti-TNF-Antikörper sind Infliximab (IFX), Adalimumab (ALM), Golimumab (GOL), Certolizumab pegol (CEP) und Etanercept (ETN). IFX ist ein chimärer monoklonaler Immunglobulin G1 (IgG1) Antikörper mit 75% humanen und 25% murinen Anteil⁵⁸, wobei auf den humaen Fc Teils des Antikörpers die murine variable Region des Fab Fragments übertragen wird. ALM und GOL sind vollständig humanisierte IgG1 Antikörper und ETN ist ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Anteil des humanen TNF-Rezeptors 2 und der Fc Domäne des humanen IgGs⁵⁷. Bei CEP handelt sich um ein PEG-yliertes Fab Fragment eines humanisierten monoklonalen anti-TNF-Antikörpers⁵⁷. Trotz ihrer gemeinsamen Zielstruktur unterscheiden sich die anti-TNF-Antikörper hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei CED. Gute Wirksamkeit bei CED zeigen die vollständigen monoklonalen Antikörper IFX, ALM und GOL^{59,60}. Für GOL liegt nur eine Zulassung bei CU vor. Auch für CEP ist eine ausreichende Wirksamkeit zur remissionserhaltenden Therapie bei MC beschrieben. Eine Zulassung für CEP bei MC liegt jedoch nur in der Schweiz und den USA vor⁵⁹. ETN hingegen zeigt keine Wirksamkeit bei CED.

Bei Vedolizumab (VLZ) handelt es sich um einen humanisierten anti- $\alpha4/\beta7$ -Integrin-IgG4-Antikörper⁶¹. $\alpha4/\beta7$ -Integrin ist ein Adhäsionsprotein auf der Oberfläche darmspezifischer Lymphozyten⁶². VLZ wirkt somit im Gegensatz zu anti-TNF-Antikörper darmspezifisch und blockiert dort die Migration von Lymphozyten und somit die intestinale Entzündung. VLZ ist in Deutschland zugelassen für die Induktions- und Remissionserhaltungstherapie bei MC und CU⁶². Ustekinumab (USK) ist ein humaner IgG1 Antikörper und gegen die proinflammatorischen Interleukine (IL) IL-12 und IL-23 gerichtet⁶³. Dadurch wird die Immunantwort durch T-Helferzellen vom Typus 1 bzw. 17 beeinflusst⁶³. USK ist in Deutschland für MC und CU beim steroidrefraktären oder steroidabhängigen Verlauf zugelassen. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der bei CED eingesetzten therapeutischen Antikörper.

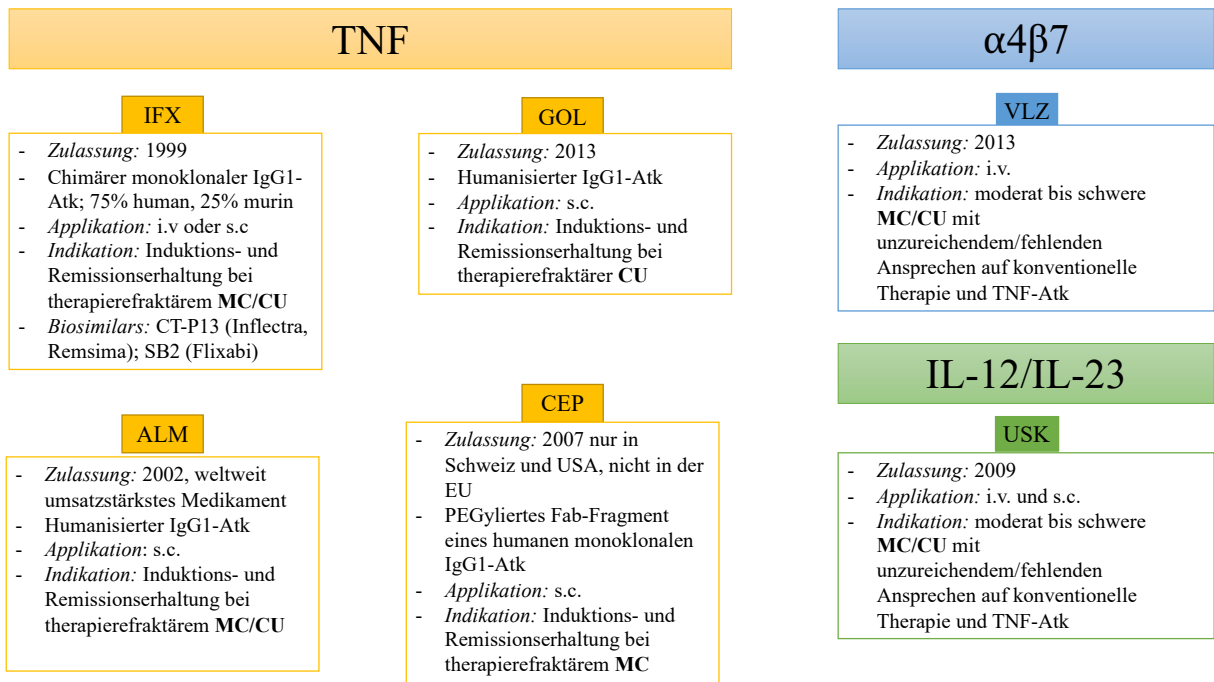


Abbildung 2: Übersicht therapeutischer Antikörper zur Therapie von CED

Die therapeutischen Antikörper sind je nach ihrem Angriffspunkt in Gruppen geordnet. Es werden TNF-Antagonisten, $\alpha 4/\beta 7$ -Integrin-Antikörper und IL-12/IL-23-Antikörper unterschieden. Darunter sind die jeweiligen Präparate bezüglich Zulassung, Struktur, Applikationsform, Indikation und Besonderheiten beschrieben

2.1.5. Immunogenität: Entwicklung von Anti-Drug Antikörpern

Auch wenn der Einsatz von Biologika eine Revolution in der Therapie von CED bedeutete, sprechen einige Patienten nicht auf die Behandlung mit diesen therapeutischen Antikörpern an. 10-13% der Patienten mit CED sind bereits primär therapieresistent^{64,65} (primäres Therapieversagen) und bis zu 50% erleiden ein Therapieversagen während der Remissionserhaltung⁶⁶ (sekundäres Therapieversagen, eng.: *loss of response*, LOR). Einer der wichtigsten Faktoren für das Therapieversagen ist die Immunogenität gegen Biologika. Das immunogene Potential der therapeutischen Antikörper ist abhängig von patienten- und medikamentenassoziierten Faktoren⁶⁷. Die Entwicklung von Anti-Drug Antikörpern (ADA) beeinflusst die Pharmakokinetik und -dynamik und damit auch die Effektivität und Sicherheit der therapeutischen Antikörper. Studien konnten zeigen, dass die ADA-Bildung mit Therapieversagen, erhöhter Medikamenten-Clearance, vermehrten Nebenwirkungen und niedrigen Serumspiegeln bei der Therapie mit IFX assoziiert ist⁶⁸. Vor allem bei Patienten mit CED ist die Immunogenität und die ADA-Bildung ein Problem. Mit 15.8% haben Patienten mit

CED die höchste Rate an ADA-Bildung gegen anti-TNF-Antikörper verglichen mit anderen inflammatorischen Erkrankungen, wie der RA oder den Spondylarthritiden⁶⁹. Die Inzidenz an ADA zeigt jedoch, je nach anti-TNF-Antikörper, eine breite Variabilität. Bis zu 63.3% der Patienten entwickeln unter Therapie mit IFX im Verlauf ADA, während es unter ADM-Therapie nur bis zu 38% sind⁶⁸. Trotz dieser Heterogenität besteht Konsens, dass IFX aufgrund der chimären Struktur das höchste immunogene Potential hat. Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Höhe des ADA-Spiegels. Dazu zählen unter anderem der Zeitpunkt der Bestimmung, die Methode des verwendeten Assays, die Studienpopulation und Kriterien für ADA-Positivität⁶⁸. Des Weiteren können ADA bezüglich ihrer Eigenschaften charakterisiert werden. Neutralisierende ADA binden direkt das IFX-Paratop des Fab-Fragments des anti-TNF-Antikörpers⁷⁰. Durch die ADA-Bindung wird die Funktion des therapeutischen Antikörpers blockiert. Nicht-neutralisierende ADA binden an funktionell nicht relevanten Strukturen des Antikörpers. Trotzdem können sie negative Effekte auf die Wirkung der Biologika haben, zum Beispiel durch die Bildung von Immunkomplexen und Erhöhung der Clearance⁷⁰. Des Weiteren können **transiente** und **persistente ADA** unterschieden werden. Vor allem ADA in niedrigen Konzentrationen sind häufig transient und verschwinden in 28% der Fälle⁷¹. Somit zeigt der ADA-Nachweis nicht immer ein drohendes Therapieversagen an. Es ist daher wichtig, die Charakteristika der ADA und deren potenziell negativen Effekte zu berücksichtigen.

In Anbetracht der Immunogenität ist das Management von CED-Patienten unter Therapie mit therapeutischen Antikörpern nicht einfach und verlangt regelmäßige Kontrollen der Serumspiegel der Biologika und eine Beobachtung der Immunantwort darauf unter Berücksichtigung der ADA-Spiegel. Da in dieser Studie ausschließlich Patienten unter IFX-Therapie eingeschlossen werden, werden die ADA im Folgenden als *Antibodies-to-Infliximab* (ATI) bezeichnet. Sowohl ATI als auch LOR sind etablierte Begriffe in der englischsprachigen Fachliteratur.

2.1.6. Therapeutisches Drug- und Immunogenitätsmonitoring bei CED

Die Durchführung des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) ist für die Situation des Wirkverlustes der Biologika-Therapie Standard. In der Regel wird der Talspiegel (TL) des Medikaments bestimmt. Das entspricht der Konzentration des Medikaments im Serum, die unmittelbar vor der nächsten Applikation gemessen wird. Wird zusätzlich noch der ADA-Spiegel bestimmt, handelt sich um ein therapeutisches Drug- und Immunogenitätsmonitoring (TDIM). Man unterscheidet zwei Arten des TDIMs. Das reaktive TDIM wird nach dem Therapieversagen

durchgeführt und soll durch die Bestimmung der Konzentration des Biologikums und der ADA Hinweise auf die Ursache des Therapieversagens geben. Das proaktive TDIM wird auch in Remission regelmäßig durchgeführt und soll ein Therapieversagen durch regelmäßiges Monitoring verhindern, indem der behandelnde Arzt einen etwaigen Wirkverlust frühzeitig feststellen und darauf reagieren kann⁷²⁻⁷⁸. Für das TDIM gibt es mittlerweile zahlreiche auf unterschiedlichen Methoden basierende Testverfahren. In der klinischen Routine ist insbesondere der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) in verschiedenen Varianten verbreitet, da er einfach und relativ schnell anzuwenden ist und zudem in den meisten Laboren die benötigten Instrumente verfügbar sind^{72,79}. Darüber hinaus eignen sich der Radioimmunassay (RIA), chromatographische Methoden (*Homogeneous mobility shift assay*, HMSA), zellbasierte Assays (Reporter-Gene-Assay, RGA) und die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) zur IFX- und ATI-Bestimmung^{70,79-82}. SPR-basierte Testverfahren werden, im Gegensatz zu den anderen aufgezählten Methoden, noch nicht routinemäßig angewandt.

2.2. Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie

Im Folgenden soll die Biosensorik mittels Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie vorgestellt werden.

2.2.1. Grundlagen der Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie ermöglicht es, Interaktionen zwischen Proteinen in Echtzeit und markierungsfrei zu beobachten. Es können Informationen über die biochemische Zusammensetzung von Proben und die Kinetik des Analyten gewonnen werden. Auf einem Sensorchip werden ausgewählte Liganden gekoppelt. Über ein Flusssystem gelangt der Analyt an die Chipoberfläche und kann dort mit dem Liganden interagieren. Mit Hilfe eines optischen Detektorsystems kann die Interaktion zwischen Analyt und Ligand verfolgt werden. Als Biosensor wird die Einheit aus Sensorchip, Flusszellen und optischem Detektionssystem bezeichnet.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation werden die SPR-Messungen mit einem BIACORE® X100 von *Cytiva* durchgeführt. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung von Biosensor und Detektionsverfahren.

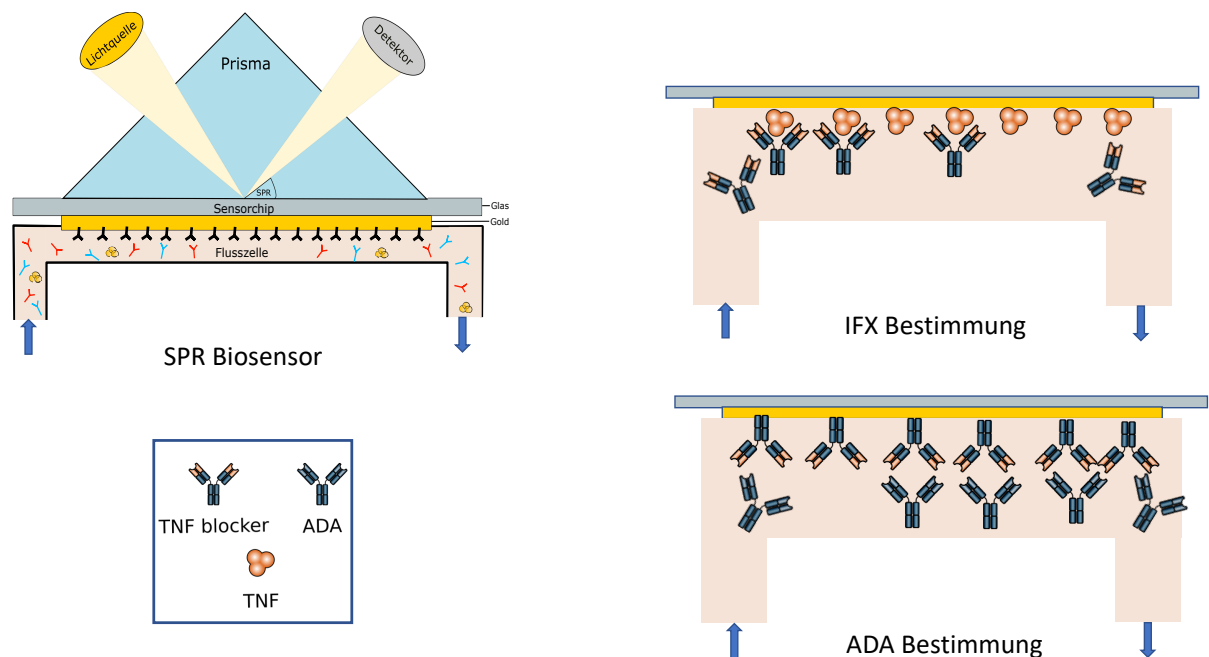


Abbildung 3: Prinzip der Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie

Schematische Darstellung eines Biosensors bestehend aus Sensorchip, Flusszelle und optischem Detektionssystem. Die Serumprobe, hier schematisch mit IFX, ADA und TNF, fließt über den Sensorchip und die enthaltenen Komponenten können mit der Biosensoroberfläche interagieren. Bindungsereignisse auf der Biosensoroberfläche ändern den Brechungsindex des Mediums. Diese Änderungen können unter Ausnutzung des Phänomens der Oberflächenplasmonen-Resonanz detektiert werden.

2.2.2. Sensorchip

Der Sensorchip besteht aus einer Glasplatte, die mit einer dünnen Goldschicht beschichtet ist. Auf die Goldschicht aufgetragen ist bei den verwendeten CM5-Chips eine Dextranmatrix, die mit Carboxymethyl-Gruppen funktionalisiert ist. Über diese Gruppen erfolgt im Rahmen der Immobilisierung dann die kovalente Bindung des Ligandenproteins an den Chip. Bei der Immobilisierung sind Schichtdicke und Packungsdichte der polymeren Dextranmatrix entscheidend. Die Dicke des Polymers hat Einfluss auf die Diffusionsrate und die Dichte ist relevant für die Immobilisierungskapazität.

2.2.3. Optisches Detektionssystem

Das optische Detektionssystem besteht aus einer Lichtquelle, einem Glasprisma und einem Detektor. Der Nachweis der Molekülinteraktion zwischen Analyten und Ligand beruht auf dem optophysikalischen Phänomen der Oberflächenplasmonen-Resonanz:

Ein Strahl polarisierten Lichts trifft auf die Goldoberfläche des Sensorchips und die Photonen interagieren aufgrund ihres Teilchencharakters mit den freien Elektronen im Metall. Dies führt unter den Bedingungen der Totalreflexion zu einer Anregung der Elektronen in Form von Oszillation in der Metalloberfläche. Die oszillierenden Elektronen werden Oberflächenplasmonen genannt. Hierdurch wird ein elektrisches Feld mit einer Ausbreitung von ca. 300 nm zwischen Metall und dem angrenzenden Medium, z.B. der zu analysierenden Probe, generiert⁸³. Im Resonanzfall erzeugen die Oberflächenplasmonen ein Intensitätsminimum im reflektierten Lichtstrahl, das in einem charakteristischen Winkel, dem sogenannten SPR-Winkel, auf dem Detektor eintrifft. Der SPR-Winkel ist unter anderem abhängig von der Beschaffenheit der Metallschicht, der Wellenlänge der Lichtquelle und dem Refraktionsindex des Materials nahe der Sensoroberfläche, wobei die ersteren beiden Einflüsse in einem SPR-Gerät konstant gehalten

werden. Molekülinteraktionen nahe der Goldoberfläche führen zu einer Änderung des Refraktionsindex und damit des SPR-Winkels, die in Echtzeit detektiert werden. SPR-Signale werden als refraktäre Einheiten (engl. *refractive units*, RU) angegeben, wobei ein RU einer Winkeländerung von 10^{-4} Grad bzw. einer Proteinanbindung von 1 pg/mm^2 entspricht⁸³. Die geläufigste Darstellungsform von SPR-Daten stellt das Sensorgramm dar, in welchem die Verschiebung des SPR-Winkels in RU gegen die Zeit aufgetragen ist.

2.3. Ziele der Arbeit

Der zunehmende Einsatz therapeutischer Antikörper bei der Behandlung von CED bringt neben vielversprechenden Remissionsraten auch neue Herausforderungen mit sich. Ein Problem ist die Immunogenität der Biologika und die daraus resultierende ADA-Bildung. Die klinische Relevanz der ADA-Detektion ist unklar und es besteht Unsicherheit bei der Interpretation nach dem Nachweis von ADA. Auch laborchemisch stellt die ADA-Detektion aufgrund der verschiedenen ADA-Charakteristika eine Herausforderung dar. Es gibt keine Referenzmethode für die IFX- und ATI-Konzentrationsbestimmung. Am meisten verbreitet ist der ELISA^{72,79,81}. Die Durchführung eines ELISAs bringt einige Nachteile mit sich, zum Beispiel die vergleichbar lange Dauer und die zahlreichen Wasch- und Inkubationsschritte, die die ADA-Bestimmung verfälschen können⁸⁰. Ein weiteres Problem ist die fehlende Standardisierung. Das ist vor allem bei der ADA-Quantifizierung problematisch. Die Ergebnisse verschiedener Testverfahren sind nicht vergleichbar, da ein Bezug auf einen einheitlichen, international konsentierten Kalibrator fehlt^{72,79,81}. Eine Alternative stellt die IFX- und ATI-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor dar. Diese ermöglicht eine Bestimmung der Antikörperinteraktionen markierungsfrei und in Echtzeit. Dadurch können zusätzliche Informationen über die Kinetik der ADA gewonnen werden^{84,85}.

Von Grasmeyer *et al.* wurden SPR-Biosensor basierte Testverfahren zur IFX- und ATI-Konzentrationsbestimmung entwickelt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die auf der SPR-Biosensorik basierten Assays mit dem zur Diagnostik akkreditierten ELISA-Verfahren zu vergleichen. Die entwickelten SPR-Testverfahren sollen durch die Vermessung einer größeren Zahl von Patientenserum evaluiert werden.

Des Weiteren soll anhand des Patientenkollektivs, insbesondere der vorhandenen ATI-Diagnostik via ELISA, die klinische Relevanz der ATI bei Patienten mit remissionserhaltender Therapie mit IFX untersucht werden und somit ein neuer Blickwinkel auf die Evaluierung von TDIM-Daten geschaffen werden. Es wurde eine retrospektive Untersuchung von Patienten mit MC und CU über einen Zeitraum von vier Jahren durchgeführt. Dabei wurde die Assoziation zwischen ATI-Konzentration und klinischem Outcome, Nebenwirkungen, Behandlungsdauer und labormedizinischen Parametern untersucht. Die Auswertung soll eine Aussage zur Bedeutung des proaktiven TDIM ermöglichen.

3. Studienpatienten, Material und Methoden

3.1. Studienpatienten und Materialien

3.1.1. Patientendaten

Klinische Daten, labormedizinische Kenngrößen und Serumproben wurden von Herrn Prof. Dr. Peter Langmann, Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis Karlstadt, zur Verfügung gestellt. Die Patienten sind an MC oder CU erkrankt und wurden mit IFX (Remicade®) oder entsprechenden Biosimilars (Remsima®, Inflectra®) behandelt. Nach Pseudonymisierung der Patienten wurden zusätzliche Daten über die Datenbank der Praxis retrospektiv über einen Zeitraum von vier Jahren (04/16-04/20) gesammelt. Die erfassten Merkmale sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Vor der nächsten IFX-Infusion wurden der IFX-TL und der ATI-Spiegel im Rahmen eines proaktiven TDIM-Schemas routinemäßig in der gastroenterologischen Praxis bestimmt. Für die Studie wurde bei einem Teil der Patienten zusätzlich Vollblut entnommen, zentrifugiert und das Serum bis zum Weitertransport bei -20°C gelagert. Die Serumproben wurden dem Klinikum rechts der Isar in München zur Verfügung gestellt, bei -80°C aufbewahrt und anschließend im Rahmen der SPR-Analysen eingesetzt. Für die Studie wurden dem Klinikum rechts der Isar 145 Serumproben von 41 Patienten bereitgestellt. Weitere 407 Serumproben dieser Patienten konnten aus der retrospektiven Analyse mit in die statistische Auswertung einbezogen werden.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt (Nummer 289/19 S, Kapitel 9 Anhang). Alle Patienten, aber auch gesunde Kontrollpersonen (siehe 3.1.1) wurden den Richtlinien der Ethikkommission entsprechend mündlich und schriftlich aufgeklärt. Schriftliche Einverständniserklärungen liegen vor.

Tabelle 2: Erfasste Patientenmerkmale aus der Datenbank

Erfasste Merkmale aus der Datenbank
▪ Alter [<i>Jahre</i>]
▪ Geschlecht
▪ Datum der Blutentnahme
▪ IFX-Talspiegel ^a [$\mu\text{g/mL}$]
▪ ATI-Spiegel ^a [AU/mL]

-
- Dosisintervall [*Wochen*]
 - IFX-Dosis [*mg/kg KG*]
 - Therapiedauer^b [*Wochen*]
 - CRP [*mg/dL*]
 - FC [*μg/g*]
 - immunsuppressive Komedikation (AZA und/oder Glukokortikoide) [*mg*]
 - Remission^c
 - Nebenwirkungen auf IFX^d
 - Endoskopisches Bild
-

^aBestimmung im medizinischen Labor Oldenburg

^bDie Therapiedauer wird definiert vom Zeitpunkt T₀ bis T_x. T₀ ist die erste vorhandene Serumprobe und T_x die letzte im Beobachtungszeitraum, unabhängig davon, ob die Therapie abgebrochen wurde oder danach noch fortgeführt wurde.

^cDefinition sh. Kapitel 3.2.4.4.1

^dUnterscheidung zwischen kutanen, anaphylaktischen und sonstigen Nebenwirkungen

3.1.2. Negativserum

Vollblut wird von freiwilligen Spendern (nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung, siehe 3.1.1.) in Serum-Gel-Monovetten (S-Monovette® Sarstedt) abgenommen, zentrifugiert und die Seren aliquotiert bei -20°C gelagert. Durch homogene Mischung dieser Seren entsteht das Negativserumpool (NSP).

3.1.3. Antikörper, Proteine und Medizinprodukte

Verwendete Antikörper, Proteine und Medizinprodukte für die Entwicklung des SPR-Biosensors sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper, Proteine und Medizinprodukte

Antikörper	Hersteller	Produktnummer
Human anti-infliximab	<i>Bio-Rad, Hercules, USA</i>	<i>HCA233</i>
Mouse anti-human	<i>Dianova, Hamburg,</i>	<i>209-005-082</i>

IgG (H+L)	<i>Deutschland</i>
-----------	--------------------

Protein	Hersteller	Produktnummer
humanes rekomb. TNF	<i>Sino Biological, Wayne, USA</i>	10602-HNAE
humanes Transferrin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</i>	T3309
Blocker™ Casein	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>	37528

Medizinprodukt	Hersteller	Pharmazentralnummer
Remicade®	<i>Janssen Biologics BV, Leiden, Niederlande</i>	10822631

3.1.4. Chemikalien

Die für die Entwicklung des SPR-Biosensors verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) Hydrochlorid	<i>GE Healthcare Life Sciences Life Sciences, Marlborough, USA</i>
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</i>
Ethanol (EtOH)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Ethanolamin	<i>GE Healthcare Life Sciences Life Sciences, Marlborough, USA</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Glycin	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Guanidinhydrochlorid (Gu-HCl)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Magnesiumchlorid (MgCl)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	<i>GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA</i>

Kaliumthiocyanat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumacetat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Tween 20	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Tween 80	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Urea	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Zwittergent	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>

3.1.5. Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 5 aufgetragen.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer	pH	Zusammensetzung
PBS	7.4	2.6 mM KCl, 138 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄
PBS-C	7.4	PBS mit 0.25 % (w/v) Casein

3.1.6. Regenerationslösungen

Die Regeneration des Biosensor-Chips wird mit der optimierten Methode nach Grasmeier *et al.* durchgeführt⁸⁶. Dafür werden für den IFXmon Assay die Lösungen RL4 und BIw verwendet und für den ADAmon Assay RL4 und RLB, deren Zusammensetzung in Tabelle 6 beschrieben ist.

Tabelle 6: Regenerationslösungen

Stocklösung	pH	Zusammensetzung
B (basic)	9.0	100 mM Glycin, 100 mM Ethanolamin
C (chelating)	-	20 mM EDTA
D (detergent)	-	0.3% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) Zwittergent, 0.3% (v/v) Tween 20, 0.3% (v/v) Tween 80

I (high ion strength)	-	460 mM KSCN, 1,83 M MgCl ₂ , 1.83 M Gu-HCl, 920 mM Urea
BIw	-	B:I:H ₂ O (1:1:1)
RL4	1.5	10 mM Glycin, C, D, (1:1:1); pH mit HCl auf 1.5 eingestellt
RLB ⁸⁰		3.3 M MgCl ₂ , 5 mM EDTA

Die Regenerationslösung RLB wurde übernommen aus dem Assay von Beeg et al⁸⁰.

3.1.7. Kits und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 zeigt verwendete Kits und Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 7: Kits und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
S-Monovette	<i>Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland</i>
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (für Biacore); zugehörige Verschlusskappen aus Gummi	<i>GE Healthcare Life Sciences Life Sciences, Marlborough, USA</i>
Sensor Chip CM5	<i>GE Healthcare Life Sciences Life Sciences, Marlborough, USA</i>
Falconröhrchen, 15 und 50 mL	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland</i>
Flaschenfilter; 0.22 µm pH-Indikatorstreifen; Mikroreaktionsgefäß, 2, 1.5 und 0.5 mL	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i> <i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i> <i>Sarstedt, Newton, USA</i>

Kit	Hersteller
RIDASCREEN® IFX Monitoring	<i>R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland</i>
RIDA®QUICK IFX Monitoring	<i>R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland</i>

3.1.8. Geräte und Software

In Tabelle 8 sind verwendete Geräte und Softwares aufgeführt.

Tabelle 8: Geräte und Softwares

Geräte	Hersteller
Biacore X100	<i>GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA</i>
Zentrifuge	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
Schüttler	<i>IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland</i>
Vortexer Vortex Genie 2	<i>Scientific, Bohemia, USA</i>
Analysewaage AC 120S	<i>Sartorius, Göttingen, Deutschland</i>
pH-Meter PB11	<i>Sartorius, Göttingen, Deutschland</i>

Software	Hersteller
EVA	<i>Abasoft, Ludwigsburg, Deutschland</i>
Microsoft Office	<i>Microsoft Corporation, Redmond, USA</i>
GraphPad Prism 9.0	<i>GraphPad Software, San Diego, USA</i>
Biacore X100 Control Software	<i>GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA</i>
Biacore Evaluation Software	<i>GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA</i>

3.2. Methoden

Die Entwicklung und Validierung der SPR-Biosensoren und Messabläufe wird in der Dissertation von Melina Grasmeier, TU München, Fakultät für Chemie, beschrieben (noch nicht eingereicht). Die in dieser Arbeit beschriebene Version des Assays zur ATI-Bestimmung ist unreif (siehe Ergebnisse 4.1.2.). Eine optimierte und validierte Version wird in der Dissertation von Frau Grasmeier beschrieben.

3.2.1. Aufbau und Vorbereitung des Sensorchips

Für die Messungen werden CM5-Chips verwendet. Sie bestehen aus einer Glasscheibe, die mit einer dünnen Goldoberfläche beschichtet ist. Darauf befindet sich eine carboxymethylierte Dextranmatrix, die sich zur Kopplung von Biomolekülen eignet. Bei Proteininteraktionen sollte die Dextranmatrix 50-100 nm dick sein und eine hohe Dichte besitzen, wie es bei dem CM5-Chip der Fall ist⁸⁷. Die Chips werden bei 4°C gelagert und vor der Verwendung ca. 15 min auf

Raumtemperatur äquilibriert, um die Bildung von Kondenswasser auf der Goldoberfläche zu vermeiden.

3.2.2. Immobilisierung des Liganden

Bei der Immobilisierung des Liganden wird die Flussrate auf 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt. Die Analysetemperatur beträgt 25°C und als Laufpuffer wird PBS verwendet. Für die Bestimmung der IFX-Konzentration wird humanes TNF als Ligand auf der aktiven Flusszelle Fc2 und humanes Transferrin (hTf) als Referenzprotein auf der Flusszelle Fc1 immobilisiert. Zur Bestimmung der ATI-Konzentration wird Remicade[®] auf der aktiven Flusszelle Fc2 und der Referenzantikörper hTf auf der Referenzflusszelle Fc1 immobilisiert. Die zur Immobilisierung eingesetzten Ligandenlösungen haben jeweils eine Konzentration von $75 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Die Immobilisierung umfasst folgende Schritte (Abbildung 4):

- Testinjektion für Anbindungsziel
- Aktivierung der Sensoroberfläche mit EDC/NHS
- Immobilisierung des Liganden
- Deaktivierung der Sensoroberfläche

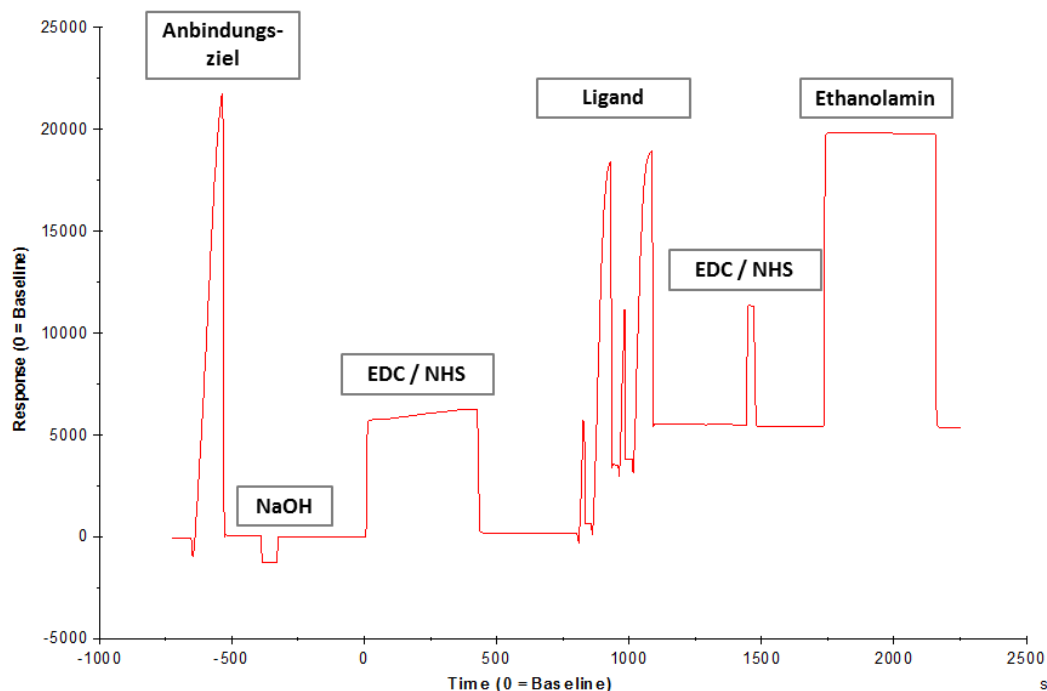


Abbildung 4: Sensorgramm der Immobilisierung

Beispielhaftes Sensorgramm während der Immobilisierung von humanem TNF mit den korrespondierenden Schritten über die Zeit.

3.2.2.1. Anbindungsziel

Für die Immobilisierung wird ein automatisiertes Wizard-Protokoll verwendet, damit die erreichten Anbindungen der Liganden reproduzierbarer werden. Dabei wird in einer ersten Injektion der Ligand über die entsprechende Flusszelle gegeben und überprüft, ob die maximale Änderung des refraktiven Index im Erfassungsbereich des Geräts liegt und um eine Schätzung für die Steilheit des Injektionspeaks für die nachfolgende Titration des Liganden zu erhalten. Als Anbindungsziel werden in beiden Assays 5000 RU festgelegt. Anschließend wird die Sensoroberfläche mit Natriumhydroxid gereinigt, bevor die eigentliche Immobilisierung des Liganden erfolgt.

3.2.2.2. Aktivierung der Sensoroberfläche

Die Sensoroberfläche wird aktiviert, indem die negativ geladenen Carboxylgruppen der Dextranmatrix mit EDC/NHS aminreaktive NHS-Ester bilden. Dafür wird eine Mischung aus 200 mM EDC und 50 mM NHS für 420s über die Flusszellen injiziert.

3.2.2.3. Immobilisierung des Liganden

Kurz vor der Injektion wird die entsprechende Lösung mit dem Liganden hergestellt. Dafür wird der Ligand in 10 mM Natriumacetat pH 4.5 gelöst. Bei entsprechend niedrigem pH wird der Ligand unter den isoelektrischen Punkt angesäuert und dadurch an basischen Aminosäureketten protoniert, wodurch positive Ladungen entstehen. Diese verbessert die Interaktion mit der negativ geladenen Carboxydextranmatrix und die primären Amine des Proteins reagieren mit den NHS-Estern unter Bildung von stabilen kovalenten Peptidbindungen. Dieser Schritt wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

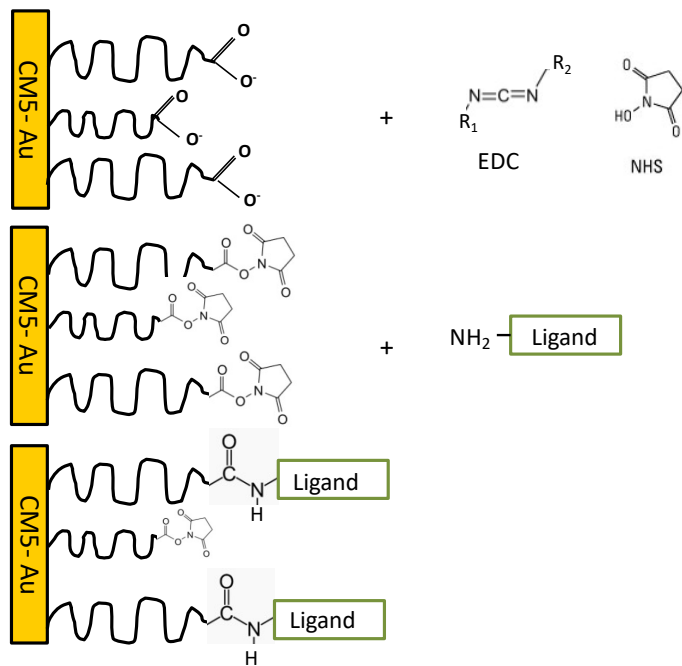


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immobilisierung des Liganden

Dargestellt ist ein CM5-Chip mit der Goldoberfläche und der damit beschichteten Dextranmatrix. Nach der EDC/NHS-Injektion bilden sich reaktive NHS-Ester, die anschließend mit dem Liganden unter Ausbildung einer Peptidbindung reagieren.

3.2.2.4. Deaktivierung der Sensoroberfläche

Nicht alle aktiven Ester reagieren nach der EDC/NHS Injektion mit dem Liganden. Daher ist eine Absättigung der Estergruppen mit 1 M Ethanolamin pH 8.5 für 420 s notwendig. Dadurch wird eine homogene Sensoroberfläche gewährleistet und eine Immobilisierung von Analyten verhindert.

3.2.3. Bestimmung der IFX- und ATI-Konzentrationen

3.2.3.1. Testprinzip

Grundsätzlich wird die Flussrate auf 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Analysetemperatur von 25°C eingestellt. Als Laufpuffer wird PBS-C verwendet. Das enthaltene Casein dient als Blocking-Reagenz zur Reduktion von unspezifischen Bindungen. Nach der Immobilisierung der Liganden wird das

System in Laufpuffer äquilibriert bis die Basislinie stabil ist. Analytlösungen und Verstärkerantikörper werden, anders als bei der Immobilisierung, über beide Flusszellen injiziert. Die Protokolle für den Assay für Infliximab (im folgenden „IFXmon“ genannt) und den Assay für die ATI (im folgenden „ADAMon“ genannt) bei der Injektion des jeweiligen Analyten bestehen aus folgenden Schritten:

- a) Injektion des Analyten für 300s
- b) Reinigung des Probenloops von Serumbestandteilen mit Isopropanol-NaOH
- c) Injektion des Verstärkerantikörpers für 300s bis zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts. Der Verstärkerantikörper wird nur bei der Bestimmung der IFX-Konzentration verwendet.
- d) IFXmon: Regeneration mit RL4 für 25s und BIw für 12s oder
- e) ADAMon: Regeneration mit RL4 für 25s und RL-B für 12s.

3.2.3.2. Kalibrierung und Qualitätskontrollen

Bei jeder Messung von Patientenproben wird eine Kalibrierkurve aus sieben Verdünnungen des entsprechenden Kalibrierungsantikörpers, der in 1:50 verdünntem NSP gespikt wird, mitgeführt. Für die IFX-Konzentrationsbestimmung wird als Kalibrator Remicade[®] benutzt. Das IFX-Signal wird durch einen murinen Verstärkerantikörper gegen humanes IgG (eingesetzte Konzentration: 50 µg/mL) verstärkt. Zur Bestimmung der ATI-Konzentration wird der humane anti-Infliximab Antikörper (HCA233, Bio-Rad) als Kalibrator verwendet. Beim ADAMon-Biosensor ist eine spezifische Verstärkung der ATI nicht möglich, da ein Antikörper gegen humane IgGs mit dem IFX auf der Flusszelle Fc2 kreuzreagieren würde. Die relative Anbindung des Analyten wird nach ca. 400 s im Sensorgramm bestimmt. Die Kalibrierkurve wird mit einem logistischen 5-Parameter-Modell gefittet und für die Konzentrationsbestimmung der Patientenproben genutzt. Zudem werden drei Qualitätskontrollen pro Lauf für die Messung der IFX-Konzentration mitgeführt. Für diese wird eine Konzentration von 7 µg/mL gewählt, da sie im therapeutischen Bereich des Wirkspiegels von IFX liegt. Für die ATI-Konzentrationsbestimmung werden fünf Qualitätskontrollen mit einer Konzentration von jeweils 50 µg/mL mitgeführt.

3.2.3.3. Spezifische Anbindung an die Flusszellen

NSP gespikt mit Remicade® (IFXmon) oder ATI (ADAMon), bzw. die Patientenproben werden in einer 1:50-Verdünnung über die beiden Flusszellen injiziert. Die Serumverdünnung dient der Reduktion des „Bulk-Effekts“ und der Verdünnung unspezifisch bindender Serumbestandteile zur Schonung des Sensors. Der „Bulk-Effekt“ entsteht durch Unterschiede im Brechungsindex zwischen Serum und Laufpuffer.

In der Abbildung 6 ist beispielhaft ein Sensorgramm dargestellt, das die unterschiedliche Anbindung an beide Flusszellen zeigen. Die spezifische Bindung von IFX an das immobilisierte TNF ergibt sich durch Subtraktion der unspezifischen Anbindung an die Referenzflusszelle an hTf von der Anbindung auf der aktiven Flusszelle. Zudem werden mehrere Null-Proben (Blanks) bei den Messungen mitgeführt. Ein Blank besteht aus 1:50 verdünntem NSP. Der Blank vor der jeweiligen Messung der Patientenserum wird von der jeweiligen Patientenprobe abgezogen. Diese doppelte Korrektur verbessert Qualität und Zuverlässigkeit der Daten⁸⁸. Im ADAMon-Assay wird von der ATI-Anbindung an Remicade® auf der aktiven Flusszelle die Anbindung von ATI an das immobilisierte hTf auf der Referenzflusszelle abgezogen, um die spezifische ATI-Anbindung zu erhalten.

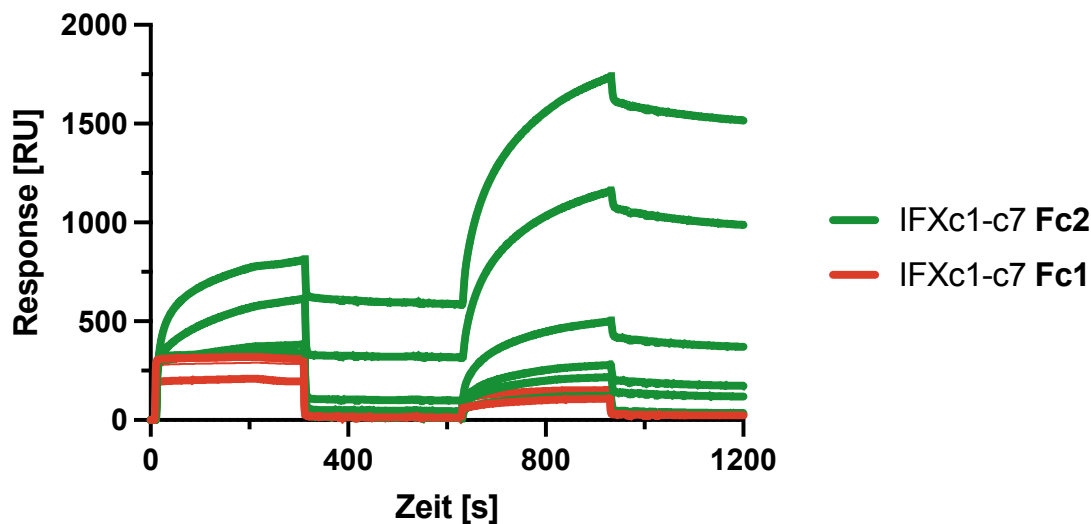


Abbildung 6: Sensorgramm während der Kalibrierung mit Anbindung auf die Flusszelle Fc1 und Fc2

Das Sensorgramm zeigt beispielhaft die IFX-Anbindung auf die aktive Flusszelle Fc2 in grün für die sieben verschiedenen IFX-Konzentrationen während der Kalibrierung des IFXmon-Assays. Auf der Referenzflusszelle Fc1 kommt es lediglich zu unspezifischer Anbindung.

3.2.3.4. Kalibriermethoden

Es werden insgesamt vier verschiedene Kalibriermethoden durchgeführt und anschließend verglichen, welche sich am besten nach Interpolierung zur Rückrechnung auf die IFX- bzw. ATI-Konzentration eignet. Die Fc2-1 Werte werden um die Blanks korrigiert oder nicht um die Blanks korrigiert. Im ADAMon-Assay wird zusätzlich eine dynamische Kalibrierung verwendet. Hier wird durch mitgeführte Standards der Konzentration 50 µg/mL der Signaldrift über die Laufdauer betrachtet. Auch die dynamische Kalibrierung wird sowohl mit unkorrigierten als auch mit Blank-korrigierten Werten durchgeführt.

3.2.3.5. Für die SPR-Messungen benutzte Patientenproben

Pro CM5-Chip werden ATI- und IFX-Konzentrationen von 20 Serumproben in Duplikaten bestimmt. Dafür werden die aliquotierten Proben frisch vor dem jeweiligen Analyse-Lauf aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:50 mit dem Laufpuffer PBS-C verdünnt.

3.2.4. Gesamtes CED-Patientenkollektiv

3.2.4.1. Einschlusskriterien und Beschreibung der Studienpopulation

In das Patientenkollektiv wurden 41 Patienten mit der Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung und unter Remissionserhaltungstherapie mit IFX eingeschlossen. Für weitere statistische Analysen der TDIM Daten wurden mindestens vier TDIM Werte benötigt (sh. Kapitel 3.2.4.3). Somit konnten 38 Patienten für weitere Analysen in die Studie eingeschlossen werden. 28 Patienten (73,7%) litten an MC und 10 Patienten (26,3%) an CU. Insgesamt lag mit 18 männlichen Patienten (47,4%) und 20 weiblichen Patientinnen (52,6%) ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis vor. Es handelte sich bei einem medianen Alter von 39 Jahren um ein junges Patientenkollektiv. Bei über der Hälfte der Patienten (n=22, 57,9%) trat eine Antikörperbildung gegen IFX im Beobachtungszeitraum von vier Jahren auf. Diese Patienten wurden als „ATI positiv“ (ATI +) bezeichnet. 9 Patienten (23,7%) erlitten im Verlauf der Behandlung ein LOR und zeigten nach initialem Therapieansprechen einen Wirkverlust von IFX. Ein primäres Therapieversagen, also ein fehlendes Ansprechen auf IFX während der

Induktionstherapie wurde nicht berücksichtigt, da nur Patienten mit abgeschlossener Induktionstherapie und stabiler Remission in das Kollektiv eingeschlossen wurden. Nach Auftreten eines LOR wurde bei allen 9 Patienten die Therapie umgestellt. Nebenwirkungen auf IFX traten bei 11 Patienten (28,9%) auf. 5 Patienten (13,2%) mussten die IFX-Therapie aufgrund nicht tolerierbarer Nebenwirkungen abbrechen. Bei einem Patienten wurde die IFX-Therapie aufgrund von Non-Compliance abgebrochen (2,6%). Insgesamt lag die mediane Behandlungsdauer bei 68,2 Wochen. 21 Patienten (55,3%) erhielten eine immunsuppressive Komedikation aus AZA, Glukokortikoiden oder beidem. Die erfassten Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Beschreibung des Patientenkollektivs

Größe	Anzahl der CED-Patienten
Total, n (%)	38 (100)
MC, n (%)	28 (73,7)
CU, n (%)	10 (26,3)
Männliches Geschlecht, n (%)	18 (47,4)
Alter, j, median (IQR)	39.0 (28,0-57,0)
Abbruch der IFX-Therapie, n (%)	14 (36,8)
Aufgrund von LOR	9 (23,7)
Aufgrund von Nebenwirkungen ^a	5 (13,2)
Aufgrund von Non-Compliance	1 (2,6)
Nebenwirkungen auf IFX, n (%)	11 (28,9)
Behandlungsdauer nach erster IFX-Infusion, wochen, median (IQR)	68.2 (32,3-108,8)
ATI +, n (%)	22 (57,9)
Immunsuppressive Komedikation, n (%)	21 (55,3)

Die Werte sind in n (%) oder mit dem Median (Interquartilsabstand, IQA) angegeben. CED: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen; MC: Morbus Crohn; CU: Colitis ulcerosa; IFX: Infliximab; ATI: Antikörper gegen IFX; CRP: C-Reaktives Protein; FC: Fäkales Calprotectin.
^a: bei einem Patienten kam es aufgrund von LOR und Nebenwirkungen zum Therapieabbruch

3.2.4.2. Klinisch-chemische Analytik und TDIM der Seren des Patientenkollektivs

Die CRP-Bestimmung im Serum erfolgte mit latexverstärkter Turbidimetrie mit dem Tina-quant® *C-reactive Protein assay* über cobas® 8000 Analyseautomaten mit cobas c 701 Analysemodulen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die FC-Quantifizierung im Stuhl wurde mittels ELISA RIDASCREEN® *Calprotectin assay* eines DSX® Systems durchgeführt (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland). Sowohl die CRP-, als auch die FC-Messungen stammen aus dem MVZ für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie in Würzburg.

Die TDIM-Bestimmungen bei den CED-Patienten wurden im Medizinischen Labor des MVZ Oldenburg durchgeführt. Zum Einsatz kamen die ELISA „IDKmonitor® Infliximab drug level“ und „IDKmonitor® Infliximab total ADA“ (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Die von diesem Labor mitgeteilten cut-offs betragen 0,6 µg/mL IFX und 10 AU/mL ATI.

3.2.4.3. TDIM: Dynamische und statische Variablen

Die erste ATI-Detektion während der erfassten Behandlungsdauer wird als T_0 und die nachfolgenden drei TDIM Bestimmungen als T_{0-3} definiert. Dieser Zeitraum dient der Beurteilung der IFX- und ATI-Dynamik. Für alle Patienten, die ATI entwickeln, werden individuelle ATI- (S_{ATI}) und IFX-Steigungen (S_{IFX}) als durchschnittliche Änderung des ATI- bzw. IFX-Spiegels über T_{0-3} berechnet:

$$S_{Analyt} = \frac{\Delta c (Analyt)}{T_{0-3}}$$

wobei Analyt IFX oder ATI ist.

Für Patienten ohne ATI-Bildung kann T_0 nicht definiert werden. S_{ATI} ist folglich 0 AU/mL/Woche. Zusätzlich werden als statische Parameter der mediane IFX- (IFX_{median}) und ATI-Spiegel (ATI_{median}) und mediane CPR- (CRP_{median}) und FC- Spiegel (FC_{median}) über T_{0-3} , sowie der maximale ATI- (ATI_{max}) und minimale IFX-Spiegel (IFX_{min}) während der gesamten Therapiedauer berechnet. In Abbildung 7 ist die Bestimmung der dynamische und statischen TDIM Parameter zusammengefasst.

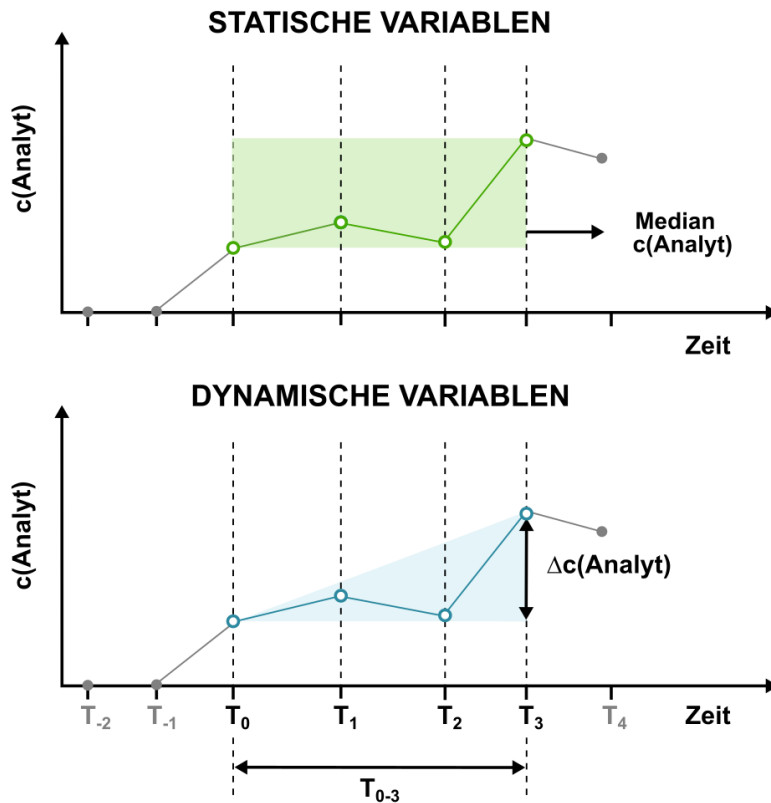


Abbildung 7: Dynamische und statische TDIM-Parameter

Die statischen Variablen ATI_{median} , IFX_{median} , CRP_{median} , FC_{median} werden als mediane Konzentration über T_{0-3} bestimmt. Als dynamische Parameter werden für die Berechnung von S_{ATI} und S_{IFX} die Konzentrationsänderung Δc zwischen T_0 und T_3 durch die Zeitspanne T_{0-3} dividiert und in der Einheit AU/mL/Woche bzw. $\mu\text{g/mL/Woche}$ angegeben.

3.2.4.4. Definitionen

3.2.4.4.1. Remission

Remission bei CED ist definiert als klinische, laborchemische und endoskopische Entzündungsfreiheit. Klinische Kriterien bei CED umfassen eine normale Stuhlfrequenz, das Fehlen von sichtbarem Blut im Stuhl, sowie kein Auftreten von intestinalen oder extraintestinalen CED-assoziierten Beschwerden. Als laborchemische Parameter sollen das CRP und FC im Normbereich liegen.

3.2.4.4.2. Outcome und Behandlungsdauer

Für das therapeutische Outcome wird das Ansprechen auf die IFX-Therapie betrachtet. Dies entspricht der Remissionsrate. Das LOR ist definiert als eine klinische Verschlechterung nach initialer Remission unter der IFX-Therapie. Primäres Therapieversagen, also fehlendes Ansprechen auf die IFX-Therapie bei Induktion von IFX ohne vorherige Remission, wird im Rahmen dieser Studie nicht berücksichtigt. (sh. Kapitel 3.2.4.1: Einschlusskriterien der Studie). Als Behandlungsdauer wird die Zeit ab Beginn der IFX-Therapie bis zum Therapieabbruch (TA) oder dem Ende der Beobachtungszeit definiert. Gründe für den TA können LOR, relevante Nebenwirkungen auf die IFX-Gabe oder mangelnde Compliance sein. Nach Ma *et al.* (2019) werden drei LOR-Typen unterschieden⁷⁶: mechanistisches Versagen (MV), immunbedingtes pharmakokinetisches Versagen (IPV) und nichtimmunbedingtes pharmakokinetisches Versagen (NIPV). MV berücksichtigt LOR bei therapeutischen IFX-Konzentrationen ohne detektierbare ATI, IPV tritt auf bei LOR und subtherapeutischen IFX-Spiegeln und detektierbaren ATI. NIPV tritt auf bei subtherapeutischen IFX-Spiegeln ohne detektierbare ATI.

3.2.4.4.3. Komedikation

Unter immunsuppressiver Komedikation wird die Einnahme von Glukokortikoiden (Prednisolon) und/ oder AZA verstanden.

3.2.4.4.4. Nebenwirkungen

Bei Auftreten von Nebenwirkungen wird zwischen kutanen Nebenwirkungen (Ekzem, Dermatitis) und anaphylaktischen Reaktionen unterschieden. Unter sonstigen Nebenwirkungen werden Alopezie, Geschmacksstörungen, Juckreiz, Muskelschwäche und Mundsoor berücksichtigt.

3.2.4.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der mit dem SPR-Biosensor generierten Daten erfolgte mit Windows-Excel, *Microsoft, München, Deutschland*. Die Korrelation der Messwerte zwischen SPR-Biosensor und Vergleichs-ELISA erfolgte mittels Pearson-Korrelationskoeffizient. Zudem wurden die beiden Methoden mittels Passing-Bablok^{89,90} und Bland-Altman-Analyse verglichen. Zur statistischen Auswertung der TDIM-Daten wurden GraphPad Prism 8.0 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*), R Version 4.0.3 (*R Foundation for Statistical Computing, Wien*,

Österreich) und RStudio Version 1.3.1093 (*RStudio PBC, Boston, MA, USA*) verwendet. Zur Durchführung umfassender statistischer Analysen wurden Messwerte unterhalb der Quantifizierungsgrenze (engl. *limit of quantification*, LOQ) auf 0.3 µg/mL für IFX (LOQ 0.6 µg/mL), 5 AU/mL für ATI (LOQ 10 AU/mL), 0.02 mg/dL für CRP (LOQ 0.04 mg/dL) und 10 oder 20 µg/g für FC (LOQ 20 oder 39 µg/g, je nach Probenverdünnung) festgelegt. Für FC-Werte oberhalb des Messbereichs wurde der obere Grenzwert (800, 840 oder 1600 µg/g, je nach Probenverdünnung) verwendet. Zum Vergleich der kontinuierlichen Variablen zwischen den ATI-Steigungsgruppen wurden der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test (für drei Variablen) und der Mann-Whitney U Test (paarweise) angewendet. Zum Gruppenvergleich (paarweise und für drei Variablen) der ATI-Steigungen für kategoriale Variablen wurden der Chi-square und der Fisher's Exact Test durchgeführt. Zum Vergleich von Kaplan-Meier Kurven wurde der log-rank Test verwendet. Die Berechnung uni- und multivariabler *hazard ratios* (HRs) wurde mittels Cox-Proportional-Hazard-Model vorgenommen. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz univarianter Analysen wurde der Likelihood-Quotient (engl. *Likelihood ratio*) bestimmt. Mittels *Receiver operating characteristic* (ROC)-Analyse und *Youden Index* wurde der Grenzwert der ATI-Steigung zur Vorhersage eines Therapieversagens definiert. Es erfolgte keine Korrektur für multiple Testung. P-Werte <0.05 wurden als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Patientenseren mithilfe des SPR-basierten Biosensors

Die Entwicklung und Validierung des IFX- und ATI-Biosensors wird in der Dissertation von M. Grasmeyer beschrieben.

4.1.1. IFX-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor

4.1.1.1. Prinzip der Messung

4.1.1.1.1. Spezifische Anbindung an die Flusszellen

Die spezifische Anbindung an den immobilisierten Liganden erhält man, indem das jeweils um die Anbindung an die Referenzflusszelle korrigierte Signal (**Fc2-Fc1**) der mitgeführten Blanks von den Patientenproben abgezogen wird (siehe Kapitel 3.2.3.3).

Abbildung 8 zeigt exemplarisch ein Sensorgramm mit Anbindung auf der aktiven Flusszelle (Fc2) und der Referenzflusszelle (Fc1). Die IFX-Anbindung wird durch die Injektion des Verstärkerantikörpers (VAK) verstärkt. Dafür wird ein muriner Antikörper gegen humanes IgG verwendet. Dadurch wird eine größere Signalantwort erzielt (Abbildung 8, Injektion 2). Die VAK-Signale sind durchschnittlich um den Faktor 8,4 höher als die IFX-Signale.

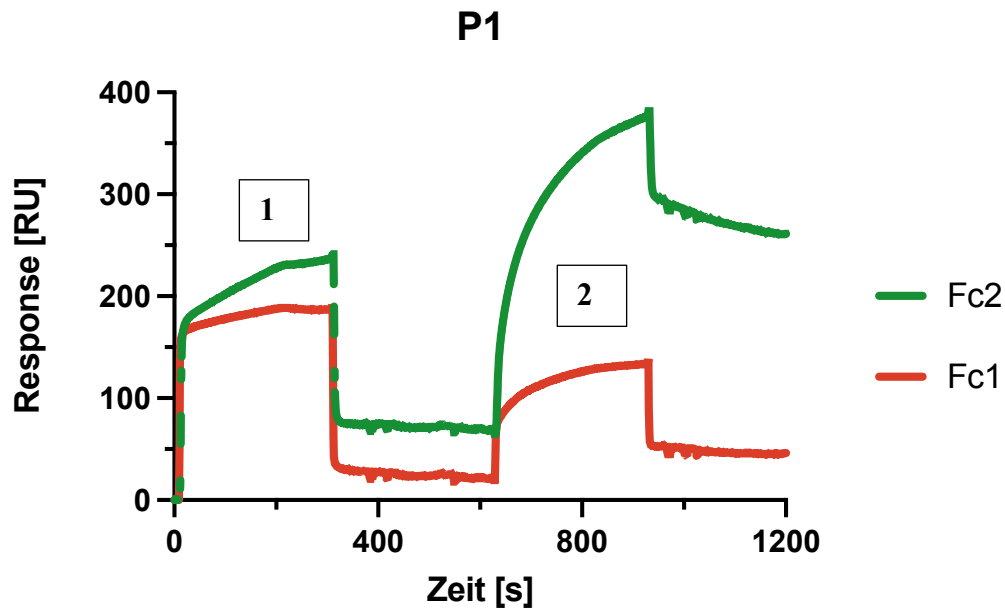


Abbildung 8: Spezifische Anbindung an die beiden Flusszellen Fc1 und Fc2 bei Vermessung von Patientenserum 1

Sensorgramm zur IFX-Konzentrationsbestimmung bei Patient 1 (P1) mit Anbindung auf die aktive Flusszelle Fc2 und die Referenzflusszelle Fc1. Die Probe bindet sowohl an die aktive Flusszelle (Fc2) mit immobilisiertem TNF, als auch (weniger) an die Referenzflusszelle (Fc1) mit immobilisierten hTf. Die Anbindung an Fc1 erklärt sich durch die unspezifische Bindung von IFX und der Serummatrix an die Proteinoberfläche. Die erste Injektion (1) zeigt die Injektion des verdünnten Patientenserums, die zweite Injektion (2) die des VAKs. Der jeweils große Signalsprung während der Injektionen kommt durch die neben IFX und Laufpuffer vorhandenen Serumbestandteile in der Probenmatrix zustande und wird als „Bulk Effekt“ bezeichnet (siehe Kapitel 3.2.3.3.). Die Anbindung Fc2-Fc1 entspricht der spezifischen Anbindung des Analyten und wird nach der Blank-Korrektur zur Rückrechnung auf die IFX-Konzentration verwendet.

4.1.1.1.2. Kalibrierung

In jedem Lauf zur IFX-Konzentrationsbestimmung wird eine Standardkurve aus Remicade®-Verdünnungen in 1:50-verdünntem Patientenserum (0.5 µg/mL–2500 µg/mL, c1-c7) mitgeführt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen Sensorgramme der Kalibratormessungen und die Kalibrierkurve, welche mittels logistischer Regression mit fünf Parametern (5Plog) erstellt wurde. Zur Rückrechnung der IFX-Konzentrationen in den Patientenproben werden die Werte des VAK aufgrund höherer Sensitivität verwendet.

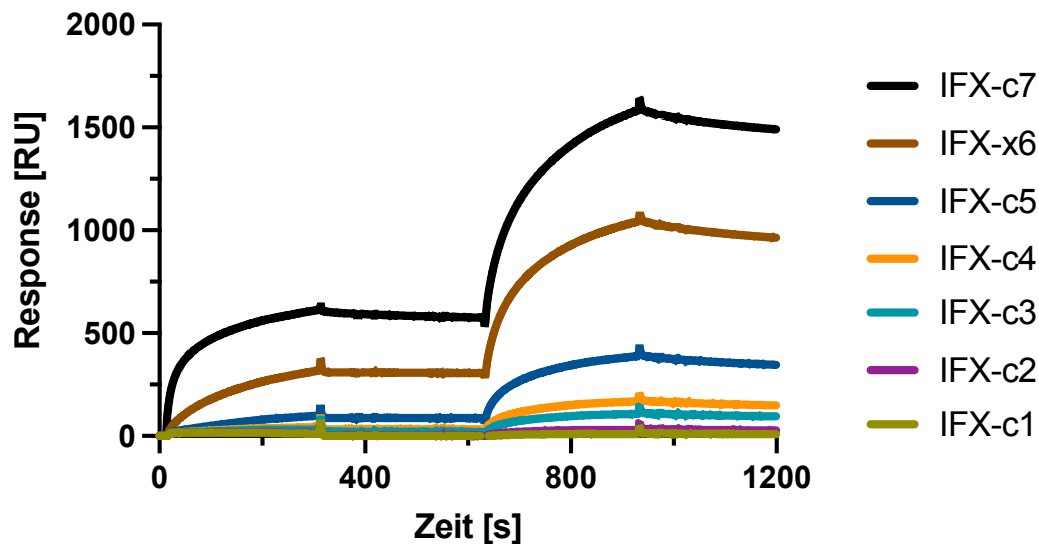


Abbildung 9: Sensorgramme zu IFX-Kalibratoren

Die spezifische IFX-Anbindung (Fc2-1) an TNF ist in Response Units (RU) gegen die Zeit im Sensorgramm aufgetragen. Als Standardkurve werden vor jeder Messung von Patientenproben sieben IFX-Konzentrationen mitgeführt. Zuerst erfolgt die Injektion des Kalibrators, danach die Injektion des VAKs.

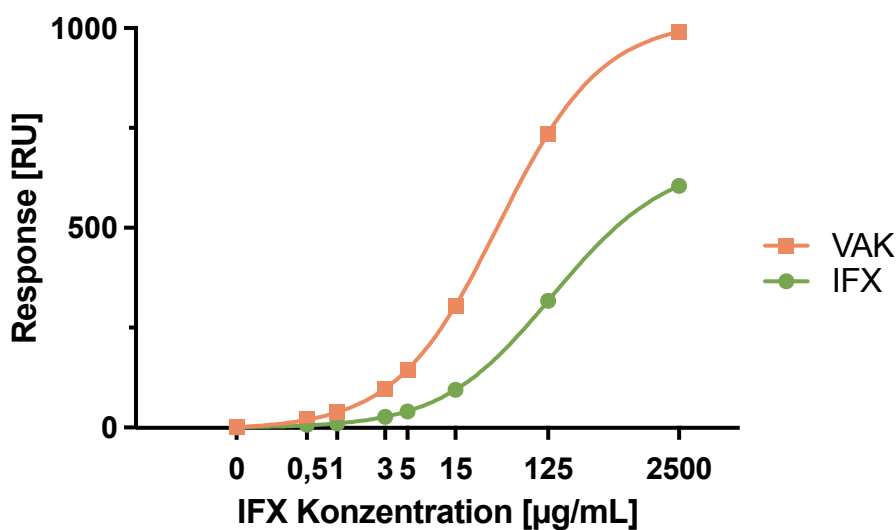


Abbildung 10: Fit der Kalibrierkurve

Die Daten der Sensorgramme werden um die Blanks korrigiert. Dabei wird immer der mitgeführte Blank vor der jeweiligen Messung der Patientenserien abgezogen (siehe Kapitel 3.2.3.3.). $R^2 = 1.00$ (für beide Kurven).

4.1.1.1.3. Validierung des IFXmon-Biosensors

Die Validierung des IFXmon-Biosensors ist in der Dissertation von Grasmeyer *et al.* detailliert beschrieben. Im Folgenden werden die wichtigsten Kennzahlen daraus zusammengefasst. Für die Bestimmung von Genauigkeit und Präzision des Assays wurden drei verschiedene IFX-Kalibratoren (1, 5 und 30 µg/mL) an Tag 1, 2 und 30 gemessen. Die Daten zeigen, dass die Kriterien der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für diagnostische Assays mit weniger als 15% Abweichung für die Genauigkeit (Accuracy, A) und Präzision (Precision, P) erfüllt sind (Tabelle 10). Die Nachweisgrenze für IFX wurde bei 0,6 µg/mL und die Quantifizierungsgrenze bei 0,9 µg/mL festgelegt.

Tabelle 10: Genauigkeit und Präzision des IFX-Biosensors

c(IFX) [µg/mL]	Mittelwert EAb-Signal [µg/mL]	SD [µg/mL]	A [%]	P [%]
1	0,97	0,09	97,3	8,8
5	4,57	0,29	91,5	6,3
30	29,43	1,45	98,1	4,9

Die Daten stammen aus der Dissertation von M. Grasmeyer (noch nicht eingereicht).

4.1.1.1.4. Messung der Patientenproben

Tabelle 11 zeigt die mit dem SPR gemessenen IFX-Konzentrationen der 90 Patientenproben im Vergleich zu den ELISA-Werten aus dem MVZ Medizinisches Labor Oldenburg GmbH. Für die Rückrechnung auf die IFX-Konzentration werden die Blank-korrigierten VAK-Werte verwendet. Alle Patientenproben werden in Duplikaten mit dem SPR-Biosensor gemessen.

Tabelle 11: IFX-Konzentrationsbestimmung mittels des IFXmon Biosensor Assays

Proben- nummer	Pseudonym	SPR [µg/mL]			ELISA	SD	SD
		n = 1	n = 2	Mittelwert	[µg/mL]	[µg/mL]	[%]
1	P-10a	8,51	8,38	8,44	7,2	0,9	11,2
2	P-10b	9,67	9,29	9,48	8,8	0,5	5,3
3	P-10c	14,48	13,64	14,06	12,6	1	7,7
4	P-10d	6,86	6,60	6,73	6,4	0,2	3,6
5	P-10e	7,47	7,04	7,26	5,2	1,5	23,4
6	P-10f	8,78	8,27	8,53	7,7	0,6	7,2

7	P-25a	<0,9	<0,9	<0,9	<0,6	NA	NA
8	P-25b	11,53	10,77	11,15	10,7	0,3	2,9
9	P-25c	10,37	9,90	10,14	9,2	0,7	6,9
10	P-25d	9,09	8,68	8,88	8,3	0,4	4,8
11	P-6a	4,29	5,81	5,05	5,0	0,0	0,7
12	P-6b	2,74	2,73	2,73	1,7	0,7	32,9
13	P-6d	3,88	3,84	3,86	5,6	1,2	26,0
14	P-9a	8,53	7,79	8,16	7,8	0,3	3,2
15	P-9b	11,67	10,76	11,22	12,1	0,6	5,3
16	P-9c	5,87	7,02	6,44	7,1	0,5	6,9
17	P-9d	7,86	7,36	7,61	8,7	0,8	9,5
18	P-9e	14,35	15,47	14,91	14,6	0,2	1,5
19	P-9f	19,85	17,78	18,82	16,1	1,9	11,0
20	P-9g	14,19	14,86	14,52	12,8	1,2	8,9
21	P-18a	12,09	11,31	11,7	12,5	0,6	4,7
22	P-18b	6,56	7,39	6,98	7,8	0,6	7,8
23	P-18c	5,77	6,55	6,16	6,6	0,3	4,9
24	P-18d	4,42	5,19	4,81	4,9	0,1	1,3
25	P-18e	5,43	5,46	5,44	4,3	0,8	16,6
26	P-18f	8,21	8,82	8,51	8,0	0,4	4,4
27	P-18g	6,04	6,68	6,36	5,8	0,4	6,5
28	P-6e	6,39	6,30	6,35	3,7	1,9	37,3
29	P-6f	6,24	6,91	6,58	6,4	0,1	2,0
30	P-6g	6,3	6,17	6,24	3,9	1,7	32,6

Proben- nummer	Pseudonym	SPR [$\mu\text{g/mL}$]			ELISA	SD	SD
		n = 1	n = 2	Mittel	[$\mu\text{g/mL}$]	[$\mu\text{g/mL}$]	[%]
31	P-1a	3,10	3,09	3,09	1,9	0,8	33,7
32	P-1b	1,70	1,76	1,73	5,6	2,7	74,7
33	P-1c	5,33	5,18	5,26	2,8	1,7	43,2
34	P-1d	2,25	2,82	2,53	2,7	0,1	4,6
35	P-1e	4,98	4,85	4,91	4,6	0,2	4,6
36	P-1f	3,68	4,19	3,94	4,5	0,4	9,4
37	P-26a	3,03	3,52	3,27	3,2	0,0	1,5
38	P-26b	2,81	3,31	3,06	3,2	0,1	3,2
39	P-26c	4,25	4,78	4,52	5,2	0,5	9,9
40	P-26d	4,32	4,83	4,58	4,8	0,2	3,3
41	P-2a	<0,9	<0,9	<0,9	<0,6	0,0	141,4
42	P-2b	18,33	17,5	17,92	19,4	1,0	5,6
43	P-2c	14,68	14,5	14,59	14,7	0,1	0,5
44	P-2d	11,98	11,64	11,81	9,2	1,8	17,6
45	P-2e	9,57	9,24	9,40	8,7	0,5	5,5
46	P-2f	7,05	6,92	6,99	6,8	0,1	1,9
47	P-2g	6,77	6,65	6,71	6,2	0,4	5,6
48	P-2h	5,19	5,33	5,26	4,7	0,4	8,0
49	P-2i	3,05	2,94	3,00	2,1	0,6	25,0
50	P-22a	9,33	9,31	9,32	19,2	7,0	49,0
51	P-3a	6,08	7,29	6,68	5,8	0,6	10,0
52	P-3b	5,93	7,00	6,47	5,0	1,0	18,1
53	P-3c	4,25	5,19	4,72	5,7	0,7	13,3
54	P-3d	5,31	6,22	5,77	5,0	0,5	10,1
55	P-3e	44,36	44,88	44,62	56	8,0	16,0
56	P-3f	5,90	NA	5,90	4,8	0,8	14,5
57	P-3g	4,53	NA	4,53	3,5	0,7	18,1
58	P-22b	13,95	NA	13,95	9,5	3,1	26,8
59	P-22c	10,73	NA	10,73	13,1	1,7	14,1
60	P-22d	6,44	NA	6,44	10,4	2,8	33,3

Proben- nummer	Pseudonym	SPR [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			ELISA	SD	SD
		n = 1	n = 2	Mittel	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	[%]
61	P-4a	5,26	6,16	5,71	5,0	0,5	9,4
62	P-4b	3,79	4,47	4,13	4,9	0,5	12,1
63	P-4c	3,71	4,32	4,01	3,9	0,1	2,0
64	P-4d	2,38	2,98	2,68	3,1	0,3	10,3
65	P-4e	4,02	4,57	4,29	3,3	0,7	18,4
66	P-23b	20,02	20,42	20,22	19,2	0,7	3,7
67	P-23c	17,99	18,40	18,19	15,6	1,8	10,8
68	P-23d	16,16	16,49	16,32	12,8	2,5	17,1
69	P-23e	17,33	17,81	17,57	15,4	1,5	9,3
70	P-23f	16,96	17,26	17,11	17,5	0,3	1,6
71	P-11a	7,31	7,16	7,23	6,5	0,5	7,5
72	P-11b	6,78	6,61	6,69	5,3	1,0	16,4
73	P-11c	3,60	3,63	3,62	3,5	0,1	2,4
74	P-11d	4,05	4,02	4,04	3,2	0,6	16,4
75	P-11e	1,98	2,06	2,02	8,3	4,4	86,1
76	P-11f	5,49	5,09	5,29	6,0	0,5	8,9
77	P-11g	8,33	7,69	8,01	8,9	0,6	7,4
78	P-11h	4,48	4,12	4,30	3,9	0,3	6,9
79	P-11i	9,00	8,36	8,68	9,5	0,6	6,4
80	P-11j	6,12	5,75	5,94	6,7	0,5	8,5
81	P-15a	<0,9	<0,9	<0,9	<0,5	0,1	141,4
82	P-15b	<0,9	<0,9	<0,9	<0,5	0,1	141,4
83	P-15c	2,22	2,26	2,24	NA	NA	NA
84	P-15d	2,29	2,30	2,30	NA	NA	NA
85	P-17a	<0,9	<0,9	<0,9	<0,5	0,0	NA
86	P-17b	7,45	7,05	7,25	8,8	1,1	13,7
87	P-17c	2,13	1,97	2,05	2,0	0,0	1,7
88	P-17d	1,92	1,78	1,85	2,1	0,2	9,0
89	P-17e	2,84	2,68	2,76	3,6	0,6	18,7
90	P-17f	<0,9	<0,9	<0,9	<0,5	0,0	141,4

NA: Die Zahl kann nicht angegeben werden. Die Quantifizierungsgrenze für IFX liegt im ELISA bei 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und beim SPR bei 0,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Der therapeutische Wirkungsbereich von IFX liegt zwischen 3-7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. IFX-Konzentrationen in diesem Bereich werden als „positiv (+)“ bezeichnet, Werte darüber oder darunter als „negativ (-)“. Mit dem SPR werden 41 IFX-positive Proben gemessen und mit dem ELISA 40. Somit zeigt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung der beiden Testverfahren. 38,9% (n=35) der Serumproben werden mit beiden Verfahren als positiv bestimmt. Im SPR positiv und im ELISA negativ sind 6,7% (n=6) und im SPR negativ und im ELISA positiv sind 5,6% (n=5). Eine zusammenfassende Abbildung zur IFX-Detektionsrate zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: IFX-Detektionsrate

	SPR +	SPR -	
ELISA +	35 (38,9%)	5 (5,6%)	40 (44,4%)
ELISA -	6 (6,7%)	44 (48,9%)	50 (55,6%)
	41 (45,6%)	49 (54,4%)	90 (100,0%)

IFX-Detektionsrate im SPR und im ELISA. Als positiv (+) wird ein IFX-Spiegel im therapeutischen Bereich von 3-7µg/mL gewertet. IFX-Spiegel darüber oder darunter sind negativ (-).

4.1.1.1.5. Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA

Die rückgerechneten IFX-Konzentrationen werden mit den Messwerten des Vergleichs-ELISA in Abbildung 11 korreliert. Es zeigt sich eine gute Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von $r=0,90$. Die IFX-Messungen mittels ELISA erstrecken sich über einen Konzentrationsbereich von 0,6 µg/mL (LOQ) bis 56 µg/mL. Mit dem SPR werden IFX-Konzentrationen von 0,9 µg/mL (LOQ) bis 44,62 µg/mL gemessen. Die höchsten IFX-Konzentrationen werden sowohl mit dem SPR als auch mit dem ELISA bei Pat. 55 detektiert (SPR: 44,62 µg/mL; ELISA: 56 µg/mL). Zur Überprüfung der Abweichung der Messwerte zweier verschiedener Methoden wurde die lineare Regression nach Passing Bablok berechnet und eine Bland-Altman-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12a-b) gezeigt und ergeben eine gute Übereinstimmung der Messwerte.

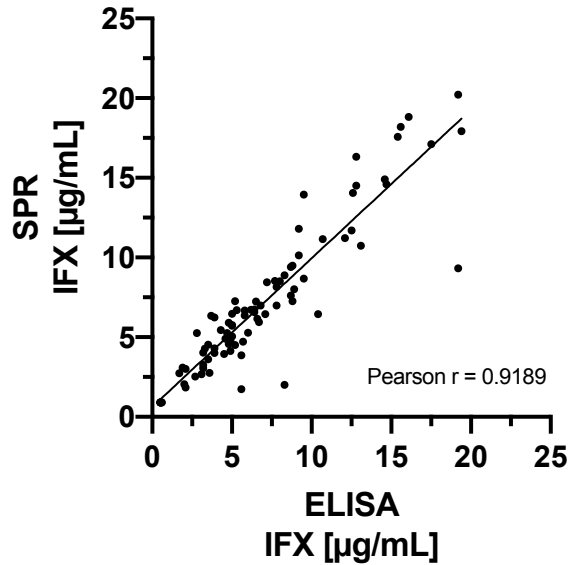
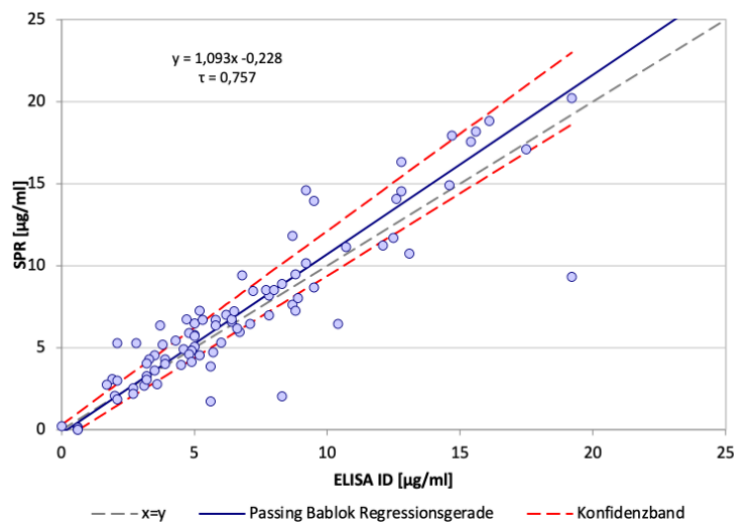


Abbildung 11: Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA

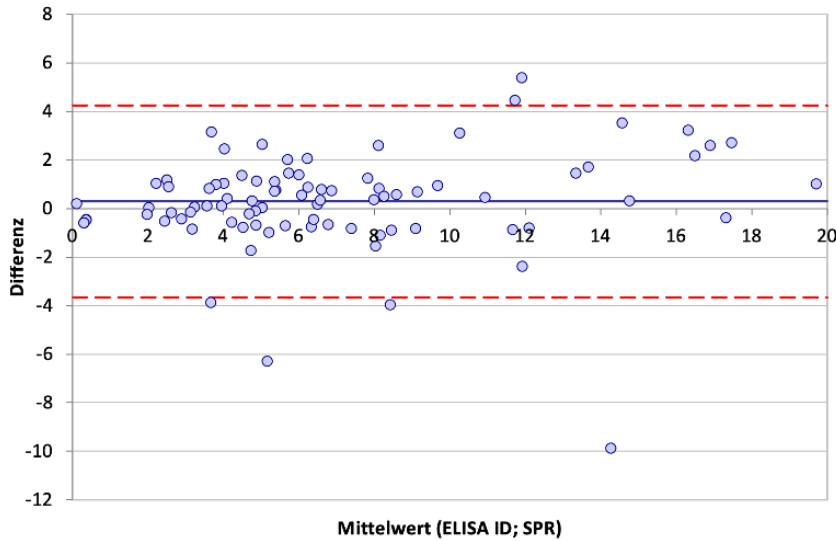
Korrelation zwischen den IFX-Konzentrationen aus den SPR-Messungen und Messwerten des Vergleichs-ELISAs, n=87. Das sehr hohe Wertepaar (SPR: 44,62 µg/mL; ELISA: 56 µg/mL), sowie die zwei unplausiblen Wertepaare (83,84) wurde nicht berücksichtigt.

a) Passing Bablok Regressionsanalyse



Steigung (95% KI): 1,093 (1,002 – 1,181)
 Achsenabschnitt (95% KI): -0,2 (-0,6 – 0,3)

b) Bland-Altman Analyse



Mittlere Unrichtigkeit (95% KI):	-1,0% (-11,9% bis 9,9%)
Unrichtigkeitsbereich (95%):	-101,1% - 99,0%
Max. Unrichtigkeit:	± 15%

Abbildung 12: Passing Bablok und Bland-Altman-Analyse

Teil a) der Abbildung zeigt die Passing Bablok-Regressionsgerade mit dem entsprechenden Konfidenzintervall. Es ergibt sich eine Regressionsgerade mit $y=1,093x-0,228$. Teil b) zeigt die Bland-Altman-Analyse mit einer mittleren Unrichtigkeit von -1,0% bei einem Unrichtigkeitsbereich von -101,1% - 99,0%. $n=87$

4.1.2. Versuche zur ATI-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor

Nach erfolgreicher Anwendung des IFXmon-Biosensors wurden Versuche unternommen, die ATI in Patientenseren analog zum IFXmon-Biosensor zu quantifizieren. Wie nachfolgend gezeigt wird, konnten die Assayprinzipien des IFXmon-Biosensors nicht erfolgreich auf den ADAMon-Biosensor übertragen werden, weshalb die vorliegenden Ergebnisse als vorläufige Ergebnisse erster Messversuche zu betrachten sind.

4.1.2.1. Prinzip der Messung

4.1.2.1.1. Spezifische Anbindung an die Flusszellen

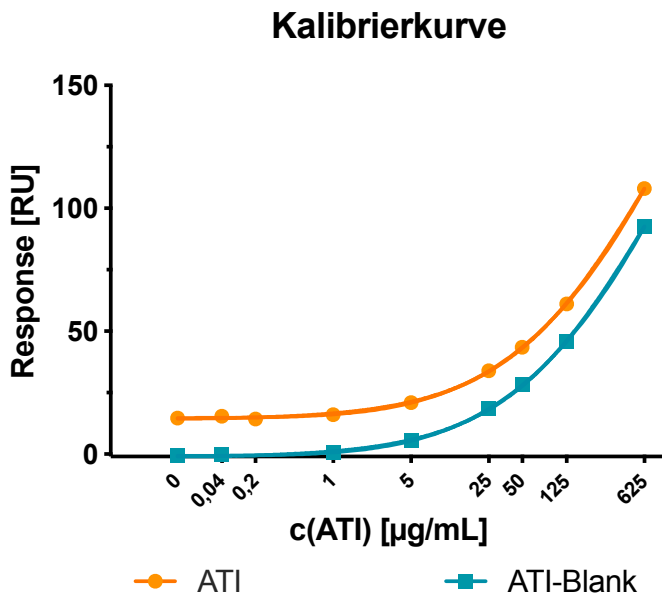
Analog zur IFX-Bestimmung erhält man die spezifische ATI Anbindung an das immobilisierte Remicade[®] durch Subtraktion der Anbindung auf der Referenzflusszelle (Fc2-Fc1) und der

mitgeführten Blanks. Auf eine spezifische Signalverstärkung wird verzichtet (siehe Kapitel 3.2.3.2.).

4.1.2.1.2. Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden sechs Konzentrationen des ATI-Kalibrators (monoklonaler humaner anti-IFX Antikörper HCA233) in jedem Messlauf mitgeführt. Zusätzlich werden dynamische Kalibratoren (siehe 3.2.3.4. Kalibriermethoden) vor jeder Messung von Patientenproben und Blanks mitgeführt. Die Werte werden in einem 5-Parameter-log-Modell gefittet und als Kalibrierkurve aufgetragen. Um herauszufinden, welche Kalibriermethode sich am besten zur ATI-Interpolation eignet, wurden vier verschiedene Methoden verglichen (siehe Kapitel 3.2.3.4). Die Abbildungen 13A zeigt die entsprechende Kalibrierkurve und Abbildung 13B den Drift der mitgeführten Standards, der auf die Proben im Rahmen der dynamischen Kalibrierung angewendet wurde. Es kommt zu einer starken Signalabnahme bei Zunahme der Zykluszahl. Abbildung 14 zeigt beispielhaft Sensorgramme der ADA-Kalibratoren. Bei Vergleich der verschiedenen Kalibriermethoden ergibt die nicht-dynamische Kalibrierung der nicht Blank-korrigierten ATI-Konzentrationen die beste Annäherung an die ELISA-Vergleichswerte. Bei der dynamischen Kalibrierung ergibt die Interpolierung der Daten keine verwertbaren Ergebnisse, weswegen diese nicht zur Konzentrationsbestimmung verwendet wird.

A)



B)

Drift der Anbindung des ATI-Standards an den ADAmom-Biosensor

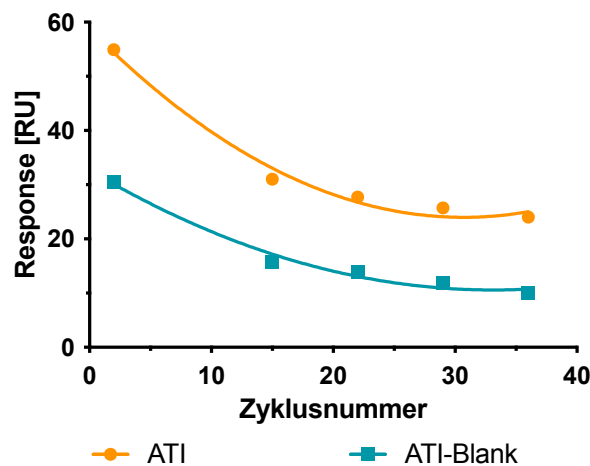


Abbildung 13: Vergleich verschiedener Kalibriermethoden zur ATI-Quantifizierung

Teil A) zeigt die Response in RU der verschiedenen ATI-Konzentrationen zur Kalibrierung jeweils mit und ohne Blank-Korrektur. Teil B) zeigt die Response der mitgeführten Standards in Abhängigkeit von der Zykluszahl, auch jeweils mit und ohne Blank-Korrektur. Die Kurve ergibt sich aus den dynamischen Kalibratoren.

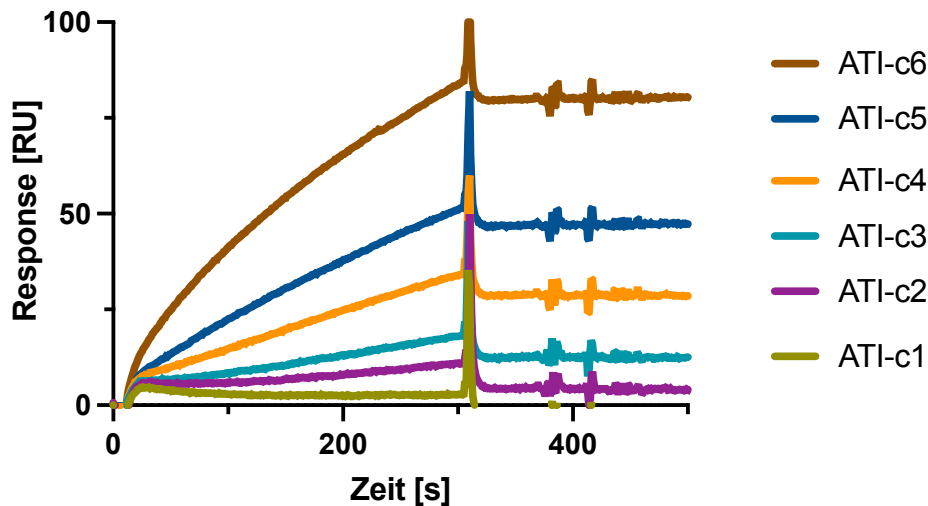


Abbildung 14: Sensorgramme zu ADA-Kalibratoren

Die spezifische ATI-Anbindung (Fc2-1) an IFX ist in RU gegen die Zeit im Sensorgramm aufgetragen. Als Standardkurve werden vor jeder Messung von Patientenproben sechs ATI-Konzentrationen mitgeführt.

4.1.2.1.3. Messung der Patientenproben

Es wurden insgesamt 57 Patientenproben in Duplikaten vermessen. Tabelle 13 zeigt die mit dem SPR bestimmten ATI-Konzentrationen im Vergleich zu dem ELISA-Vergleichswert. Zusätzlich sind die jeweiligen ELISA-Vergleichswerte der IFX-Konzentrationen angegeben.

Die anhand der Kalibrierkurve interpolierten ATI-Konzentrationen werden im Folgenden als $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mL}$ angegeben, da die individuellen Antikörper eines Patienten nicht absolut quantifiziert werden können.

Tabelle 13: ATI-Konzentrationsbestimmung mit SPR-Biosensor

Probennummer	Pseudonym	SPR [$\mu\text{g}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mL}$]			SD	SD	ATI ELISA	IFX ELISA
		n=1	n=2	Mittel	[$\mu\text{g}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mL}$]	[%]	[AU/mL]	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1	P-1a	5,80	9,59	7,70	1,9	29,9	5,0	1,9
2	P-1b	6,77	8,12	7,45	1,7	27,3	5,0	5,6
3	P-1c	7,51	12,11	9,81	1,2	11,3	11,5	2,8
4	P-1d	16,2	16,86	16,53	8,2	76,2	5,0	2,7
5	P-1e	11,18	15,76	13,47	6,0	65,0	5,0	4,6
6	P-1f	13,10	13,50	13,27	5,8	63,5	5,0	4,5
7	P-4a	NA	0,24	0,24	24,5	139,4	34,9	5,0
8	P-4d	1,18	3,35	2,27	9,1	104,8	15,1	3,1
9	P-4e	1,37	3,50	2,44	9,1	102,6	15,3	3,3

10	P-4f	1,37	3,50	2,44	1,8	48,4	5,0	2,7
11	P-4g	1,57	3,06	2,32	1,9	51,9	5,0	2,5
12	P-6a	16,81	17,46	17,14	100,7	114,0	159,6	5,0
13	P-6b	97,06	101,5	99,28	75,0	49,2	205,4	1,7
14	P-6c	13,00	15,80	14,40	106,1	118,7	164,4	3,8
15	P-6d	17,46	21,94	19,70	96,8	109,8	156,6	5,6
16	P-6e	23,42	26,91	25,17	185,7	118,7	287,8	3,7
17	P-6f	23,42	26,12	24,77	135,4	112,4	216,2	6,4
18	P-9a	70,91	58,92	64,91	33,2	80,2	17,9	7,8
19	P-9b	0,25	NA	0,25	3,4	129,5	5,0	12,1
20	P-9c	66,72	53,96	60,34	16,9	34,9	36,4	7,1
21	P-9d	112,29	88,15	100,22	40,9	57,4	42,4	8,7
22	P-9e	66,56	51,03	58,79	32,9	92,6	12,3	14,6
23	P-9f	47,45	41,23	44,34	23,0	81,9	11,8	16,1
24	P-9g	47,87	43,68	45,78	NA	NA	5,0	12,8
25	P-10a	22,26	7,04	14,65	17,9	65,6	39,9	7,2
26	P-10b	12,62	0,52	6,57	29,0	107,1	47,6	8,8
27	P-10c	16,21	8,05	12,13	16,3	68,9	35,2	12,6
28	P-10d	18,24	8,44	13,34	78,0	113,9	123,6	6,4
29	P-10e	9,15	0,05	4,60	58,9	127,4	87,9	5,2
30	P-10f	10,18	11,99	11,09	62,4	113,0	99,4	7,7

Proben- nummer	Pseudonym	SPR [$\mu\text{g}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mL}$]			SD	SD	ATI- ELISA	IFX ELISA
		n = 1	n = 2	Mittel	[$\mu\text{g}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mL}$]	[%]	[AU/mL]	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]
31	P-15a	32,4	26,53	29,47	495,1	130,4	729,6	<0,6
32	P-15b	382,66	326,26	354,46	475,2	68,8	1026,5	<0,6
33	P-17a	3,89	3,29	3,59	1,0	23,3	5,0	<0,6
34	P-17b	2,30	1,86	2,08	11,7	113,2	18,6	8,8
35	P-17c	3,22	2,72	2,97	1,4	35,1	5,0	2,0
36	P-17d	4,49	3,67	4,08	18,1	107,2	29,7	2,1
37	P-17e	6,75	6,86	6,80	111,2	130,2	164	3,6
38	P-17f	9,49	8,48	8,98	375,5	136,8	540	<0,6
39	P-18a	18,6	10,47	14,54	2,4	18,7	11,1	12,5
40	P-18b	32,08	31,33	31,70	12,5	54,7	14,0	7,8
41	P-18c	59,55	52,88	56,21	21,5	52,4	25,8	6,6
42	P-18d	10,38	12,04	11,21	4,0	28,6	16,8	4,9
43	P-18e	6,56	6,99	6,77	10,8	74,8	22,1	4,3
44	P-18f	7,87	6,77	7,32	1,6	26,0	5,0	8,0
45	P-18g	10,38	12,52	11,45	4,6	55,9	5,0	5,8
46	P-22a	NA	NA	NA	NA	NA	16,9	19,2
47	P-22b	NA	NA	NA	NA	NA	5,0	9,5
48	P-22c	NA	NA	NA	NA	NA	5,0	13,1
49	P-23b	0,09	NA	0,09	3,5	137,5	5,0	19,2
50	P-23c	0,88	NA	0,88	2,9	98,6	5,0	15,6
51	P-23d	3,23	2,24	2,74	1,6	41,3	5,0	12,8

52	P-23e	NA	NA	NA	NA	NA	5,0	15,4
53	P-23f	4,66	3,63	4,14	13,8	99,1	23,7	17,5
54	P-26a	6,63	10,63	8,63	2,6	38,2	5,0	3,2
55	P-26b	7,21	10,63	8,92	2,8	40,2	5,0	3,2
56	P-26c	5,94	6,92	6,43	1,0	17,5	5,0	5,2
57	P-26d	7,36	8,28	7,82	2,0	31,2	5,0	4,8

NA: Die Zahl/Werte können nicht angegeben werden. In Rot hervorgehoben sind die Messungen, bei denen die IFX-Konzentration im Serum nicht messbar ist ($< 0.6 \mu\text{g/mL}$).

Die mit dem SPR gemessenen ATI-Konzentrationen sind in der jeweiligen Höhe nicht mit den ELISA-Ergebnissen zu vergleichen.

4.1.2.1.4. Bestimmung der freien ATI mittels SPR-Biosensor

ATI haben verschiedene Eigenschaften (siehe Kapitel 2.1.5) und können beispielsweise frei oder komplexiert vorliegen. Zum Testen der Hypothese, dass mit dem Assay überwiegend freie ATIs gemessen werden, wurden die ATI bei vier Patientenproben (P-15a, P-15b, P-6b und P-17f) nativ und nach Spiken mit verschiedenen IFX-Mengen (finale IFX-Konzentrationen $5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$ und $100 \mu\text{g/mL}$) bestimmt (Abbildung 15). Es werden Patientenproben ohne nachweisbaren, bzw. bei P-6b subtherapeutischen IFX-Spiegel und positiven ATIs ausgewählt, damit der Anteil freier ATIs, die zur Bindung an den SPR-Biosensor zur Verfügung stehen, hoch ist.

Das höchste SPR-Signal zeigt sich bei jedem Patienten in den Proben ohne IFX. Mit IFX-Zugabe zum Serum kommt es zu einer deutlichen Signalabnahme, die jedoch nicht proportional mit steigender IFX-Konzentration abnimmt. Ein dementsprechender Trend lässt sich jedoch nachverfolgen.

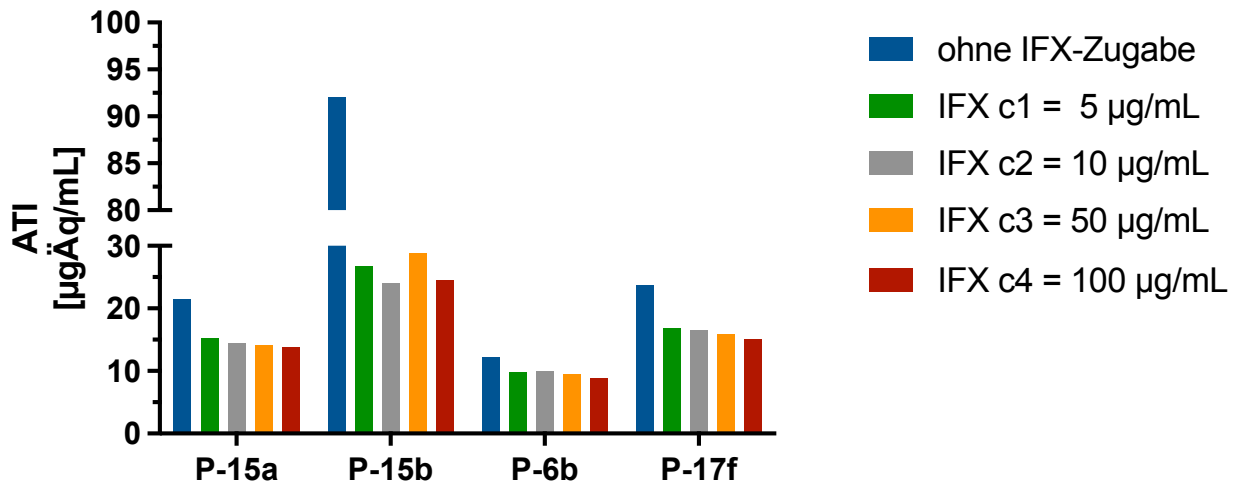


Abbildung 15: ATI-Quantifizierung mit ADAMon-Biosensor für native und IFX-gespikte Patientenserum

ATI-Spiegel in Patientenserum (n=4) wurden unbehandelt und nach dem Versetzen mit IFX auf Endkonzentrationen von 5, 10, 50 und 100 µg/mL gemessen. Vergleichswerte der ELISA-Methoden für IFX und ATI betragen für die einzelnen Patienten:

P-15a: <0.6 µg/mL IFX, 729.6 AU/mL ATI

P-15b: <0.6 µg/mL IFX, 1026.5 AU/mL ATI

P-6b: 1.7 µg/mL IFX, 205.4 AU/mL ATI

P-17f: <0,6 µg/mL IFX, 540 AU/mL ATI

4.1.2.1.5. Korrelation zwischen SPR-Biosensor und ELISA

Die rückgerechneten ATI-Konzentrationen werden mit den Vergleichswerten aus dem ELISA in Abbildung 16 korreliert. Der Pearson Korrelationskoeffizient ergibt einen Wert von $r=0,67$. Die Korrelation ist bei nicht-detektierbaren IFX-Spiegeln besser und ergibt einen Pearson Korrelationskoeffizient von $r=0,74$ (Abbildung 17).

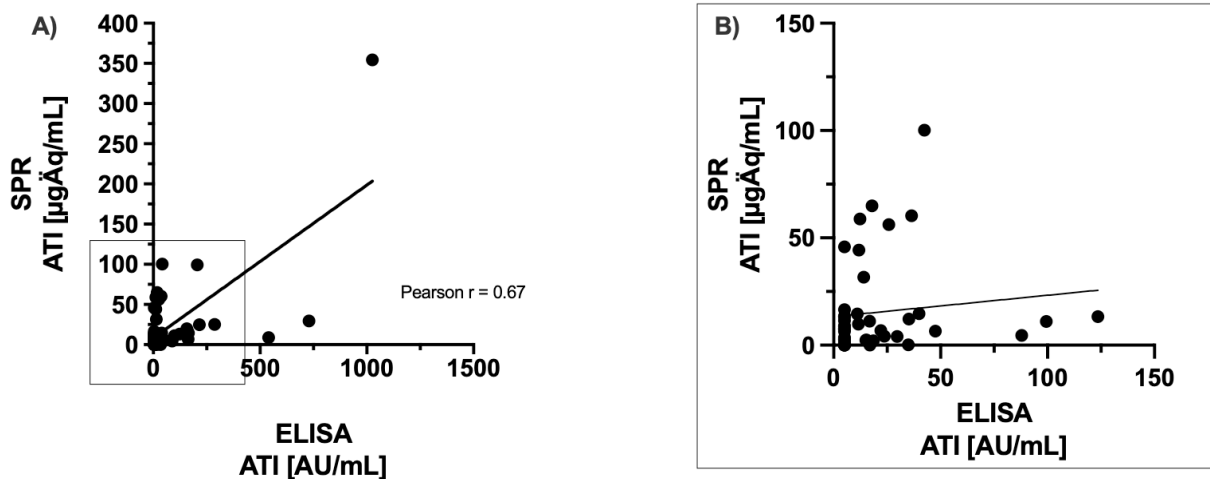


Abbildung 16: Korrelation der ATI-Konzentrationen zwischen SPR-Biosensor und ELISA

16A) zeigt die Korrelation zwischen den ATI-Konzentrationen aus den SPR-Messungen von n=57 Patientenproben und den Messwerten des Vergleichs-ELISA. 146) ist ein Zoom in die umrandeten Konzentrationen, um diesen Bereich anschaulicher darzustellen. Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=0,67$.

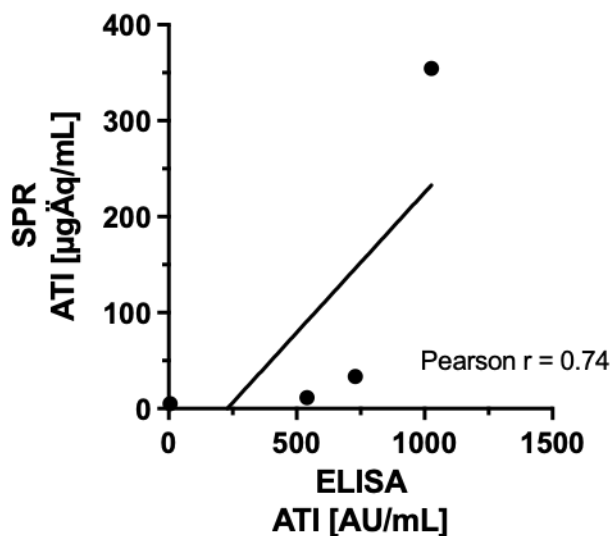


Abbildung 17: Korrelation der ATI-Konzentrationen zwischen SPR-Biosensor und ELISA für Patienten mit nicht-detektierbaren IFX-Spiegeln im Vergleichs-ELISA (n=4)

Korrelation zwischen den ATI-Konzentrationen aus den SPR-Messungen und den Messwerten des Vergleichs-ELISA. Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=0,74$.

4.2. Retrospektive Auswertung des TDIM bei den CED-Patienten

4.2.1. Patientenkollektiv

Es konnten 38 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Für jeden Patienten gab es vier bis 30 (median 12) TDIM Bestimmungen über 2,5 bis 11,8 Wochen (median 6 Wochen). Insgesamt konnten jeweils 500 TDIM-Werte für ATI- und IFX-Spiegel analysiert werden. Für 444 (89%) bzw. 224 (45%) der 500 TDIM-Werte lagen korrespondierende CRP- bzw. FC-Spiegel vor. Weitere Eigenschaften des Patientenkollektiv wurden in Tabelle 9 dargestellt (Kapitel 3.2.4.3). Besonderer Augenmerk lag auf der **Steigung der ATI-Konzentration über die Zeit (S_{ATI})** im Konzentration/Zeit-Verlaufdiagramm (siehe dazu Abbildung 7). Zur genauen Analyse des Einflusses der Antikörperbildung wurden die Patienten je nach individuellem S_{ATI} Wert in drei Gruppen eingeteilt. Bei ATI negativen Patienten (ATI-N) waren keine ATI quantifizierbar. Nach einer ATI-Bildung wurde je nach ATI-Dynamik unterschieden in eine negative S_{ATI} (ATI-↓) und eine positive S_{ATI} (ATI-↑) Gruppe. Tabelle 14 fasst die Einteilung der Patienten in die verschiedenen Gruppen zusammen.

Tabelle 14: Einteilung der Patienten in Gruppen nach ATI-Dynamik

Abkürzung	ATI-N	ATI-↓	ATI-↑
Beschreibung	Keine ATI Detektion	Negative S_{ATI}	Positive S_{ATI}

4.2.2. Vergleich der S_{ATI} Gruppen

Bei Vergleich der Gruppen lag ATI_{median} bei Patienten mit ATI-↑ mit 42,5 AU/mL signifikant höher als bei Patienten mit ATI-↓ (5,0 AU/mL; $p < 0,0001$). Auch ATI_{max} war bei ATI-↑ mit 205,7 AU/mL signifikant höher als bei ATI-↓ (45,6 AU/mL; $p < 0,0001$). S_{ATI} lag bei ATI-↑ mit 4,335 AU/mL/Woche signifikant höher als bei ATI-↓ (-1,031 AU/mL/Woche; $p < 0,0001$). Des Weiteren konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich des LOR und des TAs festgestellt werden ($p = 0,004$; $p = 0,01$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen für den TA erklären sich anhand der hohen Zahl an TA bei ATI-↑ verglichen mit ATI-↓ (70,0% vs. 8,3%; $p = 0,0062$). Sowohl bei ATI-↑ als auch ATI-N kam es signifikant häufiger zu einem LOR (60%; $p = 0,028$ und 18,8%; $p = 0,046$) als bei ATI-↓ (0%). Die mediane Therapiedauer nach T₃ bis zum LOR lag bei 22,3 Wochen (IQA

15,0-63,5 Wochen). Der mediane IFX-Spiegel war bei ATI-↓ (5,4 µg/mL) signifikant höher als bei ATI-↑ (2,1 µg/mL; p=0,0076). Tabelle 15 fasst die Patientencharakteristika differenziert nach S_{ATI} Gruppe zusammen. Es wurde untersucht, welche Form des LOR nach Ma *et al.* (2019) bei der jeweiligen S_{ATI} Gruppe vorlag (Kapitel 3.2.4.4.2)⁷⁶. Bei allen ATI-N Patienten lag NIPV vor. Bei ATI-↑ konnte in 66,7% IPV und in 33,3% MV festgestellt werden. (Tabelle 16)

Tabelle 15: Patientencharakteristika nach S_{ATI} Gruppe

Charakteristika	Statistik			alle	P-Wert		
	ATI-N	ATI-↓	ATI-↑		N vs. ↓	N vs. ↑	↓ vs. ↑
Total, n (%)	16 (42,1)	12 (31,6)	10 (26,3)				
Alter, Jahren, median (IQA)	39 (30-57)	33 (27-50)	43 (26-63)	0,7			
Weibliches Geschlecht, n (%)	8 (50,0)	7 (58,3)	5 (58,3)	0,9			
Diagnose MC, n (%)	13 (81,3)	10 (83,3)	5 (50,0)	0,1			
TA, n (%)	6 (37,5)	1 (8,3)	7 (70,0)	0,01*	0,18	0,23	0,0062 **
aufgrund LOR	3 (18,8)	0 (0,0)	6 (60,0)	0,004* *	0,24	0,046*	0,0028 **
aufgrund NW	2 (12,5)	1 (8,3)	2 (20,0)	0,7			
aufgrund Noncompliance	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,5			
NW auf IFX, n (%)	3 (18,8)	6 (50,0)	2 (20,0)	0,2			
KM, n (%)	12 (75,0)	6 (50,0)	3 (30,0)	0,07			
Therapiedauer, wochen, median, (IQA)	63,8 (28,6- 105,8)	75,6 (38,9-93,9)	66,0 (31,8- 117,1)	0,9			
IFX_{median}, µg/mL, median (IQA)	NA NA	5,4 (3,9-9,7)	2,1 (1,0-4,0)	NA	NA	NA	0,0076 **
IFX_{min}, µg/mL, median (IQA)	1,3 (0,4-2,1)	1,1 (0,3-3,2)	0,6 (0,3-1,5)	0,4			
S_{IFX}, µg/mL/Woche, median (IQA)	NA	-0,247 (-0,595(- 0,011))	-0,021 (-0,147- 0,115)	NA	NA	NA	0,1440
ATI_{median}, AU/mL, median (IQA)	5,0 (5,0-5,0)	5,0 (5,0-9,1)	42,5 (20,3- 140,6)	<0,000 1***	0,0081 **	<0,000 1***	0,0017 **
ATI_{max}, AU/mL, median (IQA)	5,0 (5,0-5,0)	45,6 (17,7-57,7)	205,7 (58,4- 506,9)	<0,000 1***	<0,000 1***	<0,000 1***	0,0090 **

S_{ATI}, AU/mL/Woche, median (IQA)	0,000 (0-0)	-1,031 (-2,469-(- 0,421))	4,335 (0,631- 8,617)	<0,000 1***	<0,000 1***	<0,000 1***	<0,000 1***
CRP_{median}, mg/dL, median (IQA)	0,29 (0,05 - 0,74)	0,21 (0,06 - 0,31)	0,35 (0,16 - 1,13)	0,3			
FC_{median}, µg/g, median (IQA)	288 (51 - 733)	156 (88 - 493)	246 (78 - 489)	0,9			
T₀, wochen, median (IQA)	NA	1,1 (0,0 - 13,8)	8,9 (0,0 - 21,4)	NA	NA	NA	0,4799
DI Verkürzung^a	14 (87,5)	11 (91,7)	9 (90,0)	0,9			
Frequenz^a	1,0 (0,0-1,0)	1,5 (1,0-2,8)	2,0 (1,0-3,0)	0,6			
Dosiserhöhung^a	6 (37,5)	6 (50,0)	4 (40,0)	0,8			
Frequenz^a	0,0 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,9			

Signifikanzniveau: * für $0,01 < p \leq 0,05$, ** für $0,001 < p \leq 0,01$, und *** für $p \leq 0,001$.
^aDie Variablen Dosisintervall (DI)- Verkürzung und Dosiserhöhung gibt die Zahl der Patienten mit Intervention an. Die Frequenzen geben die Zahl an Interventionen je Patient an.

Tabelle 16: LOR-Typen der initialen Patientenkohorte (n=41)

Patient Pseudonym	S_{ATI} Gruppe	IFX bei LOR, µg/mL	ATI bei LOR, AU/mL	LOR-Typ*	Δ(T₃-T_{LOR}), wochen**
P-29	ATI-N	1,7	n.d.	NIPV	NA
P-31	ATI-N	1,4	n.d.	NIPV	NA
P-32	ATI-N	2,9	n.d.	NIPV	NA
P-34	ATI-↓	4,5	n.d.	MV	0,0
P-26	ATI-↑	1,4	17,4	IPV	82,7
P-36	ATI-↑	n.d.	105,3	IPV	19,6
P-38	ATI-↑	n.d.	545,2	IPV	16,6
P-6	ATI-↑	3,9	173,5	MV	57,1
P-8	ATI-↑	5,6	n.d.	MV	24,9
P-15	ATI-↑	n.d.	1026,5	IPV	0,0
P-17	ATI-↑	n.d.	540,0	IPV	10,3

*Für eine Beschreibung der LOR-Typen nach Ma *et al.* (2019) siehe Kapitel

**Δ(T₃-T_{LOR}) ist definiert als Zeitraum von T₃ bis zum LOR (T_{LOR}). P-34 und P-15 wurden von der finalen Kohorte ausgeschlossen (n=38), da es bei ihnen zum LOR vor T₃ kam. Ihr Δ(T₃-T_{LOR}) ist 0.

n.d.: nicht detektierbar.

4.2.3. Zeit bis zum sekundären Therapieversagen und Therapieabbruch

Mittels Kaplan-Meier-Analyse wurde die Therapiedauer bis zum LOR bzw. bis zum TA bei den drei Gruppen untersucht und verglichen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede für die Zeit bis

zum LOR ($p=0.021$, Abbildung 18A), jedoch nicht für die Zeit bis zum TA ($p=0.088$, Abbildung 18B). Der paarweise Vergleich der Therapiedauer bis zum LOR ergab ein signifikant geringeres Risiko bei ATI-↓ im Vergleich mit ATI-↑ ($p=0.0015$). Zwischen ATI-N und ATI-↑ ($p=0.098$) und ATI-N und ATI-↓ ($p=0.12$) waren die Unterschiede nicht signifikant. Abbildung 18 zeigt die jeweiligen Kaplan-Meier-Kurven.

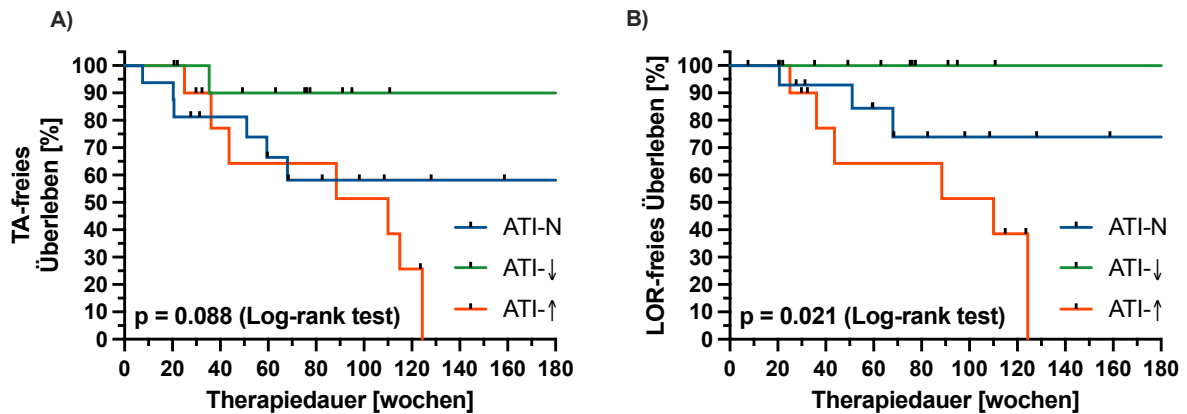


Abbildung 18: Zeit bis zum Therapieabbruch bzw. sekundären Therapieversagen

Die Kaplan-Meier Kurve zeigt die Therapiedauer bis zum Endpunkt LOR (A) und TA (B). Die Anzahl der Ereignisse waren 9 für LOR und 14 für TA. Zensuren sind als schwarze Striche gekennzeichnet.

4.2.4. Cox Regression

Um die Assoziation zwischen S_{ATI} und TA zu untersuchen, wurden uni- und bivariate HRs bestimmt. In einer univariaten Analyse mit dem Endpunkt des LOR waren neben ATI_{median} ($p=0,02$), ATI_{max} ($p=0,001$) und S_{ATI} ($p=0,002$) auch Alter ($p=0,03$), Diagnose MC ($p=0,01$) und CRP_{median} ($p=0,02$) signifikant mit dem LOR assoziiert. Diese Parameter wurden in eine bivariate Analyse eingeschlossen. Die Assoziation zwischen S_{ATI} und LOR war auch nach Korrektur für Alter ($p=0,01$), Diagnose MC ($p=0,01$), CRP_{median} ($p=0,02$) und ATI_{median} ($p=0,03$) signifikant. Nach der Korrektur für ATI_{max} erwies sich der Zusammenhang nicht mehr als statistisch signifikant ($p=0,09$). Zur weiteren Untersuchung der Korrelation des LOR mit der Diagnose in der univariaten Analyse wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis Test zum Vergleich von S_{ATI} , ATI_{median} und ATI_{max} zwischen MC und CU durchgeführt. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Für den Endpunkt TA wurde ein signifikanter Zusammenhang mit

S_{ATI} gefunden (p=0,03). Die Ergebnisse der univarianten Analyse sind in Tabelle 17 und die der bivarianten Analyse in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 17: Univariate Analyse des IFX-Therapieabbruchs

	LOR						TA					
	HR	95% KI		p	C		HR	95% KI		p	C	
Alter	1,046	1,002	- 1,093	0,03	*	0,774	1,009	0,976	- 1,042	0,6	0,558	
Weibliches Geschlecht	0,794	0,204	- 3,087	0,7		0,543	0,964	0,328	- 2,832	0,9	0,492	
Diagnose MC	0,165	0,039	- 0,695	0,01	*	0,736	0,339	0,113	- 1,016	0,06	0,599	
NW	0,280	0,035	- 2,250	0,2		0,587	1,201	0,400	- 3,613	0,7	0,534	
KM	1,309	0,347	- 4,944	0,7		0,552	1,352	0,465	- 3,933	0,6	0,558	
CRP _{median}	4,529	1,391	- 14,75	0,02	*	0,772	2,458	0,937	- 6,448	0,09	0,588	
FC _{median}	1,001	0,999	- 1,002	0,3		0,747	1,001	0,999	- 1,002	0,5	0,598	
ATI _{median}	1,008	1,001	- 1,014	0,04	*	0,647	1,005	1,000	- 1,010	0,01	*	0,519
ATI _{max}	1,004	1,002	- 1,007	0,001	**	0,630	1,003	1,001	- 1,005	0,09	0,519	
S _{ATI}	1,209	1,082	- 1,351	0,002	**	0,783	1,122	1,029	- 1,224	0,03	*	0,644
IFX _{median}	0,717	0,461	- 1,115	0,08		0,766	0,853	0,628	- 1,158	0,3	0,660	
IFX _{min}	0,630	0,288	- 1,378	0,2		0,693	0,994	0,635	- 1,556	1,0	0,518	
S _{IFX}	6,708	0,450	- 100	0,2		0,573	0,591	0,092	- 3,780	0,6	0,562	
T ₀	0,995	0,961	- 1,031	0,8		0,629	0,987	0,952	- 1,024	0,4	0,685	
DI-Verkürzung						0,530					0,510	
	3·10 ⁷	0	- Inf.	0,4			0,649	0,079	- 5,324	0,7		
Frequenz	0,841	0,493	- 1,435	0,5		0,571	0,797	0,512	- 1,242	0,3	0,611	
Dosiserhöhung	0,369	0,088	- 1,551	0,2		0,682	0,321	0,097	- 1,058	0,05	*	0,702
Frequenz	0,795	0,327	- 1,936	0,6		0,639	0,702	0,336	- 1,466	0,3	0,673	

Signifikanzniveau: * für 0,01 < p ≤ 0,05 und ** für p ≤ 0,01. KI: Konfidenzintervall; C: Konkordanz.

Tabelle 18: Bivariate Analyse des Risikos für LOR

x	HR	95% CI		p(S _{ATI})	p(x)	C
-	1,209	1,082	- 1,351	0,002	**	0,783

A	Alter	1,172	1,034	-	1,330	0,01	*	0,4	0,840
	Diagnose MC	1,168	1,036	-	1,317	0,01	*	0,08	0,851
	CRP _{median}	1,165	1,024	-	1,325	0,02	*	0,3	0,845
B	-	1,122	1,029	-	1,224	0,03	*	-	0,644
	Dosiserhöhung	1,095	0,997	-	1,202	0,06		0,2	0,763

HR für LOR (A) und TA (B) sind jeweils adjustiert an die Variable (x) dargestellt. Die kompletten Daten für IFX-Therapieabbruch sind nicht gezeigt, da S_{ATI} die einzige signifikante Variable der univariaten Analyse war. Signifikanzlevel mit * für 0,01 < p < 0,05 und ** für p ≤ 0,01.

4.2.5. Optimales Zeitintervall zur S_{ATI} Bestimmung

S_{ATI} wurde neben T₀₋₃ noch für die Zeitintervalle T₀₋₁ und T₀₋₂ berechnet, um die kürzeste TDIM Beobachtungszeit für eine solide Vorhersage des LOR zu bestimmen (Abbildung 19). Für den Endpunkt LOR wurden univariante Cox-proportional Hazard Modelle mit den verschiedenen S_{ATI}-Modellen berechnet. Nur S_{ATI} über T₀₋₃ war signifikant mit LOR assoziiert (p=0,002, Tabelle 19).

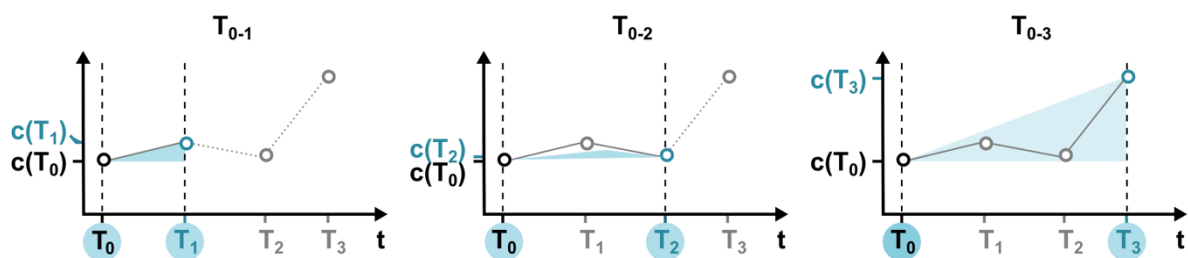


Abbildung 19: Modelle zur S_{ATI} Berechnung

Es sind drei Modelle zur S_{ATI} Bestimmung dargestellt. T₀₋₁ (links), T₀₋₂ (zentral) und T₀₋₃ (rechts). In jeder Teilabbildung ist der gleiche hypothetische ATI-Verlauf eines individuellen Patienten und der korrespondierenden mittleren Steigung gezeigt. Mit Hilfe der zwei hervorgehobenen Zeitpunkte auf der x-Achse kann S_{ATI} berechnet werden.

Tabelle 19: Charakteristiken der drei Gruppen je nach S_{ATI} Modell

Modell	Statistik					
	T ₀₋₁		T ₀₋₂		T ₀₋₃	
Patienten, n (%)	41	(100,0)	39	(100,0)	38	(100,0)
LOR, n (%)	11	(26,8)	10	(25,6)	9	(23,7)
Dauer T _{0-x} , Wochen, median (IQA)	5,3	(4,1-8,6)	12,0	(8,9-16,0)	17,2	(12,9-22,6)

HR (95% KI)	1,018 (0,999-1,037)	1,07 (0,918-1,267)	1,209 (1,082-1,51)
P Wert	0,1	0,4	0,002 **
C	0,621	0,548	0,783

x beschreibt den x. Besuch nach T₀. Signifikanzniveau: * für 0,01 < p ≤ 0,05 and ** für p ≤ 0,01.

4.2.6. Festlegung des S_{ATI}-Grenzwerts

Der S_{ATI} Grenzwert für LOR wurde mittels ROC-Analyse berechnet (Abbildung 20). Unter Berücksichtigung der ATI positiven Patienten können mittels S_{ATI} Patienten mit LOR mit einer *Area under the curve* (AUC) von 0,948 (p=0,002) identifiziert werden. Der optimale S_{ATI} Grenzwert wurde mit 2,008 AU/ml/Woche bestimmt. Damit lässt sich mit einer Sensitivität von 83,3% und einer Spezifität von 93,8% LOR vorhersagen.

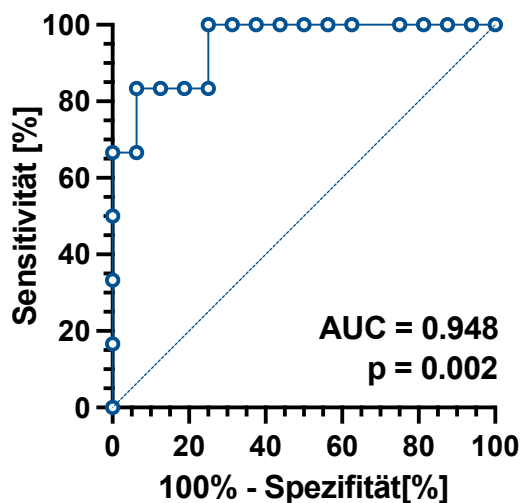


Abbildung 20: ROC-Analyse für ATI-positive Patienten (n=20)

4.2.7. Exemplarische Patientenverläufe

Abbildung 21 zeigt exemplarisch individuelle Verläufe der IFX- und ATI-Titer für die Patienten der verschiedenen Gruppen ATI-N, ATI-↓ und ATI-↑. Somit kann einerseits die S_{ATI} Berechnung leichter nachvollzogen werden und andererseits wird die unterschiedliche Dynamik der ATI-Entwicklung illustriert.

Diese Analysen des CED-Patientenkollektivs zeigen klar, dass die ATI-Spiegelbestimmungen einen Einfluss auf die Therapie mit IFX haben.

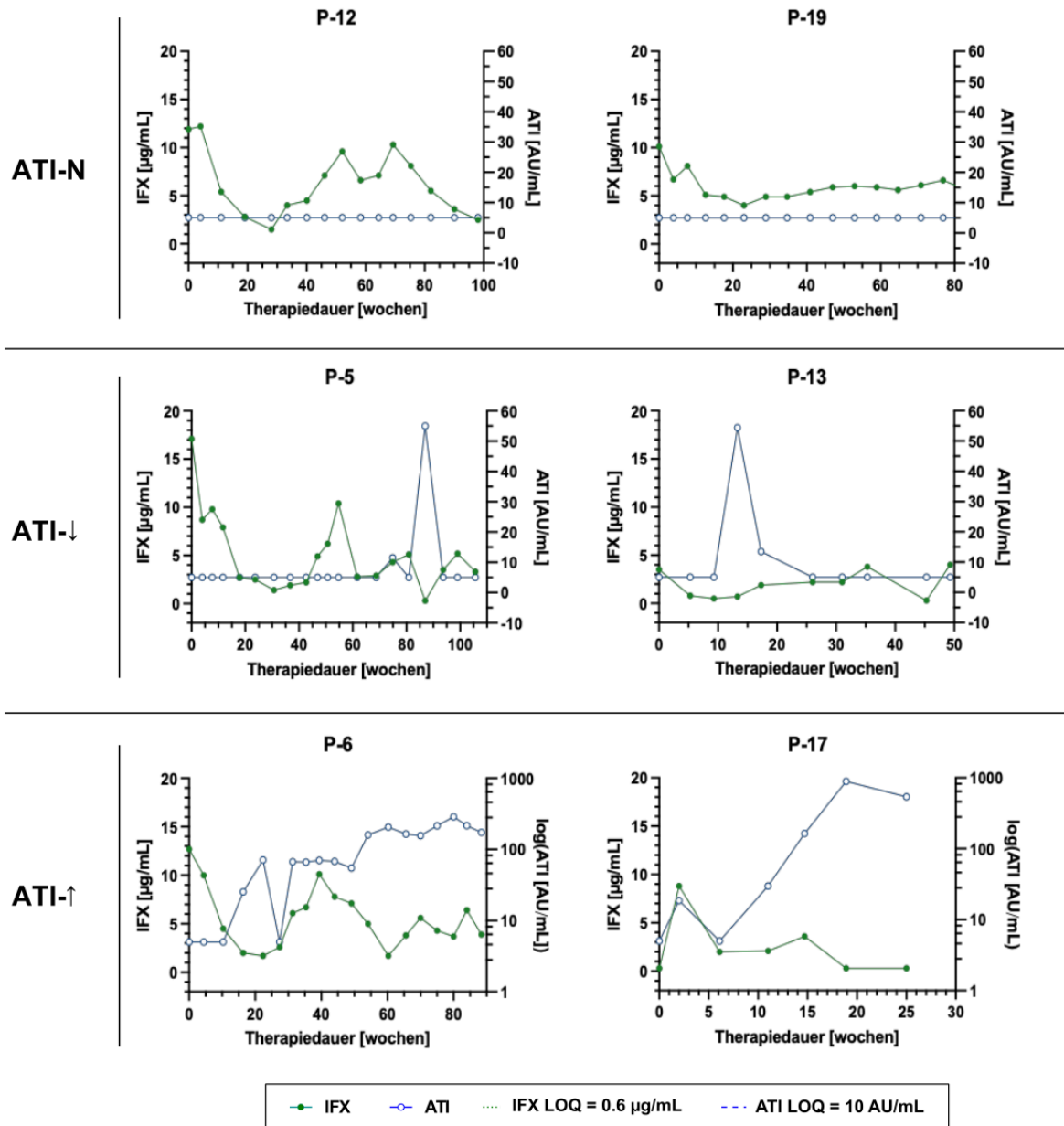


Abbildung 21: Exemplarische Patientenverläufe

Exemplarische Darstellung der IFX- und ATI-Konzentrationen von jeweils zwei Patienten einer S_{ATI} Gruppe ATI-N, ATI-↓, und ATI-↑. Mit T_0 und T_3 sind die entsprechenden Konzentrationen und Wochen gekennzeichnet, die zur S_{IFX} und S_{ATI} Berechnung verwendet wurden. Zu beachten sind die individuell unterschiedliche Behandlungsdauer und die logarithmische und über einen deutlich größeren Bereich reichende ATI-Achse für ATI-↑ im Vergleich zu ATI-N und ATI-↓. Die zwei Patienten mit ATI-N und P-13 demonstrieren auch die breite intraindividuelle Variabilität des IFX-Spiegels auch ohne ATI-Bildung. Interessanterweise hatte P-6 therapeutische IFX-Konzentrationen trotz der hohen ATI-Konzentration, wohingegen P-17 keine detektierbaren IFX-

Konzentrationen bei ATI-Konzentrationen <160 AU/mL hatte. Konzentrationen unter dem entsprechenden LOQ sind als 0.5 LOQ aufgeführt.

5. Diskussion

5.1. IFX- und ATI-Messungen mit dem SPR-Biosensor

5.1.1. IFX-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor

Bei der IFX-Konzentrationsbestimmung in 90 Patientenseren ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem zu Vergleichszwecken eingesetzten ELISA (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r=0.90$). Der analytische Messbereich und die LOQ sind für das Patientenmanagement geeignet, denn der therapeutische IFX-Zielbereich von 3-7 $\mu\text{g/mL}$ wird im Messbereich des IFXmon abgedeckt. Der Assay ist auch in der Lage, sub- und supratherapeutische IFX-Spiegel zu erfassen, könnte also in der Routinediagnostik bereits eingesetzt werden.

Thoren *et al.* (2018) etablierte einen SPR-Biosensor Assay zur IFX-Konzentrationsbestimmung und ATI-Detektion und führte einen Vergleich der Ergebnisse mittels RGA anhand 50 Patientenseren durch⁹¹. Hier ergab sich eine Korrelation von $r=0,862$ ⁹¹. Die Ergebnisse sind mit unseren jedoch nur bedingt vergleichbar, da eine andere Vergleichsmethode verwendet wurde.

Auch Beeg *et al.* (2019, 2021) validierten einen SPR-Biosensor basierten Assay zum TDIM^{80,92}. Sie nutzten wie in der vorliegenden Studie als Vergleichsmethode einen ELISA. Bei der Messung der IFX-Konzentrationen in 76 Patientenseren zeigte sich in der Bland-Altman Analyse lediglich ein Unterschied der Werte von $0,46 \pm 1,93$ und somit eine gute Übereinstimmung der Werte^{80,92}. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der IFXmon Biosensor ähnliche Messwerte wie der Vergleichs-ELISA liefert und sich zur Anwendung in der klinischen Routine eignet.

5.1.2. ATI-Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensor

Die Assayprinzipien des IFXmon-Biosensors konnten, wie schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, noch nicht zufriedenstellend auf den ADAMon-Biosensor übertragen werden. Bei der ATI-Konzentrationsbestimmung in 57 Patientenseren ergab sich lediglich eine Korrelation von $r=0.67$ zu den Vergleichsmessungen mittels des ELISA. Es muss hier jedoch betont werden, dass es für

die ATI-Bestimmungen keine Referenzmethode gibt und daher Vergleiche zur benutzten ELISA-Methode nur unter Vorbehalt zu werten sind.

Eine Erklärung für die geringe Korrelation ist, dass mit dem ADAMon-Biosensor aktuell nur freie ATI gemessen werden können, da im vorläufigen Assayprotokoll noch kein Schritt zur präanalytischen Ansäuerung zur Spaltung der ATI-IFX-Immunkomplexe enthalten ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde bei vier Patientenproben ohne nachweisbarem IFX die ATI Konzentration nativ und nach Zugabe von IFX bestimmt. Das höchste SPR-Signal zeigte sich bei jedem Patienten in den Proben ohne IFX und bekräftigt die Vermutung, dass der ADAMon-Biosensor aktuell am zuverlässigsten die freien ATI misst. Nach IFX-Zugabe zum Serum kommt es zu einer deutlichen Signalabnahme, die jedoch nicht indirekt proportional zur steigenden IFX-Konzentration ist. Vermutlich liegt schon nach Zugabe der niedrigsten IFX-Konzentration ein Großteil der ATI als IFX-ATI-Komplexe gebunden vor und daher ändert sich die ATI-Detektion nach weiterer IFX-Zugabe nur noch wenig. Des Weiteren handelt es sich bei der Bildung der IFX-ATI-Komplexe um ein dynamisches Gleichgewicht, was je nach Affinität der ATI auch wieder zu einer temporären Lösung der Komplexe führen kann. Dies könnte die höhere ATI-Konzentration bei Patient 2 nach 50 µg/mL IFX im Vergleich zu den geringeren IFX-Konzentrationen erklären (Abbildung 15).

Der als Vergleichsmethode verwendete ELISA bestimmt die totalen ATI, also sowohl freie als auch gebundene ATI und enthält einen Schritt zur Lösung der IFX-ATI-Komplexe. Er eignet sich somit auch für die ATI-Bestimmung in Anwesenheit von IFX⁹³. Die schlechte Korrelation der Werte und die schlechte Sensitivität des Assays erklären sich damit, dass der ADAMon-Biosensor und der ELISA unterschiedliche ATI messen, nämlich jeweils freie bzw. sowohl freie als auch gebundene. Betrachtet man eine Korrelation der SPR-Biosensor Werte mit dem ELISA für die vier Patientenproben, bei denen kein IFX in der Probe vorhanden ist, so zeigt sich eine bessere Korrelation von $r=0.74$.

Nur ca. 2% ($n=4$) der gemessenen Patientenserum weisen kein detektierbares IFX auf. Letztendlich sind nur die Ergebnisse dieser Proben mit dem ELISA vergleichbar, da hier nur vom Vorliegen freier ATI ausgegangen werden kann und beide Methoden diese bestimmen. Bei 98% ($n=53$) der Patientenserum ist IFX in der Probe vorhanden und es kommt zur Bildung von IFX-ATI-Komplexen. Die Bestimmung der totalen ATI liefert somit immer höhere Werte als eine Detektion des variablen Anteils der freien ATI.

Ein weiteres grundlegendes Problem bei dem Vergleich zwischen ELISA und ADAMon-Biosensor liegt in der ATI Messung in verschiedenen Einheiten. Der ELISA bestimmt ATI in AU/mL, während mit dem SPR-Biosensor ATI in µgÄq/mL gemessen werden. Nach Rücksprache

mit dem Diagnostikunternehmen Immundiagnostik ist eine Umrechnung von AU/mL in $\mu\text{g/mL}$ nicht möglich, da in dem Verfahren ein anderer Kalibrator zum Einsatz kommt.

Thoren *et al.* (2018) führten mit ihrem SPR-Biosensor basierten Assay nur eine ATI-Detektion (ATI-positiv oder ATI-negativ), ohne Quantifizierung der ATI-Konzentration durch¹¹³. Mit dem RGA als Vergleichsmethode ergab sich eine Übereinstimmung von 74% bei einer ähnlichen Zahl falsch negativer und falsch positiver ATI Detektionen mit dem SPR-Biosensor⁹¹. Es wurde keine Methodik zur Lösung der IFX-ATI-Immunkomplexe beschrieben. Die Unterschiede zwischen RGA und SPR wurden vor allem hinsichtlich der Eigenschaften der Assays, unterschiedliche ATI-Charakteristiken zu erfassen, interpretiert⁹¹. Diese Studie macht die Schwierigkeiten deutlich, ATI mit dem SPR zu detektieren und mit auf unterschiedlichen Methoden basierten Assays zu vergleichen.

Beeg *et al.* (2019,2021) bestimmten mit einem SPR-Biosensor basierten Assay IFX- und ATI-Konzentrationen in 76 Patientenproben. Wie bereits beschrieben, zeigten die IFX-Konzentrationsbestimmung - wie bei unserem IFXmon-Biosensor - eine gute Übereinstimmung mit einem Vergleichs-ELISA. Bei den ATI-Konzentrationen fand sich hingegen keine hinreichende Korrelation zum ELISA. Die von Beeg beschriebene SPR-Methode ist ebenfalls auf einen monoklonalen ATI kalibriert, der jedoch unterschiedlich zu dem im ADAMon-Assay eingesetzten ist (HCA-216). Die ADAMon-Ergebnisse unterscheiden sich zudem von den Daten von Beeg *et al.*, da in deren Assayprotokoll eine präanalytische Ansäuerung zur Lösung von IFX-ATI-Komplexe enthalten ist und der Assay damit als „drug-tolerant“ beschrieben wird. Der in der Publikation als Vergleichsmethode verwendete ELISA ist hingegen „drug-sensitive“, eine ATI-Bestimmung sollte also nur bei IFX-Spiegeln $< 1\mu\text{g/mL}$ erfolgen.

Eine weitere Beobachtung von Beeg *et al.* (2021) war, dass ATI, die nur mit dem SPR-Biosensor nachweisbar waren und nicht im ELISA, eine hohe Dissoziationsrate und damit eine niedrige Affinität zu IFX aufwiesen⁹². Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass mittels ELISA die ATI unterschätzt werden, da es zum Beispiel bei den langen Inkubationsschritten beim ELISA zu einer Dissoziation und zu einem nachfolgenden Nichterfassen der niedrig-affinen ATI kommen kann⁹². In der Literatur gibt es mehrere Quellen, die beschreiben, dass mittels ELISA vor allem hoch-affine Antikörper detektiert werden können^{85,94,95}. Mit dem SPR-Biosensor werden auch niedrig affine Antikörper erfasst, da eine Messung in Echtzeit kurz nach Probeninjektion erfolgt^{91,92}. Dass auch niedrig affine ATI einen Einfluss auf die IFX-Serumkonzentrationen haben können, wurde oben bereits ausgeführt.

Letztlich lässt sich festhalten, dass die verschiedenen Bindungseigenschaften der ATI deren Quantifizierung erschweren. Wenn verschiedene Bestimmungsmethoden unterschiedliche ATI-

Charakteristika erfassen, sind Vergleichsbetrachtungen schwierig anzustellen. Es sollten Assays verwendet werden, die möglichst alle ATI-Typen detektieren können, was mit dem SPR-Biosensor grundsätzlich möglich ist. Unser ADAMon-Biosensor stellt ein „drug-sensitiven“ Assay da, mit dem ATI bei nicht detektierbaren IFX-Spiegeln bestimmt werden können. Weitere Experimente sind nötig, um das Assayprotokoll mit einem Schritt zur Lösung der IFX-ATI-Komplexe zu erweitern und so die Gesamtheit der ATI bestimmen zu können.

5.2. Prognostische Relevanz der ATI-Bestimmung im Rahmen der TDIM-Studie bei CED-Patienten

Bei der retrospektiven Auswertung der routinemäßig erfassten TDIM-Daten von 38 Patienten mit CED konnte gezeigt werden, dass die Dynamik der ATI-Spiegel prognostisch relevant ist. Dies soll im Weiteren ausgeführt werden.

5.2.1. Patientenkollektiv

38 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien der vorliegenden Studie und wurden in das Patientenkollektiv aufgenommen.

Verglichen mit anderen retrospektiven Studien zu proaktivem TDM und Immunogenität ist das Studien-Kollektiv recht klein. Hier ist jedoch anzumerken, dass nicht nur die klinische Relevanz der Höhe der ATI-Spiegel untersucht wurde, sondern die Serumproben auch experimentell zur Evaluierung des SPR-Assays genutzt wurden. Studien mit ähnlichen Zielen hatten auch ein vergleichbar großes Patientenkollektiv. Nemoz *et al.* (2019) führte zum Beispiel eine retrospektive Studie mit 55 Patienten zur Bestimmung von IFX-Konzentrationen, die mit klinischer Remission assoziiert sind, mittels Massenspektroskopie durch⁹⁶. Trotzdem ist die Größe des vorliegenden Kollektivs, vor allem hinsichtlich der retrospektiven Auswertung, vergleichsweise klein. Dadurch könnten signifikante Zusammenhänge kaschiert werden und es konnten nicht mehr als zwei Variablen in die multivariante Analyse inkludiert werden.

Bei der Inhomogenität der Diagnosen zeigt sich eine Schwäche der Studie, da deutlich mehr MC Patienten (28 MC vs. 10 CU) eingeschlossen wurden, bzw. keine Differenzierung nach der Diagnose erfolgte. In einigen anderen Studien wurden jedoch auch Patienten mit beiden Diagnosen eingeschlossen⁹⁷⁻⁹⁹. Auch das retrospektive und monozentrische Design der Studie stellt einen Schwachpunkt dar. Dies könnte zu Verzerrungen führen.

Als Stärke der Studie ist das proaktive hochfrequente TDIM Monitoring hervorzuheben. In der Studie lagen durchschnittlich je Patient 12 Besuche mit einem Abstand von sechs Wochen vor. Bei anderen Studien mit hoher Zahl an TDIM Bestimmungen wurden ca. ein- bis fünfmal ATI-Spiegel¹⁰⁰ über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten^{100,101} im Serum detektiert. Bei Vande Castele *et al.* (2013) lagen durchschnittlich 14 TDIM Werte über einen Zeitraum von 12 Jahren je Patient vor⁹⁷. Trotz der kleinen Kohortengröße wurden statistisch hoch signifikante Ergebnisse erzielt. Ein Alleinstellungsmerkmal der Studie stellt die Reevaluation der TDIM Werte mit einem

alternativen Testverfahren dar. Mit Hilfe des SPR-Biosensors können zusätzliche Bindungsinformationen über ATI gewonnen werden, die die individuelle Therapie beeinflussen könnten.

5.2.2. S_{ATI} als neuer Parameter zur Vorhersage des LOR

Mit proaktivem TDIM wurde untersucht, ob über die ATI-Dynamik eine Vorhersage hinsichtlich des LOR bei CED-Patienten unter Therapie mit IFX getroffen werden kann. Dass die Entwicklung von ATI mit geringeren Ansprechraten auf die Therapie mit IFX assoziiert ist, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden^{102,79,103–110,69}. Nanda *et al.* (2013) beschreiben in einer Metaanalyse, dass das Risiko für Therapieversagen nach der Entwicklung von ATI unter IFX-Therapie auf das Dreifache erhöht ist¹¹¹. In unserem Patientenkollektiv entwickelten 57,9% der Patienten ATI. Verglichen mit der Literatur haben wir, vermutlich aufgrund des intensiven proaktiven Monitorings, eine recht hohe ATI-Detektionsrate^{79,103,106,109}.

S_{ATI} wurde als neuer Parameter definiert und beschreibt die dynamische ATI-Entwicklung über ca. 17 Wochen nach der ersten ATI-Detektion. Mittels uni- und multivarianter Analyse und ROC-Analyse konnte die Bedeutung von S_{ATI} als Parameter zur Vorhersage des LOR unterstützt werden. Ein S_{ATI} -Grenzwert von 2,0 AU/mL/Woche war bei ATI-positiven Patienten mit hoher Sensitivität und Spezifität mit LOR assoziiert. Uni- und multivariante Analysen ergaben, dass S_{ATI} unter allen untersuchten Parametern die beste Vorhersagekraft für LOR hatte. Es gibt zahlreiche Studien, die zeigen, dass ATI mit einer kürzeren Therapiedauer assoziiert sind^{55,67,112,113}. Unter Berücksichtigung von S_{ATI} zeigten sich in der Kaplan-Meier-Analyse signifikante Unterschiede für die Zeit bis zum LOR, wobei ATI-↓ ein signifikant geringeres Risiko für LOR hatte als ATI-↑. Die mediane Behandlungsdauer bei ATI-↑ lag bei ca. 110 Wochen.

Üblicherweise wurden die verschiedenen Laborparameter wie S_{ATI} über das Zeitintervall T_{0-3} bestimmt. Nur ATI_{max} und IFX_{min} wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum des jeweiligen Patienten berechnet. Sowohl für S_{ATI} als auch für ATI_{max} wurde eine signifikante Assoziation mit LOR gefunden. Die HRs der beiden Parameter waren vergleichbar (ATI_{max} : 1,004; S_{ATI} : 1,209). Letztendlich ist es unklar, ob und wann ATI_{max} während der IFX-Therapie erreicht wird. S_{ATI} stellt einen leichter zugängigen und handhabbaren Parameter dar.

5.2.3. Beurteilung weiterer Parameter hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft zum LOR

Ein weiterer bekannter Prädiktor des LOR ist neben dem ATI-Titer der IFX-Spiegel^{114,115}. Unter Berücksichtigung der fehlenden Standardisierung im Umgang mit ATI wird die IFX-Therapie häufig nach dem IFX-TL angepasst^{116–121}. In der vorliegenden Studie war IFX und die IFX-basierten Indizes nicht signifikant mit LOR assoziiert. Dies könnte darin begründet sein, dass über den Zeitraum T₀₋₃ nur eine limitierte Anzahl an Daten ausgewertet wurde. Des Weiteren konnten IFX_{median} und S_{IFX} nicht für Patienten ohne ATI bestimmt werden. Somit wurden sie nicht in die Analysen eingeschlossen. Trotzdem konnten in der univariaten Cox-Regression keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den IFX-basierten Parametern und LOR gefunden werden, obwohl alle Patienten eingeschlossen wurden. Womöglich führte das aggressive proaktive Dosisintensivierungsprotokoll dieser Studie zu Abweichungen der IFX-TL. Die exemplarischen Patientenverläufe verdeutlichen, dass die IFX-Spiegel sogar in Abwesenheit von ATI fluktuieren (Abbildung 20). Die Bedeutung des ATI-Monitorings wird von weiteren Arbeitsgruppen geteilt. Magro *et al.* (2017) postulierten, dass Therapieentscheidungen nicht nach dem IFX-TL, sondern basierend auf dem ATI- und FC-Spiegel getroffen werden sollten¹²². Neben dem IFX-TL sind FC und CRP bekannte Parameter, die mit LOR assoziiert sind^{100,121,123}. In unseren Analysen konnte dies jedoch nur für CRP_{median}, nicht für FC_{median} gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte die geringe Zahl an FC-Werte sein (zu 45% der TDIM Werte). Des Weiteren waren Alter und Diagnose in der univariaten Analyse mit dem LOR assoziiert. Auch in der Literatur wird Alter über 60 Jahren als Risikofaktor für eine Fortsetzung der anti-TNF-Therapie aufgrund von Nebenwirkungen oder LOR beschrieben^{124,125}. In der univariaten Analyse wurde überraschenderweise ein erhöhtes Risiko für LOR bei Patienten mit CU gefunden. Dies deckt sich nicht mit Daten aus der Literatur. Grinman *et al.* (2020) beschrieben höhere ATI- und FC-Spiegel für Patienten mit CU als mit MC, jedoch ohne Auswirkung auf den Therapieerfolg⁹⁸. Sowohl bei Grinman *et al.* als auch in der vorliegenden Studie wurden nur eine geringe Zahl an CU-Patienten analysiert (Grinman *et al.*: n=10, 10,5% der eingeschlossenen Patienten; diese Studie: n=10, 26,3%)⁹⁸. Letztendlich könnten die Ergebnisse von Grinman *et al.* (Höhere ATI-Titer bei Patienten mit CU) und die der vorliegenden Studie (Korrelation der Diagnose CU mit LOR in der univariaten Analyse) zufällig aufgrund einer zu geringen Teststärke entstanden sein. Im Gegensatz dazu fanden Vande Casteele *et al.* (2013) keine Unterschiede der IFX- und ATI-Spiegel zwischen Patienten mit MC und CU⁹⁷. Letztendlich war S_{ATI} den anderen Variablen der bivariaten Analyse zur Vorhersage des LOR überlegen.

5.2.4. Evidenzbasierter Einsatz des TDIM

Reaktives TDM ist mittlerweile bei der Therapie von CED etabliert, für proaktives Monitoring gibt es jedoch zunehmende Evidenz^{72,74–77,79,104–106,108,110,126–131}. In der randomisiert kontrollierten Studie von Vandee Castele *et al.* (2015) (TAXIT-Trial: Trough Concentration Adapted Infliximab Treatment) wurden CED-Patienten in Remission nach einer Optimierungsphase mit Erreichen einer IFX-Konzentration von 3-7µg/ml in zwei Gruppen randomisiert. In der einen erfolgte die IFX-Dosierung anhand klinischer Symptome und Höhe des CRPs, in der anderen nach proaktivem TDM unter regelmäßiger Bestimmung der IFX-TL¹⁰⁴. Obwohl sich hinsichtlich des primären Endpunkts der Remission kein signifikanter Unterschied zeigte, hatte die Gruppe mit proaktivem TDM weniger Krankheitsschübe, CED-bedingte Operationen und Hospitalisierungsraten¹⁰⁴. Ein zweiter randomisiert kontrollierter Trial (TAILORIX: Tailored treatment with infliximab for active luminal Crohn's disease) von D'Haens *et al.* (2018) führte einen Vergleich von zwei Dosisintensivierungsstrategien basierend auf TDM, klinischen Symptomen und Biomarkern zu einer Dosisintensivierung basierend auf klinischen Symptomen durch¹³¹. Hier zeigte sich keine Überlegenheit hinsichtlich der steroidfreien Remission bei der TDM-basierten Dosisintensivierungsstrategie. Die nicht verblindete randomisierte Kontrollstudie von Assa *et al.* (2020) konnten erstmals in einem prospektiven Design eine Überlegenheit des proaktiven gegenüber des reaktiven TDM hinsichtlich der steroid-freien Remission zeigen¹³². 78 Kinder mit MC wurden nach Ansprechen auf ALM in der Induktionstherapie in zwei Gruppen mit proaktiven oder reaktiven TDM randomisiert. Den primären Endpunkt der Studie - steroidfreie Remission - wurde in der proaktiven Therapiegruppe signifikant häufiger (82%) erreicht wie in der reaktiven Gruppe (48%, p=0,002)¹³². Einige retrospektiven Studien konnten die Evidenz für proaktives TDM verstärken^{110,126,129,130}. Papamichael *et al.* (2018) konnte in einer multizentrischen Studie zeigen, dass proaktives TDM im Vergleich zu reaktivem mit einem besseren klinischen Outcome, weniger ATI-Bildung und geringeren Raten an Infusionsreaktionen assoziiert ist¹²⁶. In der aktuellen ECCO-Leitlinie für die Therapie des MC wird aufgrund der ungenügenden Evidenz von proaktivem TDM diesem weder zu- noch abgeraten¹²⁸. Begründet wird die Entscheidung vor allem mit dem Ergebnis der methodisch auch kritisierten TAXIT- und TAILORIX-Trials, die als randomisiert kontrollierte Studien beide den primären Endpunkt verfehlen. Die Studie von Assa *et al.* wurde aufgrund des Patientenkollektivs mit ausschließlich pädiatrischen Patienten nicht in die Entscheidungsfindung mit einbezogen. In der vorliegenden Studie ermöglichte das proaktive TDIM eine präzise und frühe Bestimmung von T₀. T₀ trat durchschnittlich 3,4 Wochen nach der ersten TDIM Bestimmung während der Erhaltungstherapie auf, was durchschnittlich 16 Wochen

nach der ersten IFX-Infusion ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem anderer Studien mit vergleichbaren proaktiven TDIM-Protokollen^{97,133}. Die genannten Studien definierten keinen Zeitpunkt oder -intervall zur Therapieentscheidung, wohingegen unsere Ergebnisse eine Vorhersage des LOR ca. 17 Wochen nach T₀ ermöglichen. Insgesamt müssen noch weitere große methodisch hochwertige prospektive Studien zur Untersuchung der Überlegenheit des proaktiven TDIMs durchgeführt werden, bis eine generelle Empfehlung hierfür ausgesprochen werden kann.

5.2.5. Transiente vs. persistente ATI

Studien zur ATI-Dynamik sind limitiert und untersuchen primär die Eigenschaft der ATI als transient oder persistent. Roblin *et al.* (2015) konnte in einer prospektiven Kohortenstudie zeigen, dass die Entwicklung von transienten ATI keinen Einfluss auf das klinische Outcome hat. Persistente ATI hingegen sind mit LOR assoziiert und führten zu niedrigeren IFX-TL¹³⁴. Steenholdt *et al.* (2012) beschrieben in einer retrospektiven Studie die klinische Bedeutung von Änderungen der ATI-Spiegel¹³⁵. Bei zwei Drittel der CED-Patienten verschwanden die ATI bei fortgesetzter IFX-Therapie, wohingegen bei dem Rest der Patienten aufgrund der ATI-Persistenz und damit verbundenen subtherapeutischen IFX-Spiegeln die Therapie beendet werden musste¹³⁵. Vande Castele *et al.* (2013) führten aus, dass Patienten mit persistenten ATI signifikant höhere ATI-Spiegel und ein Fünffach höheres relatives Risiko für Therapieabbruch mit IFX hatten im Vergleich zu transienten ATI⁹⁷. Obwohl es nicht Ziel dieser Arbeit war, konnten wir feststellen, dass in der ATI-↓-Gruppe 83,3% der Patienten ATI-negative Seren am Ende des Beobachtungszeitraums verglichen mit nur 10% in der ATI-↑-Gruppe hatten. Die signifikant niedrigeren medianen ATI-Spiegel bei ATI-↓ und die signifikant höhere Rate an LOR bei ATI-↑ steht in Einklang mit den oben zitierten Studien. Auch die verschiedenen LOR-Typen nach Ma *et al.* (2019) in den S_{ATI} Gruppen unterstützen die Ergebnisse⁷⁶. Bei ATI-↑ dominierte das IPV, wohingegen bei ATI-N das NIPV im Vordergrund stand. Somit kann S_{ATI} anhand der Daten als früher Indikator für ATI-Persistenz gesehen werden. Die vorliegende Studie zeigt, dass proaktives TDIM zu einem besseren pharmakologischen Management führt und die klinische Entscheidungsfindung beeinflusst. Weitere prospektive Studien müssen folgen, um zu untersuchen, ob das proaktive TDIM auch mukosale Heilung und histologische Remission bei Patienten mit CED beeinflusst.

5.2.6. S_{ATI} als Hilfe bei der klinischen Entscheidungsfindung

Die Stärke und Dynamik der initialen Immunantwort auf IFX ist in unserer Studie charakteristisch für die Aggressivität und das Ansprechen auf Therapieinterventionen, wie Dosisanpassungen. Ein initialer steiler ATI-Anstieg, repräsentiert durch eine positive S_{ATI} , kann zu einer starken Immunogenitätsentwicklung und damit einer erhöhten IFX-Clearance führen. Der Zeitraum von 17 Wochen zwischen T_{0-3} umfasst zudem Interventionen, um ATI entgegenzuwirken. Steigende ATI-Spiegel trotz Dosisanpassung zu Beginn der Erhaltungstherapie weisen auf eine geringe Empfänglichkeit der ATI für Dosisanpassungen und ATI Persistenz hin, was beides mit LOR assoziiert ist. Somit schlagen wir S_{ATI} , verbunden mit einer klinischen Evaluation, als wertvollen Parameter für die Entscheidungsfindung vor. Wenn $S_{ATI} > 2,0$ AU/mL/Woche und der Patient in Remission ist, kann die IFX-Therapie beibehalten werden. Liegt ein S_{ATI} Anstieg über den Grenzwert verbunden mit einer klinischen Verschlechterung des Patienten vor, sollten therapeutische Interventionen, wie Dosiserhöhung, eine immunsuppressive Komedikation oder der Wechsel zu einem anderen Biologikum erwogen werden. Zusammenfassend sollte eine hoher S_{ATI} die Aufmerksamkeit des behandelnden Gastroenterologen wecken.

5.3. Limitationen und Möglichkeiten der Labordiagnostik beim TDIM

Wie zuvor ausgeführt, unterstützen die Ergebnisse der vorgelegten Promotionsarbeit die Notwendigkeit eines proaktiven TDIM, welches sowohl die IFX- als auch die ATI-Konzentrationsbestimmung beinhaltet.

Die in diesem Zusammenhang häufig diskutierten Limitationen des TDIM sind vor allem Unklarheiten über die Interpretation und Konsequenz der Ergebnisse, was anhand zahlreicher Therapiealgorithmen ersichtlich wird^{105,108}. Dies wird beeinflusst von unterschiedlichen Ergebnissen der verschiedenen Assays und uneinheitlichen Grenzwerten zu therapeutischen IFX-Spiegeln und Zielbereichen⁷⁹.

Ein weiterer kontrovers diskutierter Punkt sind die Kosten des TDIMs. Kamperidis *et al.* (2019) zeigten, dass nur 22% der TDM-Anforderungen zu einer Therapieänderung führten und somit das TDM in den meisten Fällen trotz hoher Kosten keine direkte klinische Konsequenz hat¹⁰⁶. Moss *et al.* (2019) legte diese Ergebnisse jedoch als eine Bestätigung der aktuellen Therapie und Diagnose aus¹³⁶. Des Weiteren sind die Ausgaben für Assays zur Aufrechterhaltung der Remission günstiger für das Gesundheitssystem als die Kosten für neue Krankheitsschübe, die mit einer Therapieeskalation, Hospitalisierung und möglichen Operationen verbunden sind.

Im Rahmen der vorliegenden Studie werden 145 Serumproben von 41 Patienten, die unter proaktivem TDIM regelmäßig überwacht wurden, mit einem neu entwickelten Assay basierend auf der SPR-Biosensorik vermessen. SPR-basierte Assays sowohl zur IFX- als auch zur ATI-Konzentrationsbestimmung wurden bisher nur von zwei weiteren Arbeitsgruppen veröffentlicht^{80,91}. Die vorliegenden Ergebnisse lassen erwarten, dass die SPR-Biosensorik in naher Zukunft auch im Routinelabor eine valide Bestimmungsmethode für IFX und ATI darstellen wird.

In der vorliegenden Patientenstudie wird als Vergleichsmethode der ELISA verwendet. Dies ist die am meisten genutzte Methode im Rahmen des TDIM^{55,137}. Vor- und Nachteile sowie alternative Methoden werden in Kapitel 2.1.6 erläutert. Der SPR-Biosensor kann im Anwendungsgebiet des TDIM als Alternative zu anderen Methoden gesehen werden, da es eine markierungsfreie Quantifizierung in Echtzeit ermöglicht und zudem die Kinetik der Analyten untersucht werden kann. Aus kinetischen Daten können dann Aussagen auf das Vorliegen von neutralisierenden und nicht-neutralisierenden ATI getroffen werden. Weitere Untersuchungen werden klären, inwieweit eine derartige ATI-Differenzierung diagnostisch sinnvoll ist.

5.4. Ausblick

Die im Rahmen der Patientenstudie durchgeführte retrospektive Auswertung von 552 Serumproben von 41 CED-Patienten liefert Hinweise auf die Relevanz und den Nutzen des proaktiven TDIM und sollte daher zunehmend in das therapeutische Management von CED-Patienten unter Therapie mit IFX integriert werden. Entscheidend ist insbesondere eine Berücksichtigung der Höhe und Dynamik der ATI, nicht nur eine Orientierung am IFX-Spiegel. Mit S_{ATI} können wir einen neuen diagnostischen Parameter repräsentativ für die ATI-Dynamik als Prädiktor des LOR bei CED-Patienten vorstellen. S_{ATI} wurde anhand von zwei TDIM Bestimmungen über einen kurzen Zeitraum von ca. 17 Wochen bestimmt und bietet zusammen mit einer klinischen Evaluation des Patienten eine Hilfe zum weiteren therapeutischen Management. S_{ATI} ermöglicht eine schnelle und standardisierte Reaktion auf die erste ATI-Detektion. Zur frühen ATI-Detektion empfehlen wir die Durchführung eines proaktiven TDIM. Es ist aufgrund einer ähnlichen Immunogenitätsentwicklung davon auszugehen, dass die hier beschriebenen Ergebnisse auch auf andere Biologika, vor allem TNF-Inhibitoren, übertragbar sind. Analoge SPR-Biosensoren können mit relativ wenig Aufwand analog aufgebaut werden, um auch andere TNF-Inhibitoren und deren ADA im Serum zu quantifizieren. Weitere Studien müssen dies zeigen.

Unter den zahlreichen Methoden, die im Rahmen des TDIM zur IFX- und ATI-Konzentrationsbestimmung verwendet werden, sind SPR-Biosensor-basierte Assays in der Routinediagnostik zwar aktuell noch nicht verbreitet, haben aber entscheidende Vorteile insbesondere für das TDIM. So können mittels SPR-Biosensor Interaktionen der Analyten in Echtzeit, markierungsfrei und mit kurzen Analysezeiten beobachtet werden, Informationen über deren Kinetik gewonnen und alle ATI-Typen detektiert werden. Dies ist ein Alleinstellungsmerkmal der SPR-Biosensorik und macht es zu einem zukunftssträchtigen Verfahren, mit dem TDIM als Anwendungsbereich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde IFX in Seren von CED-Patienten mithilfe eines diagnostiktauglichen SPR-Biosensors quantifiziert und mit Referenzwerten aus der Routinediagnostik verglichen. Die IFX-Konzentrationen stimmen - trotz der grundlegend unterschiedlichen Messverfahren - sehr gut zwischen SPR-Biosensor und ELISA überein. Besonders zu erwähnen ist auch die Stabilität der mit IFX immobilisierten Sensoroberfläche, die viele Messzyklen erlaubt. Der SPR-Biosensor basierte Assay zur ATI-Konzentrationsbestimmung eignet sich aktuell nur zur ATI-Bestimmung in Proben ohne IFX; es müssen noch weitere Experimente zur Optimierung des Assays durchgeführt werden, damit eine Bestimmung der freien

und gebundenen ATI möglich werden und dieses Bestimmungsverfahren im Rahmen des TDIM eingesetzt werden kann. Für eine Anwendung in der klinischen Routine sind die SPR-Biosensorbasierten Assays noch zu zeitaufwendig. In dieser Hinsicht sind in Zukunft auch Point-of-Care Testing (POCT)-Geräte vorstellbar. Ein Beispiel sind Fiber-optische SPR-Geräte als Alternative zu Prismen-basierten SPR-Biosensoren^{138,139}.

Grundsätzlich können die in dieser Dissertation beschriebenen SPR-Biosensor basierten Assays zur IFX- und ATI-Konzentrationsbestimmung als Grundlage für weitere Forschungen angesehen werden, um die SPR-Biosensorik auch in der klinischen Routine zu etablieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2017;26(6):349-355. doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003
2. Odze RD. A contemporary and critical appraisal of 'indeterminate colitis.' *Mod Pathol*. 2015;28(S1):S30-S46. doi:10.1038/modpathol.2014.131
3. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(4):205-217. doi:10.1038/nrgastro.2015.34
4. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2017;152(2):313-321.e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020
5. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12.
6. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *The Lancet*. 2017;389(10080):1741-1755. doi:10.1016/S0140-6736(16)31711-1
7. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;380(9853):1606-1619. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
8. Gasche C, Berstad A, Befrits R, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(12):1545-1553. doi:10.1002/ibd.20285
9. Patel D, Trivedi C, Khan N. Management of Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Curr Treat Options Gastro*. 2018;16(1):112-128. doi:10.1007/s11938-018-0174-2
10. Garber A, Regueiro M. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. *Curr Gastroenterol Rep*. 2019;21(7):31. doi:10.1007/s11894-019-0698-1
11. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(8):1982-1992. doi:10.1097/MIB.0000000000000392
12. Lin A, Roth H, Anyane-Yeboah A, Rubin DT, Paul S. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. Published online 2020:9. doi: 10.1093/ibd/izaa189
13. Gizard E, Ford AC, Bronowicki JP, Peyrin-Biroulet L. Systematic review: the epidemiology of the hepatobiliary manifestations in patients with inflammatory bowel disease.

Aliment Pharmacol Ther. 2014;40(1):3-15. doi:10.1111/apt.12794

14. Klaus J. High prevalence of osteoporotic vertebral fractures in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2002;51(5):654-658. doi:10.1136/gut.51.5.654
15. Van Langenberg DR, Gibson PR. Systematic review: fatigue in inflammatory bowel disease: Systematic review: fatigue in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2010;32(2):131-143. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04347.x
16. Kwon YH, Kim YJ. Pre-diagnostic Clinical Presentations and Medical History Prior to the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013;16(3):178. doi:10.5223/pghn.2013.16.3.178
17. Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B. A Prospective Study of First Attacks of Inflammatory Bowel Disease and Infectious Colitis: Histologic Course during the 1st Year after Presentation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 1994;29(4):318-332. doi:10.3109/00365529409094843
18. Ott C. Smoking increases the risk of extraintestinal manifestations in Crohn's disease. *WJG.* 2014;20(34):12269. doi:10.3748/wjg.v20.i34.12269
19. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings.* 2006;81(11):1462-1471. doi:10.4065/81.11.1462
20. Höie O, Wolters F, Riis L, et al. Ulcerative Colitis: Patient Characteristics May Predict 10-Yr Disease Recurrence in a European-Wide Population-Based Cohort. *Am J Gastroenterology.* 2007;102(8):1692-1701. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01265.x
21. Singh S, Facciorusso A, Dulai PS, Jairath V, Sandborn WJ. Comparative Risk of Serious Infections With Biologic and/or Immunosuppressive Therapy in Patients With Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2020;18(1):69-81.e3. doi:10.1016/j.cgh.2019.02.044
22. Torres J, Mehandru S, Colombel J. F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017;389(10080):1741-1755. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1
23. Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(s3):2-10. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03052.x
24. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(5):376-388. doi:10.1038/nrg1607
25. Vermeire S. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.*

2006;55(3):426-431. doi:10.1136/gut.2005.069476

26. Vermeire S, Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(5):661-665. doi: 10.1097/00054725-200409000-00026

27. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1275-1285.e2. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.003

28. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, et al. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut*. 2008;57(11):1518-1523. doi:10.1136/gut.2007.146357

29. Mosli MH, Zou G, Garg SK, et al. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*. 2015;110(6):802-819. doi:10.1038/ajg.2015.120

30. Solem CA. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(8):707-712. doi: 10.1097/01.MIB.0000173271.18319.53

31. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, et al. Fecal Calprotectin Correlates More Closely With the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) than CRP, Blood Leukocytes, and the CDAI. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(1):162-169. doi:10.1038/ajg.2009.545

32. Zubin G, Peter L. Predicting Endoscopic Crohn's Disease Activity Before and After Induction Therapy in Children: A Comprehensive Assessment of PCDAI, CRP, and Fecal Calprotectin. *Inflammatory Bowel Diseases*. Published online April 2015:1. doi:10.1097/MIB.0000000000000388

33. CAVIGLIA GP, RIBALDONE DG, ROSSO C, SARACCO GM, ASTEGIANO M, PELLICANO R. Fecal calprotectin: beyond intestinal organic diseases. *Panminerva Medica*. 2018;(1). doi:10.23736/S0031-0808.18.03405-5

34. Sipponen T, Kolho KL. Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015;50(1):74-80. doi:10.3109/00365521.2014.987809

35. D'Incà R, Dal Pont E, Di Leo V, et al. Can Calprotectin Predict Relapse Risk in Inflammatory Bowel Disease? *The American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(8):2007-2014. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01870.x

36. Heida A, Park KT, van Rheenen PF. Clinical Utility of Fecal Calprotectin Monitoring in

Asymptomatic Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Practical Guide. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017;23(6):894-902.

doi:10.1097/MIB.0000000000001082

37. Rheenen PF, Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ*. 2010;341. doi: 10.1136/bmj.c3369

38. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hébuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12(3):185-191. doi:10.1097/01.MIB.0000206541.15963.c3

39. Ananthkrishnan AN, McGinley EL, Binion DG. Excess hospitalisation burden associated with *Clostridium difficile* in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008;57(2):205-210. doi:10.1136/gut.2007.128231

40. Dong J, Wang H, Zhao J, et al. Ultrasound as a diagnostic tool in detecting active Crohn's disease: a meta-analysis of prospective studies. *Eur Radiol*. 2014;24(1):26-33. doi:10.1007/s00330-013-2973-0

41. Annunziata ML, Caviglia R, Papparella LG, Cicala M. Upper Gastrointestinal Involvement of Crohn's Disease: A Prospective Study on the Role of Upper Endoscopy in the Diagnostic Work-Up. *Dig Dis Sci*. 2012;57(6):1618-1623. doi:10.1007/s10620-012-2072-0

42. Haber HP, Busch A, Ziebach R, Dette S, Ruck P, Stern M. Ultrasonographic Findings Correspond to Clinical, Endoscopic, and Histologic Findings in Inflammatory Bowel Disease and Other Enterocolitides. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2002;21(4):375-382. doi:10.7863/jum.2002.21.4.375

43. Pascu M, Roznowski AB, Müller HP, Adler A, Wiedenmann B, Dignass AU. Clinical Relevance of Transabdominal Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging in Patients With Inflammatory Bowel Disease of the Terminal Ileum and Large Bowel: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2004;10(4):373-382. doi:10.1097/00054725-200407000-00008

44. Shah SC, Colombel JF, Sands BE, Narula N. Systematic review with meta-analysis: mucosal healing is associated with improved long-term outcomes in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(3):317-333. doi:10.1111/apt.13475

45. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526-535.

46. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10(6):639-645. doi:10.1016/j.cgh.2012.01.010

47. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer

- risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(8):1097-1104.
doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x
48. Laukoetter MG, Mennigen R, Hannig CM, et al. Intestinal Cancer Risk in Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *J Gastrointest Surg.* 2011;15(4):576-583. doi:10.1007/s11605-010-1402-9
49. S3-Leitlinie Colitis ulcerosa – Living Guideline: Überprüfung 2021. *Z Gastroenterol.* 2021;59(05):479-479. doi:10.1055/a-1484-8118
50. A. Sturm, R. Atreya, D. Bettenworth, B. Bokemeyer, A. Dignaß, R. Ehehalt, C. Germer, P. C. Grunert, U. Helwig, K. Herrlinger, P. Kienle, M. E. Kreis, T. Kucharzik, J. Langhans C. Maaser, J. Ockenga, C. Ott, B. Siegmund S. Zeißig, A. Stallmach. Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechsel- krankheiten (DGVS). *AWMF online.* 2021;(AWMF-Registernummer: 021-004).
51. Burisch J, Bergemalm D, Halfvarson J, et al. The use of 5-aminosalicylate for patients with Crohn's disease in a prospective European inception cohort with 5 years follow-up – an Epi-IBD study. *United European Gastroenterol j.* 2020;8(8):949-960.
doi:10.1177/2050640620945949
52. Rezaie A, Kuenzig ME, Benchimol EI, et al. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. Cochrane IBD Group, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* Published online June 3, 2015. doi:10.1002/14651858.CD000296.pub4
53. Barberio B, Segal JP, Quraishi MN, Black J, Savarino EV, Ford AC. Efficacy of Oral, Topical, or Combined Oral and Topical 5-Aminosalicylates, in Ulcerative Colitis: Systematic Review and Network Meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis.* 2021;1-13. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab010
54. Singh S, Fumery M, Sandborn WJ, Murad MH. Systematic review and network meta-analysis: first- and second-line biologic therapies for moderate-severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;48(4):394-409. doi:10.1111/apt.14852
55. Lázár-Molnár E, Delgado JC. Implications of Monoclonal Antibody Therapeutics Use for Clinical Laboratory Testing. *Clinical Chemistry.* 2019;65(3):393-405.
doi:10.1373/clinchem.2016.266973
56. Strohl WR. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell.* 2018;9(1):86-120. doi:10.1007/s13238-017-0457-8
57. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents – Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine.* 2018;101:56-63.

doi:10.1016/j.cyto.2016.08.014

58. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T. Infliximab zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2005;102(12). <https://www.aerzteblatt.de/archiv/46047/Infliximab-zur-Therapie-chronisch-entzuendlicher-Darm-er-krank-ungen>
59. Stidham RW, Lee TCH, Higgins PDR, et al. Systematic review with network meta-analysis: the efficacy of anti-TNF agents for the treatment of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(12):1349-1362. doi:10.1111/apt.12749
60. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, Hanauer SB, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of Biological Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(4):644-659. doi:10.1038/ajg.2011.73
61. Crooks B, Barnes T, Limdi JK. Vedolizumab in the treatment of inflammatory bowel disease: evolving paradigms. *DIC*. 2020;9:1-15. doi:10.7573/dic.2019-10-2
62. Hazel K, O'Connor A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2020;11:204062231989929. doi:10.1177/2040622319899297
63. Sabino J, Verstockt B, Vermeire S, Ferrante M. New biologics and small molecules in inflammatory bowel disease: an update. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:175628481985320. doi:10.1177/1756284819853208
64. Mitchell RA, Shuster C, Shahidi N, et al. The Utility of Infliximab Therapeutic Drug Monitoring among Patients with Inflammatory Bowel Disease and Concerns for Loss of Response: A Retrospective Analysis of a Real-World Experience. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016;2016:1-7. doi:10.1155/2016/5203898
65. Gonczi L, Kurti Z, Rutka M, et al. Drug persistence and need for dose intensification to adalimumab therapy; the importance of therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel diseases. *BMC Gastroenterol*. 2017;17(1):97. doi:10.1186/s12876-017-0654-1
66. Papamichael K, Cheifetz AS. Use of anti-TNF drug levels to optimise patient management. *Frontline Gastroenterol*. 2016;7(4):289-300. doi:10.1136/flgastro-2016-100685
67. Hindryckx P, Novak G, Vande Casteele N, et al. Incidence, Prevention and Management of Anti-Drug Antibodies Against Therapeutic Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: A Practical Overview. *Drugs*. 2017;77(4):363-377. doi:10.1007/s40265-017-0693-5
68. Vermeire S, Gils A, Accossato P, Lula S, Marren A. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756283X1775035. doi:10.1177/1756283X17750355
69. Thomas SS, Borazan N, Barroso N, et al. Comparative Immunogenicity of TNF

Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs*. 2015;29(4):241-258.

doi:10.1007/s40259-015-0134-5

70. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front Immunol*. 2015;6.

doi:10.3389/fimmu.2015.00109

71. Vande Casteele N, Gils A, Singh S, et al. Antibody Response to Infliximab and its Impact on Pharmacokinetics can be Transient. *American Journal of Gastroenterology*. 2013;108(6):962-971. doi:10.1038/ajg.2013.12

72. Vermeire S, Dreesen E, Papamichael K, Dubinsky MC. How, When, and for Whom Should We Perform Therapeutic Drug Monitoring? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020;18(6):1291-1299. doi:10.1016/j.cgh.2019.09.041

73. Lee SD, Shivashankar R, Quirk D, et al. Therapeutic Drug Monitoring for Current and Investigational Inflammatory Bowel Disease Treatments. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2021;55(3):195-206. doi:10.1097/MCG.0000000000001396

74. Argollo M, Kotze PG, Kakkadasam P, D'Haens G. Optimizing biologic therapy in IBD: how essential is therapeutic drug monitoring? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(11):702-710. doi:10.1038/s41575-020-0352-2

75. Kapoor A, Crowley E. Advances in Therapeutic Drug Monitoring in Biologic Therapies for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Front Pediatr*. 2021;9:661536.

doi:10.3389/fped.2021.661536

76. Ma C, Battat R, Jairath V, Vande Casteele N. Advances in Therapeutic Drug Monitoring for Small-Molecule and Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Treat Options Gastro*. 2019;17(1):127-145. doi:10.1007/s11938-019-00222-9

77. Mitrev N, Vande Casteele N, Seow CH, et al. Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(11-12):1037-1053. doi:10.1111/apt.14368

78. Papamichael K, Vogelzang EH, Lambert J, Wolbink G, Cheifetz AS. Therapeutic drug monitoring with biologic agents in immune mediated inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2019;15(8):837-848. doi:10.1080/1744666X.2019.1630273

79. Silva-Ferreira F, Afonso J, Pinto-Lopes P, Magro F. A Systematic Review on Infliximab and Adalimumab Drug Monitoring: Levels, Clinical Outcomes and Assays. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016;22(9):2289-2301. doi:10.1097/MIB.0000000000000855

80. Beeg M, Nobili A, Orsini B, et al. A Surface Plasmon Resonance-based assay to measure

- serum concentrations of therapeutic antibodies and anti-drug antibodies. *Sci Rep*. 2019;9. doi:10.1038/s41598-018-37950-4
81. Bader LI, Solberg SM, Kaada SH, et al. Assays for Infliximab Drug Levels and Antibodies: A Matter of Scales and Categories. *Scand J Immunol*. 2017;86(3):165-170. doi:10.1111/sji.12572
82. Grasmeyer MK, Langmann AF, Langmann P, Treiber M, Thaler MA, Luppä PB. Dynamics of serum concentrations of antibodies to infliximab: a new approach for predicting secondary loss of response in inflammatory bowel diseases. *Therap Adv Gastroenterol*. 2021;14:175628482110378. doi:10.1177/17562848211037849
83. Nguyen H, Park J, Kang S, Kim M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors*. 2015;15(5):10481-10510. doi:10.3390/s150510481
84. Real-Fernández F, Pregolato F, Cimaz R, et al. Detection of anti-adalimumab antibodies in a RA responsive cohort of patients using three different techniques. *Analytical Biochemistry*. 2019;566:133-138. doi:10.1016/j.ab.2018.11.018
85. Lofgren JA, Dhandapani S, Pennucci JJ, et al. Comparing ELISA and Surface Plasmon Resonance for Assessing Clinical Immunogenicity of Panitumumab. *J Immunol*. 2007;178(11):7467-7472. doi:10.4049/jimmunol.178.11.7467
86. Grasmeyer MK. Biosensor-based monitoring of TNF antagonists and anti-drug antibodies for patient-tailored therapy of inflammatory autoimmune diseases. 2019.
87. Fischer MJE. Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In: Mol NJ, Fischer MJE, eds. *Surface Plasmon Resonance*. Vol 627. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2010:55-73. doi:10.1007/978-1-60761-670-2_3
88. Myszka DG. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit*. 1999;12:279–284
89. Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1983;21(11). doi:10.1515/cclm.1983.21.11.709
90. Passing H, Bablok W. Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1984;22(6). doi:10.1515/cclm.1984.22.6.431
91. Thoren KL, Pasi B, Delgado JC, Wu AHB, Lynch KL. Quantitation of Infliximab and Detection of Antidrug Antibodies in Serum by Use of Surface Plasmon Resonance. *Jrnl App Lab Med*. 2018;2(5):725-736. doi:10.1373/jalm.2017.024380

92. Beeg M, Burti C, Allocati E, et al. Surface plasmon resonance unveils important pitfalls of enzyme-linked immunoassay for the detection of anti-infliximab antibodies in patients' sera. *Sci Rep*. 2021;11(1):14976. doi:10.1038/s41598-021-94431-x
93. Immundiagnostik AG. IDKmonitor Infliximab total ADA ELISA. Arbeitsanleitung. 2020
94. Li J, Schantz A, Schwegler M, Shankar G. Detection of low-affinity anti-drug antibodies and improved drug tolerance in immunogenicity testing by Octet® biolayer interferometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;54(2):286-294. doi:10.1016/j.jpba.2010.08.022
95. Wadhwa M, Knezevic I, Kang HN, Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. *Biologicals*. 2015;43(5):298-306. doi:10.1016/j.biologicals.2015.06.004
96. Nemoz B, Ternant D, Bailly S, et al. New steps in infliximab therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel diseases. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(4):722-728. doi:10.1111/bcp.13845
97. Vande Casteele N, Gils A, Singh S, et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(6):962-971. doi:10.1038/ajg.2013.12
98. Grinman AB, de Souza M das GC, Bouskela E, Carvalho ATP, de Souza HSP. Clinical and laboratory markers associated with anti-TNF-alpha trough levels and anti-drug antibodies in patients with inflammatory bowel diseases: *Medicine*. 2020;99(10):e19359. doi:10.1097/MD.00000000000019359
99. Mc Gettigan N, Afridi AS, Harkin G, et al. The optimal management of anti-drug antibodies to infliximab and identification of anti-drug antibody values for clinical outcomes in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2021;36(6):1231-1241. doi:10.1007/s00384-021-03855-4
100. Roblin X, Marotte H, Leclerc M, et al. Combination of C-reactive Protein, Infliximab Trough Levels, and Stable but Not Transient Antibodies to Infliximab Are Associated With Loss of Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *ECCOJC*. 2015;9(7):525-531. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv061
101. Pugliese D, Guidi L, Privitera G, et al. Switching from IFX originator to biosimilar CT-P13 does not impact effectiveness, safety and immunogenicity in a large cohort of IBD patients. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2021;21(1):97-104. doi:10.1080/14712598.2020.1839045
102. Imbrechts M, Van Stappen T, Compennolle G, Tops S, Gils A. Anti-infliximab

antibodies: How to compare old and new data? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;177:112842. doi:10.1016/j.jpba.2019.112842

103. Herszényi K, Jókai H, Rencz F, Brodszky V, Nagy E, Holló P. Antidrug antibody formation during tumor necrosis factor α inhibitor treatment of severe psoriatic patients in the real-life practice. *pdia*. 2019;36(5):589-594. doi:10.5114/ada.2019.89507

104. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, et al. Trough Concentrations of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;148(7):1320-1329.e3. doi:10.1053/j.gastro.2015.02.031

105. Papamichael K, Cheifetz AS, Melmed GY, et al. Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(9):1655-1668.e3. doi:10.1016/j.cgh.2019.03.037

106. Kamperidis N, Middleton P, Tyrrell T, Stasinou I, Arebi N. Impact of therapeutic drug level monitoring on outcomes of patients with Crohn's disease treated with Infliximab: real world data from a retrospective single centre cohort study. *Frontline Gastroenterol*. 2019;10(4):330-336. doi:10.1136/flgastro-2018-101024

107. Filip B, Maja N, Severine V, et al. Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348:601-608

108. Fine S, Papamichael K, Cheifetz AS. Etiology and Management of Lack or Loss of Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*. 2019;15(12)

109. Reinhold I, Blümel S, Schreiner J, et al. Clinical Relevance of Anti-TNF Antibody Trough Levels and Anti-Drug Antibodies in Treating Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Intest Dis*. 2020:1-10. doi:10.1159/000511296

110. Papamichael K, Juncadella A, Wong D, et al. Proactive Therapeutic Drug Monitoring of Adalimumab Is Associated With Better Long-term Outcomes Compared With Standard of Care in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019;13(8):976-981. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz018

111. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2013;108.

112. Moots RJ, Xavier RM, Mok CC, et al. The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-

- interventional study. Nurmohamed M, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(4):e0175207.
doi:10.1371/journal.pone.0175207
113. Atiqi S, Hooijberg F, Loeff FC, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of TNF-Inhibitors. *Front Immunol*. 2020;11:312. doi:10.3389/fimmu.2020.00312
114. Vande Casteele N. The relationship between infliximab concentrations, antibodies to infliximab and disease activity in Crohn's disease. *Gut*. 2015;64.
115. Kennedy NA, Heap GA, Green HD, et al. Predictors of anti-TNF treatment failure in anti-TNF-naive patients with active luminal Crohn's disease: a prospective, multicentre, cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2019;4(5):341-353. doi:10.1016/S2468-1253(19)30012-3
116. Vulliemoz M, Brand S, Juillerat P, et al. TNF-Alpha Blockers in Inflammatory Bowel Diseases: Practical Recommendations and a User's Guide: An Update. *Digestion*. 2020;101(Suppl. 1):16-26. doi:10.1159/000506898
117. Dreesen E, Bossuyt P, Mulleman D, Gils A, Pascual-Salcedo D. Practical recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *CPAA*. 2017;Volume 9:101-111. doi:10.2147/CPAA.S138414
118. Papamichael K, Vajravelu RK, Vaughn BP, Osterman MT, Cheifetz AS. Proactive Infliximab Monitoring Following Reactive Testing is Associated With Better Clinical Outcomes Than Reactive Testing Alone in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2018;12(7):804-810. doi:10.1093/ecco-jcc/jjy039
119. Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J, Falck-Ytter Y, Singh S. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the Role of Therapeutic Drug Monitoring in the Management of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;153(3):835-857.e6. doi:10.1053/j.gastro.2017.07.031
120. Katz L, Gisbert JP, Manoogian B, et al. Doubling the infliximab dose versus halving the infusion intervals in Crohn's disease patients with loss of response: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(11):2026-2033. doi:10.1002/ibd.22902
121. Colombel JF, Adedokun OJ, Gasink C, et al. Combination Therapy With Infliximab and Azathioprine Improves Infliximab Pharmacokinetic Features and Efficacy: A Post Hoc Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(8):1525-1532.e1.
doi:10.1016/j.cgh.2018.09.033
122. Magro F, Afonso J, Lopes S, et al. Calprotectin and the Magnitude of Antibodies to Infliximab in Clinically-stable Ulcerative Colitis Patients are More Relevant Than Infliximab Trough Levels and Pharmacokinetics for Therapeutic Escalation. *EBioMedicine*. 2017;21:123-

130. doi:10.1016/j.ebiom.2017.06.004
123. Peyrin-Biroulet L, Fiorino G, Buisson A, Danese S. First-line therapy in adult Crohn's disease: who should receive anti-TNF agents? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):345-351. doi:10.1038/nrgastro.2013.31
124. Desai A, Zator ZA, de Silva P, et al. Older Age Is Associated with Higher Rate of Discontinuation of Anti-TNF Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013;19(2):309-315. doi:10.1002/ibd.23026
125. de Jong ME, Smits LJT, van Ruyven B, et al. Increased Discontinuation Rates of Anti-TNF Therapy in Elderly Inflammatory Bowel Disease Patients. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2020;14(7):888-895. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa012
126. Papamichael K, Chachu KA, Vajravelu R, et al. Improved Long-Term Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Disease Receiving Proactive Compared With Reactive Monitoring of Serum Concentrations of Infliximab. *ClinGastroenterolHepatol*. 2017;15(10):1580–1588.e3. doi:10.1016/j.cgh.2017.03.031
127. Fernandes SR, Bernardo S, Simões C, et al. Proactive Infliximab Drug Monitoring Is Superior to Conventional Management in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2020;26(2):263-270. doi:10.1093/ibd/izz131
128. Torres J, Bonovas S, Fiorino G. Proactive TDM for Crohn's Disease Patients in Clinical Remission Under Anti-TNF Treatment: Current State of Evidence. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2020;14(9):1338-1339. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa043
129. Vaughn BP, Martinez-Vazquez M, Patwardhan VR, Moss AC, Sandborn WJ, Cheifetz AS. Proactive Therapeutic Concentration Monitoring of Infliximab May Improve Outcomes for Patients with Inflammatory Bowel Disease: Results from a Pilot Observational Study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2014;20(11):1996-2003. doi:10.1097/MIB.000000000000156
130. Kelly OB, Donnell SO, Stempak JM, Steinhart AH, Silverberg MS. Therapeutic Drug Monitoring to Guide Infliximab Dose Adjustment is Associated with Better Endoscopic Outcomes than Clinical Decision Making Alone in Active Inflammatory Bowel Disease: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017;23(7):1202-1209. doi:10.1097/MIB.0000000000001126
131. D'Haens G, Vermeire S, Lambrecht G, et al. Increasing Infliximab Dose Based on Symptoms, Biomarkers, and Serum Drug Concentrations Does Not Increase Clinical, Endoscopic, and Corticosteroid-Free Remission in Patients With Active Luminal Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2018;154(5):1343-1351.e1. doi:10.1053/j.gastro.2018.01.004
132. Assa A, Matar M, Turner D, et al. Proactive Monitoring of Adalimumab Trough Concentration Associated With Increased Clinical Remission in Children With Crohn's Disease

- Compared With Reactive Monitoring. *Gastroenterology*. 2019;157(4):985-996.e2. doi:10.1053/j.gastro.2019.06.003
133. Steenholdt C, Al-khalaf M, Brynskov J, Bendtzen K, Thomsen Ole, Ainsworth MA. Clinical implications of variations in anti-infliximab antibody levels in patients with inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(12):2209-2217. doi:10.1002/ibd.22910
134. Roblin X, Marotte H, Leclerc M, et al. Combination of C-reactive Protein, Infliximab Trough Levels, and Stable but Not Transient Antibodies to Infliximab Are Associated With Loss of Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2015;525–53. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv061
135. Steenholdt C, Al-khalaf M, Brynskov J, Bendtzen K, Thomsen Ole, Ainsworth MA. Clinical implications of variations in anti-infliximab antibody levels in patients with inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(12):2209-2217. doi:10.1002/ibd.22910
136. Moss AC. Putting TDM knowledge into practice. *Frontline Gastroenterol*. 2019;10(4):327-327. doi:10.1136/flgastro-2018-101159
137. Nice R, Chanchlani N, Green H, et al. Validating the positivity thresholds of drug-tolerant anti-infliximab and anti-adalimumab antibody assays. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;00:1–10. doi: 10.1111/apt.16135
138. Lu J, Van Stappen T, Spasic D, et al. Fiber optic-SPR platform for fast and sensitive infliximab detection in serum of inflammatory bowel disease patients. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;79:173-179. doi:10.1016/j.bios.2015.11.087
139. Zeni L, Perri C, Cennamo N, et al. A portable optical-fibre-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of therapeutic antibodies in human serum. *Sci Rep*. 2020;10(1):11154. doi:10.1038/s41598-020-68050-x

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Accuracy, Genauigkeit
ADA	Anti-drug-Antibodies
ALM	Adalimumab
AP	Alkalische Phosphatase
ATI	Antibodies-to-Infliximab
ATI +	Antibodies-to-Infliximab positiv
ATI-H	Hohe Antibodies-to-Infliximab
ATI-L	Niedrige Antibodies-to-Infliximab
ATI-N	Keine Antibodies-to-Infliximab
AU	Arbitrary units
AZA	Azathioprin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CEP	Certulizumab pegol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonat
CRP	C-reaktives Protein
CT-Enterographie	Computertomographische-Enterographie
CU	Colitis ulcerosa
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ETN	Etanercept
EtOH	Ethanol
FC	Fäkales Calprotectin
GGT	Gamma-Glutaryltransferase
GOL	Golimumab
Gu-HCl	Guanidinhydrochlorid
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HMSA	Homogeneous mobility shift assay

hTf	Humanes Transferrin
HR	Hazard Ratio
IFX	Infliximab
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IQA	Interquartilsabstand
KRK	Kolorektale Karzinom
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LOR	Loss of response, sekundäres Therapieversagen
MC	Morbus Crohn
MgCl	Magnesiumchlorid
MR-Enterographie	Magnetresonanz-Enterographie
MTX	Methotrexat
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
P	Precision, Präzision
POC	Point of care
PR	Point Ratio
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RA	Rheumatoide Arthritis
RGA	Reporter Gene Assay
RIA	Radioimmunassay
ROC	Receiver Operating Curve
RU	Response Units
S _{ATI}	Steigung der ATI-Konzentration über die Zeit
SD	Standardabweichung
SPR	Surface Plasmon Resonance
TDIM	Therapeutisches Drug- und Immunogenitätsmonitoring
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TL	Trough Level, Talspiegel

TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
USK	Ustekinumab
VAK	Verstärkerantikörper
VLZ	Vedolizumab

8. Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter B. Luppä für die freundliche und zuverlässige Betreuung, die gute Kommunikation und die Unterstützung während der gesamten Dauer der Promotion.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Frau Melina Grasmeier, die mich sowohl bei der Arbeit im Labor als auch bei dem Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten stets unterstützt hat und mir bei jeder Frage weiterhelfen konnte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Luppä für die vielen Ratschläge und Diskussionen, sowie die stets lustige und familiäre Atmosphäre bedanken, die meine Laborzeit unvergesslich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt zudem meinem Vater Prof. Dr. Peter Langmann für seine Hilfe und sein Engagement und den stetigen wissenschaftlichen Austausch. Nur dank seiner Kooperation konnte ein großes Patientenkollektiv für die Studie etabliert werden.

An dieser Stelle möchte ich auch dem gesamten Team der gastroenterologischen Gemeinschaftspraxis in Karlstadt für die Mithilfe und Unterstützung bei der Probensammlung danken.

Mein Dank gilt ebenso dem medizinischen Labor Oldenburg für die Bereitstellung der TDIM-Bestimmungen und dem stets freundlichen Austausch.

Großer Dank gilt meiner Familie, die mich zu jeder Zeit bei der Dissertation unterstützt hat.