

**Herausforderungen bei der Quantifizierung
unterschiedlicher monoklonaler
Antikörperfraktionen gegen lösliche Antigene in der
präklinischen und klinischen Entwicklung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M.Sc. Armin Schröder
aus Lüneburg

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

21.09.2020

Stellvertretender Dekan:

Prof. Dr. József Fortágh

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Lämmerhofer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Harald Groß

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Monoklonale Antikörper als wichtige Gruppe der biologischen Wirkstoffe.....	1
1.2	Wirkung und Anwendung monoklonaler Antikörper.....	2
1.3	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	3
1.4	Struktur monoklonaler Antikörper	4
1.5	Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern.....	5
1.5.1	Typisches ELISA-Format zur Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern.....	5
1.5.2	MesoScale Discovery-Immunoassay.....	7
1.5.3	Gyrolab	8
1.5.4	Octet.....	9
1.6	Validierungsparameter für Messmethoden zur Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern	10
1.7	Herausforderungen bei der Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern.....	14
1.7.1	Interferenzen	14
1.7.2	Messung der freien Antikörperfraktion	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material	20
3	Methoden.....	24
3.1	Vorbereitung der Reagenzien	24
3.1.1	Kopplung von Biotin an IgG-Antikörper.....	24
3.1.2	Kopplung von Sulfo-Tag NHS-Ester.....	24
3.1.3	Kopplung von AlexaFluor 647	25
3.2	Biochemische Methoden	26
3.2.1	Kopplung von Antigen an magnetische Kügelchen.....	26
3.2.2	Kopplung von anti-human IgG an magnetische Kügelchen	26
3.2.3	Co-Immunpräzipitation.....	27
3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot der Eluate	28
3.2.5	Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie.....	29
3.3	ELISA-Methoden	30
3.3.1	Generischer ELISA.....	30
3.3.2	Antigen-Brücken ELISA zur Interferenztestung	31
3.3.3	Biomarker-Kit zur Messung des Vorläuferproteins.....	32
3.3.4	Sequenzieller ELISA zur Detektion von Antigen.....	32
3.3.5	Homogener ELISA zur Detektion von Antigen.....	33

3.3.6	Sequenzieller ELISA mit Substratkonversion	34
3.3.7	Antigen-Brücken ELISA zur Messung von freiem Antikörper	35
3.3.8	Antigen-Brücken Gyrolab zur Messung von freiem Antikörper	36
3.3.9	Antigen-Brücken Octet zur Messung von freiem Antikörper	37
3.3.10	Formel zur Berechnung der freien Antikörperfraktion	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Untersuchung interferierender Effekte bei der Quantifizierung eines monoklonalen Antikörpers in Cynomolgenplasma	39
4.1.1	Stabilität des interferierenden Effekts	39
4.1.2	Isolation potentiell interferierender Proteine	40
4.1.3	Detektion potentiell interferierender Proteine	42
4.1.4	Identifikation potentiell interferierender Proteine	45
4.1.5	Überprüfung identifizierter Proteine auf eine Interferenz im ELISA	46
4.2	Entwicklung einer Methode zur Messung eines Biomarkers in klinischen Proben	55
4.2.1	Zur Verfügung stehende Reagenzien und Methoden-Formate	56
4.2.2	Zu optimierende Bedingungen	62
4.2.3	Arbeitsbereich und Sensitivität	67
4.2.4	Potentielle Störeffekte	68
4.3	Methodenentwicklung für eine Methode zur Messung von freiem monoklonalem Antikörper	70
4.3.1	ELISA zur Messung von freiem Antikörper	71
4.3.2	Gyrolab zur Messung von freiem Antikörper	74
4.3.3	Octet zur Messung von freiem Antikörper	77
4.3.4	Octet Antigen-Fänger Format mit anti-human IgG Detektion	79
4.3.5	Bestimmung der Parameter für den Plattform-Vergleich, gezeigt anhand der ELISA-Methode	81
4.3.6	Plattform-Vergleich	83
5	Diskussion	85
5.1	Aufklären von Messinterferenzen während der Antikörper-Quantifizierung	85
5.1.1	Alternative Optionen zur Identifizierung interferierender Proteine	88
5.1.2	Reduzieren von Messinterferenzen während der Antikörper-Quantifizierung	90
5.2	Korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion	95
5.2.1	Eignung des ELISA-Formates für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion	96
5.2.2	Eignung der Gyrolab-Plattform für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion	98
5.2.3	Eignung der Octet-Plattform für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion	98

5.2.4 Alternativen zur Messung der freien Antikörper-Fraktion	99
5.2.5 Zukünftige Experimente	101
5.2.6 Fazit	101
6 Literaturverzeichnis.....	103
7 Anhang	114
7.1 Abbildungsverzeichnis	114
7.2 Tabellenverzeichnis	116
7.3 Abkürzungsverzeichnis	117
7.4 Danksagung	118

Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper als Untergruppe der Biologika machen den Großteil an neuen therapeutischen Proteinen aus (Kelley et al., 2013). Sie finden Anwendung in onkologischen Fragestellungen, Autoimmunerkrankungen, Herz-Kreislauf- und Infektionskrankheiten (Fischer et al., 2012). Auf dem Weg zur Marktreife ist es notwendig Studien an lebenden Organismen durchzuführen. Um die Pharmakokinetik mit der Pharmakodynamik zu verknüpfen und um eine sichere Testdosis für die erste Humanstudie abzuleiten, ist es essentiell, die Plasmakonzentration des therapeutischen Antikörpers im Zeitverlauf messen zu können. Dazu müssen entsprechende Methoden entwickelt und zudem validiert werden. Um die in biologischen Matrices enthaltenen monoklonalen Antikörper zu quantifizieren werden häufig sogenannte enzyme-linked-immunosorbentassays (ELISA) verwendet (Yang and Quarmby, 2011).

Es ist möglich, dass in Abhängigkeit vom ELISA-Format während der Messung unterschiedliche Interferenzen auftreten, die zu unerwarteten pharmakokinetischen Kurvenverläufen führen. Diese Interferenzen in pharmakokinetischen Messungen können im Verlauf eines Projektes zu einer Fehlinterpretation der Daten führen. Um eine Interferenz beim Nachweis eines neuen therapeutischen Antikörpers aus der pharmazeutischen Entwicklung aufzuklären, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Proteine im ELISA auf eine Interferenz getestet. Proteine, die für die Testung in Frage kamen, waren einerseits Proteine, die aus den Proben aufgereinigt und identifiziert wurden und andererseits Proteine, die eine Homologie zu dem im ELISA verwendeten Fängerprotein aufwiesen. Auch Proteine, die bekanntermaßen mit dem Fängerprotein interagieren können, wurden getestet.

Der freie, noch ungebundene Antikörper, kann pharmakologische Wirkungen entfalten und ist daher häufig Ziel von pharmakokinetischen Messungen. Die Schwierigkeit der korrekten Messung der freien Antikörperfraktion liegt darin, ein in der Probe vorherrschendes Gleichgewicht möglichst nicht zu beeinflussen; andernfalls würde man lediglich artifizielle, freie Analytkonzentrationen messen. Mess-Plattformen, auf denen eine geringere Verdünnung der Probe notwendig ist und geringere Inkubationszeiten ausreichen, könnten für die Entwicklung einer Messmethode zur Quantifizierung der freien Fraktion von Vorteil sein. In dieser sollte eine ELISA-Methode auf die Gyrolab-Plattform und die Octet Plattform übertragen werden. Zusätzlich zur Messung der freien Antikörperfraktion kann es sinnvoll sein, die Konzentration des im Plasma vorhandenen Antigens zu bestimmen. Für den Fall, dass das Antigen Aktivität aufweist, können die Daten einer solchen Messung dazu beitragen,

die Pharmakodynamik des therapeutischen Antikörpers zu charakterisieren. Für ein Projekt bei der Bayer AG wurde eine Methode zur Messung eines Antigens in klinischen Proben entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte das interferierende Protein letztendlich nicht eindeutig identifiziert werden. Es wurden Lösungsansätze diskutiert und vorgeschlagen, die in Zukunft für die Aufklärung des Effektes hilfreich sein könnten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Transfer eines ELISAs zur Messung der freien Antikörperfraktion, auf weitere Messplattformen grundsätzlich möglich ist. Für die korrekte Messung der freien Antikörperfraktion ist es sehr wertvoll, eine Messplattform wählen zu können, die das Bindungsgleichgewicht weniger beeinflusst als der Standard-ELISA. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Messung des Antigens in Plasma behandelter Probanden in Anwesenheit von therapeutischem Antikörper grundsätzlich möglich ist. Dies ist hilfreich, um die Pharmakodynamik des Antikörpers in klinischen Studien noch besser zu verstehen.

1 Einleitung

Die Geschichte der therapeutisch genutzten Antikörper geht zurück bis in das Jahr 1890. Schon zu dieser Zeit veröffentlichte Emil Adolf von Behring seine Arbeit zur Immunisierung von Tieren gegen Diphtherie und Tetanus (Behring, 1890). Er entdeckte zusammen mit seinem Kollegen, dass mit dem Übertragen des Serums erkrankter Tiere, die Eigenschaft, das Tetanus-Toxin zu zerstören, ebenfalls übertragen wurde. Mit dem Serum war es ihnen möglich, sowohl erkrankte als auch Tiere einer anderen Spezies zu heilen, wodurch der Grundstein für die Serumtherapie gelegt wurde. In den folgenden Jahren wurden Antikörper-Seren erfolgreich zur Behandlung von Diphtherie und Tetanus auch bei Kindern eingesetzt. Für seine Entdeckung sollte Emil von Behring einige Jahre später den ersten Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhalten. Der Begriff „Antikörper“ setzte sich erst einige Zeit später durch und wurde vor allem von Paul Ehrlich geprägt.

Antikörperseren bestehen aus einem Gemisch von Antikörpern. Um gezielt die Antikörper zu gewinnen, die spezifisch für ein Antigen sind, kann beispielsweise eine Affinitätsreinigung durchgeführt werden, bei der das Antigen auf einer Matrix immobilisiert wird (Winkelhake and Dennis, 1972). Nach der Aufreinigung erhält man Antikörper, die sich gegen unterschiedliche Epitope desselben Proteins richten. Sie werden auch polyklonale Antikörper genannt (Breedveld, 2000). 1975 gelang es Köhler und Milstein durch die Hybridom-Technik eine Myelomzelle (Krebszelle) mit einer Antikörper-produzierenden B-Zelle zu fusionieren (Kohler and Milstein, 1975). Somit entstand eine immortalisierte Zelle, die identische Antikörper sezerniert. Durch diese Technik war es erstmals möglich Antikörper in großen Mengen herzustellen, die einem einzigen Zellklon entstammen. Diese Antikörper werden auch monoklonale Antikörper genannt.

1.1 Monoklonale Antikörper als wichtige Gruppe der biologischen Wirkstoffe

Biologische Wirkstoffe sind in der Regel Substanzen (meist Proteine), die von lebenden Organismen hergestellt werden und therapeutische Anwendung finden. Die Anzahl der zugelassenen biologischen Wirkstoffe in Fünf-Jahres Zeiträumen seit 1995 betrug ca. 54-60. Diese Zahl hat sich allein im Zeitraum 2015-2018 auf 112 mehr als verdoppelt (Walsh, 2018). Monoklonale Antikörper machen einen Großteil dieser neuen therapeutischen Proteine aus. Für therapeutische Zwecke zugelassene Antikörper machen über 60 dieser Wirkstoffe aus. Mit ihnen wurden im Jahr 2016 weltweit

Einnahmen in Höhe von ca. 89 Milliarden Dollar generiert (Carter and Lazar, 2018). Da sie aus einem gemeinsamen Zellklon stammen, sind monoklonale Antikörper weitestgehend identisch. Dadurch sind gleichbleibende Eigenschaften wie Spezifität und Affinität gewährleistet. Diese Eigenschaften macht man sich für therapeutische und diagnostische Zwecke zunutze.

Die ersten therapeutisch genutzten monoklonalen Antikörper wurden 1986 gegen akute Organabstoßung eingesetzt (Zhou and Mascelli, 2011). Die Antikörper wurden in der Maus produziert und stellten für den menschlichen Körper ein fremdartiges Protein dar. Eine Verabreichung dieser Antikörper führte beim Menschen häufig zu einer Immunreaktion (Ritter and Ladyman, 1995). Da eine Immunantwort des menschlichen Körpers die Wirkung der murinen Antikörper durch die Bildung von anti-Maus Antikörpern beeinträchtigte, wurde versucht, die in der Maus produzierten Antikörper so zu verändern, dass sie den menschlichen Antikörpern ähnlicher sind (Kipriyanov and Little, 1999; Richards et al., 1999). Durch die Fortschritte in der Gentechnik ist es heutzutage möglich, humane monoklonale Antikörper zu synthetisieren, wodurch das Auftreten dieser Immunreaktionen reduziert wurde (Hwang and Foote, 2005).

1.2 Wirkung und Anwendung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper lassen sich, wie beschrieben, gerichtet gegen eine Vielzahl von Proteinen herstellen. Zudem verfügen sie über Halbwertszeiten von mehr als einer Woche, wodurch sie eine entsprechend anhaltende Wirkung haben (Carter and Lazar, 2018). Durch diese Eigenschaften eignen sie sich zur Nutzung als zielgerichtete Reagenzien, um spezifisch Proteine zu binden (Tang et al., 2004; Wang et al., 2008).

Viele monoklonale Antikörper werden subkutan oder intravenös verabreicht. Der Wirkmechanismus ist typischerweise die Blockade eines Rezeptors oder deren Liganden, Zelldepletion oder Verringerung der Rezeptoranzahl auf Zellmembranen (Chan and Carter, 2010). Außerdem können auch lösliche Proteine im Plasma gebunden (Kuang et al., 2010) und daraufhin antagonistische oder agonistische Effekte ausgelöst werden (Liu, 2018). Pharmakologische Effekte, die durch Bindung ausgelöst werden, sind unter anderem Induktion von Apoptose, Inhibition von Proliferation oder Beeinflussung von Angiogenese (Dostalek et al., 2013). Anwendung finden monoklonale Antikörper häufig in der Therapie im Bereich Onkologie, Autoimmunerkrankungen, Herz-Kreislauf- sowie Infektionskrankheiten (Fischer et al.,

2012). Auch Stoffwechsel- und respiratorische Erkrankungen werden mit monoklonalen Antikörpern behandelt (Zhou and Mascelli, 2011).

1.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern werden hauptsächlich zwei Verfahren verwendet: Einerseits können sie *in vivo* durch die Immunisierung eines Tieres hergestellt werden. Andererseits *in vitro* mittels Phagen-Display Technologie.

Für das *in vivo* Verfahren werden nach Immunisierung einer Maus mit einem Antigen B-Zellen aus der Milz entnommen und mittels Hybridomtechnik mit Myelomazellen fusioniert. Die Population mit der gewünschten Affinität und Spezifität wird selektiert. Anschließend erfolgt eine DNA-Sequenzierung und die Vermehrung der codierenden Sequenz. Anschließend kann die DNA in Zellen eingeführt werden. Dafür werden Säugetierzelllinien verwendet, um einen ordentlichen Aufbau und eine ordentliche Glykosylierung der produzierten Antikörper zu gewährleisten (Vaughan et al., 1998). Korrekte Glykosylierung ist wichtig für die Funktion des Antikörpers (Wright and Morrison, 1997). Zudem beeinflusst sie die Konformation des Antikörpers (Tao and Morrison, 1989). Häufig werden sogenannte CHO- (Chinese Hamster Ovary) oder NS0-Zellen (nicht-sekretierendes murines Myelom) verwendet (Chadd and Chamow, 2001; Roque et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit monoklonale Antikörper herzustellen ist der Phagen-Display. Um gezielt Antikörper mit gewünschter Spezifität herzustellen, werden Bakteriophagen verwendet. Diese tragen auf der Oberfläche unter anderem Fragmente von Antikörpern. In der Regel präsentiert ein Phage dabei jeweils Antikörperfragmente einer bestimmten Spezifität. Es können Sammlungen genutzt werden, die Phagen mit ca. 10^{10} unterschiedlichen Spezifitäten enthalten. Diese werden auch Bibliothek genannt. Im Inneren enthalten diese Phagen die für die Antikörper-Fragmente codierenden Sequenzen. So ist es möglich, Phagen zu selektieren, die mit ihren exprimierten Proteinen an das Antigen binden. Diese DNA kann sequenziert und anschließend zur Produktion des entsprechenden Antikörpers, wie bereits beschrieben, in Zellen eingeführt werden (Huls et al., 1999; Phizicky and Fields, 1995).

1.4 Struktur monoklonaler Antikörper

Die Struktur der Antikörper wurde Anfang der 1970er-Jahre von Porter und Edelman aufgeklärt. Beide erhielten dafür den Nobelpreis für Physiologie und Medizin (Edelman, 1973; Porter, 1973). Im Menschen gibt es verschiedene Unterklassen der Immunglobuline (Ig): A, D, E, G und M. Immunglobulin G (IgG) macht mit 70-80% den größten Anteil aller Immunglobuline aus (Martin, 1969; Waldmann and Strober, 1969). Abbildung 1 zeigt schematisch die Struktur eines IgG-Antikörpers.

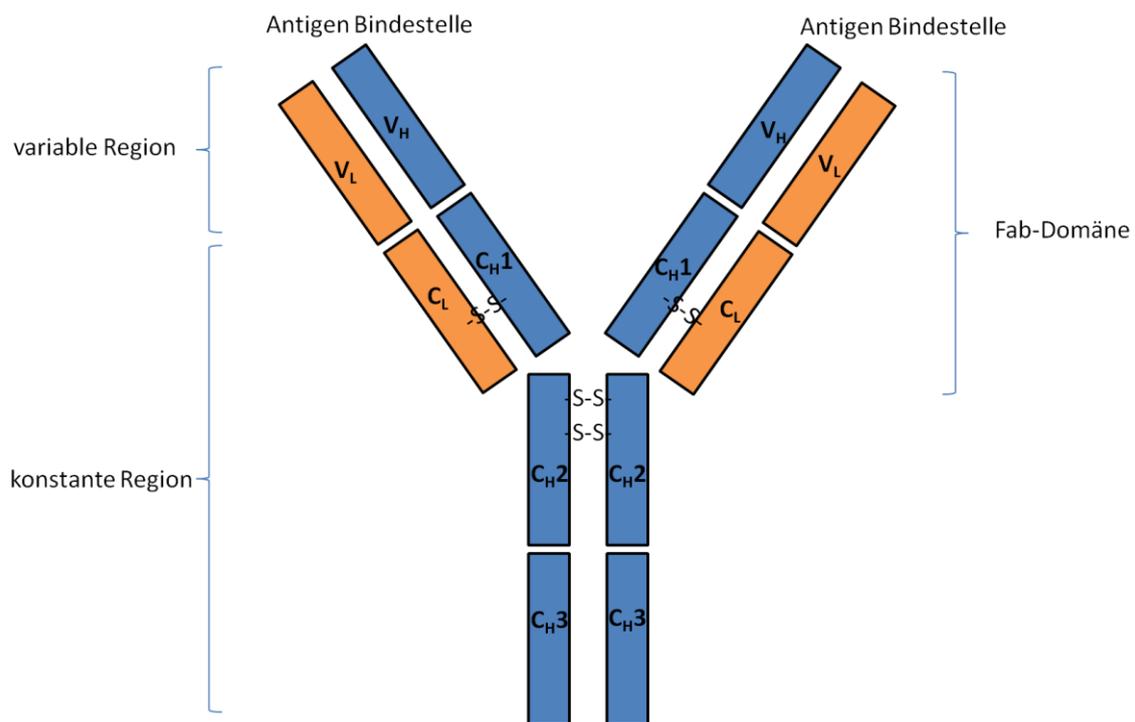


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.

In blau dargestellt sind die schweren Polypeptidketten. In orange dargestellt sind die leichten Polypeptidketten.

Der Antikörper besteht aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptid-Ketten. Die leichten Polypeptid-Ketten bestehen wiederum aus einer konstanten und einer variablen Domäne. Die schweren Polypeptid-Ketten bestehen aus drei konstanten und einer variablen Domäne. Eine Fab-Domäne (von engl. fragment antigen binding) setzt sich aus zwei variablen (V_L und V_H) und zwei konstanten (C_L und C_H) Teilen zusammen. Die variablen Regionen (V_L und V_H) können weiter in drei hypervariable Sequenzen eingeteilt werden (Janeway et al., 2001). Diese hypervariablen Sequenzen werden auch complementarity determining region (CDR) genannt. Über diese bindet ein Antikörper sein Antigen (Presta et al., 1993). Die Antigenbindestelle auf dem Antikörper wird Paratop, die entsprechende Bindestelle auf dem Antigen wird auch Epitop genannt (Greenspan and Di Cera, 1999). Ein Antikörper vom Typ IgG verfügt über 2 Bindestellen für ein Antigen.

1.5 Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern

Auf dem Weg zur Marktreife ist es notwendig die Antikörper hinsichtlich ihrer toxikologischen sowie pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu charakterisieren. Dazu werden beispielsweise Studien an Nagetieren und an Primaten durchgeführt und die Plasmakonzentration der Antikörper im Zeitverlauf quantifiziert. Ziel ist es mit Hilfe der erhobenen Daten unter anderem eine sichere Testdosis für die erste Humanstudie und darüber hinaus eine wirksame Dosis für den Menschen abzuleiten. Damit die spezifische Messung in komplexer Matrix, wie Plasma oder Serum gelingen kann, müssen entsprechende Messmethoden entwickelt und anschließend validiert werden. Um die in biologischen Matrices enthaltenen Antikörper zu quantifizieren, werden häufig sogenannte enzyme-linked-immunosorbent assays (ELISA) verwendet (Yang and Quarby, 2011). Sie haben sich in den vergangenen Jahren als präferierte Methode durchgesetzt, da sie über eine hohe Sensitivität verfügen, eine minimale Probenvorbereitung erforderlich ist und darüber hinaus hochdurchsatzfähig sowie preiswert sind (Kuang et al., 2010). Mit diesen Immunoassays werden Bindungsinteraktionen zwischen Proteinen indirekt über enzymatische Reaktionen gemessen. Die Quantifizierung der Antikörper erfolgt im ELISA durch Rückberechnung der Konzentrationen in den Proben mit Hilfe einer Kalibrierkurve, die aus Proben bekannter Analytkonzentrationen besteht. Da die Matrixzusammensetzung sehr komplex ist, werden die Proben vor der Analyse verdünnt, um das Auftreten unspezifischer Hintergrundsignale zu minimieren (Kelley and DeSilva, 2007). Im Gegensatz zu LC-MS Methoden finden im ELISA typischerweise keine weiteren Probenvorbereitungen, wie Extraktionen statt, wodurch sich eine gewisse Anfälligkeit für Interferenzen ergibt (Lee and Kelley, 2011). Je nach analytischer Fragestellung werden unterschiedliche ELISA-Formate verwendet. Im Folgenden ist ein ELISA-Format exemplarisch aufgeführt.

1.5.1 Typisches ELISA-Format zur Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern

Grundsätzlich wird in einem ELISA ein Fänger-molekül verwendet, um einen zu quantifizierenden Analyten aus der Probe zu binden. Das Fänger-molekül wird entweder direkt (durch Adsorption) oder indirekt zum Beispiel durch Biotin-Streptavidin Interaktion auf eine feste Phase immobilisiert. Der Analyt (der zu quantifizierende therapeutische Antikörper) in der Probe bindet das Fänger-molekül und wird anschließend über ein Detektionsmolekül nachgewiesen. Dafür ist das Detektionsmolekül typischerweise mit einem Enzym gekoppelt, welches ein Substrat

umsetzt. Diese Umsetzung kann photometrisch gemessen werden. Als Fängermolekül können Antikörper oder Antigene verwendet werden. Das Detektionsmolekül ist häufig ein gegen den Analyten gerichteter Antikörper. Es kann auch ein anti-Spezies Detektionsantikörper oder ein anti-Fc Antikörper verwendet werden. Der Detektionsantikörper kann direkt an ein Enzym gekoppelt sein oder es wird ein zweiter Detektionsantikörper verwendet, der den ersten binden kann. Mehrere dieser zweiten Detektionsantikörper können durch Bindung an den ersten Antikörper zur Signalverstärkung führen (Kuang et al., 2010). In Abbildung 2 ist der Aufbau eines typischen ELISA-Formates schematisch dargestellt.

Peroxidase oder alkalische Phosphatase als Enzyme am Detektionsantikörper verwendet. Peroxidase verfügt über ein geringes Molekulargewicht (~40 kDa) und verursacht selten sterische Hinderung, wenn es an einen Antikörper gekoppelt ist. Darüber hinaus ist es bei 4°C länger als sechs Monate stabil und kostengünstiger als die alkalische Phosphatase. Alkalische Phosphatase wird durch Chelatoren und nicht-organische Phosphate inaktiviert, wodurch es nicht in EDTA-Plasma Proben oder in Verbindung mit PBS-Pufferlösungen verwendet werden kann. Häufig verwendete Substrate für Peroxidase-Reaktionen sind Tetramethylbenzidin (TMB) und Azodiethylbenzthiazol (ABTS). TMB ist sehr sensitiv, wohingegen ABTS über einen großen Arbeitsbereich verfügt. Nach Umsetzung des Substrates erfolgt die Messung der Absorption. Zudem ist auch die Messung der Fluoreszenz sowie der Lumineszenz möglich. Fluoreszenzmessungen können sensitiver sein und den dynamischen Arbeitsbereich erweitern. Für die Reaktion mit Peroxidase wird zum Beispiel Hydroxyphenyllessigsäure zur Umsetzung zu einem fluorogenen Reaktionsprodukt verwendet (Gibbs and Kennebunk, 2011).

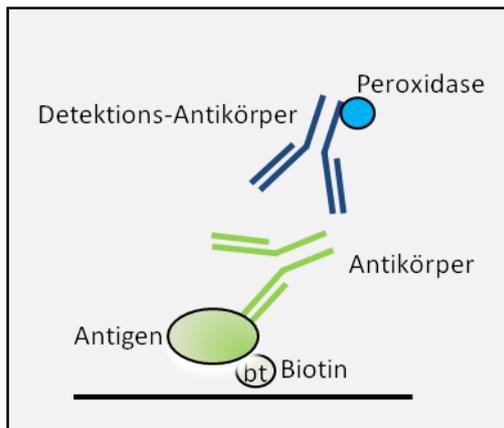


Abbildung 2: Beispiel für ein typisches ELISA-Format.

In diesem ELISA-Format wird biotinyliertes Antigen als Fängermolekül auf eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte gebunden. Der zu quantifizierende Analyt bindet an das Fängermolekül und wird anschließend durch einen Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper gebunden. Nach Substratzugabe wird dieses durch das Enzym umgesetzt. Je nach gewählter Enzym-Substrat Kombination sind unterschiedliche photometrische Messungen möglich. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgen typischerweise Waschschrte, um ungebundene Proteine zu entfernen.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten den ELISA durchzuführen:

Bei einem sequenziellen Vorgehen werden die einzelnen ELISA-Schritte nacheinander durchgeführt. Dabei wird die ELISA-Platte mit einem Protein beschichtet und anschließend unspezifische Bindestellen blockiert. Daraufhin folgen die Inkubation der verdünnten Proben und zum Schluss die Detektion. Zwischen den Schritten wird die Platte gewaschen, sodass ungebundene Proteine aus den Kavitäten der Platte entfernt werden. Bei einem semi-homogenen Vorgehen hingegen, werden einige Schritte des ELISA gleichzeitig durchgeführt. So kann beispielsweise die Probeninkubation zeitgleich mit der Inkubation der Detektionslösung erfolgen. Dieses Gemisch wird dann anschließend auf die ELISA-Platte gegeben, wodurch ein Inkubationsschritt entfällt.

1.5.2 MesoScale Discovery-Immunoassay

Die MSD-Technologie (MesoScale Discovery, USA) ist vergleichbar mit der ELISA-Technologie, allerdings wird hier Elektrochemilumineszenz zur Signalerzeugung verwendet und nicht eine Enzym-katalysierte Farbreaktion mit anschließender Messung der Absorption, Lumineszenz oder Fluoreszenz. Vorteile gegenüber dem ELISA können ein größerer Arbeitsbereich und eine erhöhte Sensitivität sein.

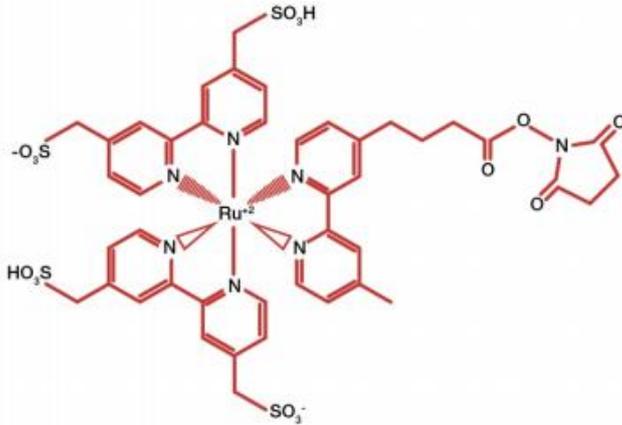


Abbildung 3: Sulfo-Tag™ NHS Ester.

Dargestellt ist die Strukturformel für den Sulfo-Tag™ NHS Ester (entnommen aus MSD Gold Sulfo-Tag NHS-Ester Kopplungs-Anweisung).

Für die Elektrochemilumineszenz ist es notwendig das Detektionsmolekül an einen Sulfo-Tag™ NHS Ester zu koppeln. Dieser emittiert Licht wenn er elektrochemisch angeregt wird (Marchese et al., 2009). Die Anregung wird durch in der Platte befindliche Elektroden ausgelöst. Diese induzieren eine duale Redoxreaktion mit Ruthenium und Tripropylamin, welches in den MSD-Puffern vorhanden ist (Deaver, 1995). Die Intensität des bei einer Wellenlänge von 620 nm emittierten Lichts wird zur Quantifizierung des Analyten herangezogen. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines MSD-Formates.

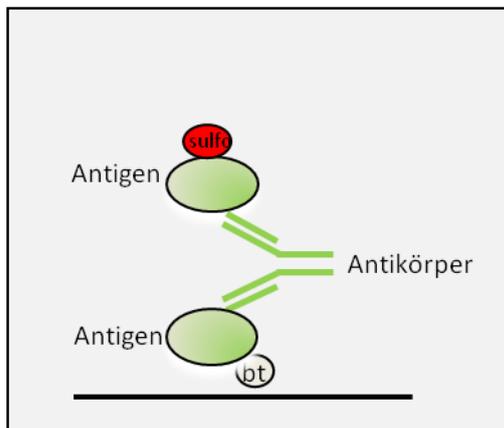


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines MSD-Methodenformates.

Eine 96-well Streptavidin-Platte wird nach erfolgter Blockierung und anschließendem Waschschrift mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach erneutem Waschschrift wird die Platte mit sulfo-Tag-gelabeltem Antigen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird MSD-Lesepuffer in die Kavitäten gegeben.

1.5.3 Gyrolab

Die Gyrolab-Plattform bietet die Möglichkeit, Immunoassays im Durchflussformat, mit sehr geringen Volumina, zu entwickeln. Im Gegensatz zum ELISA, in dem die Lösungen in den Kavitäten der ELISA-Platte inkubiert werden, findet im Gyrolab diese

Inkubation während des Durchflusses der Lösungen durch eine mikrofluidische CD statt, welche Kapillaren enthält.

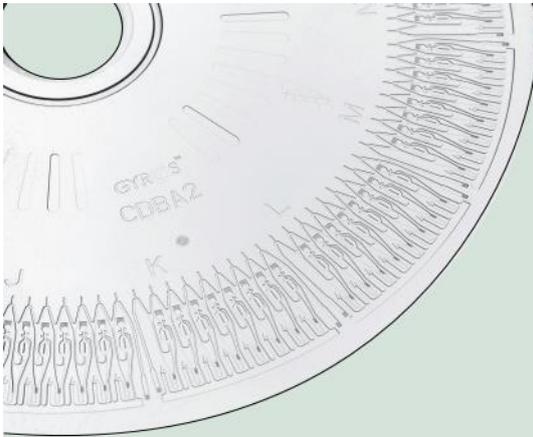


Abbildung 5: Ausschnitt einer Gyrolab-CD mit 3 Segmenten, mit jeweils 8 Mikrostrukturen (entnommen aus Mora et al., 2010).

Der Durchfluss kommt durch Rotation der CD zustande. Ein Ausschnitt einer solchen CD ist in Abbildung 5 dargestellt. Im Inneren der CD befinden sich Streptavidin-beschichtete Kügelchen. Ein biotinyliertes Fänger-Protein kann an diese Kügelchen gebunden werden. Im Unterschied zum ELISA erfolgt hier die Detektion mittels laser-induzierter Fluoreszenz. Dazu muss das Protein, welches zur Detektion verwendet wird, mit einem Fluorophor gekoppelt werden (Fraley et al., 2013). Ein typisches Format ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

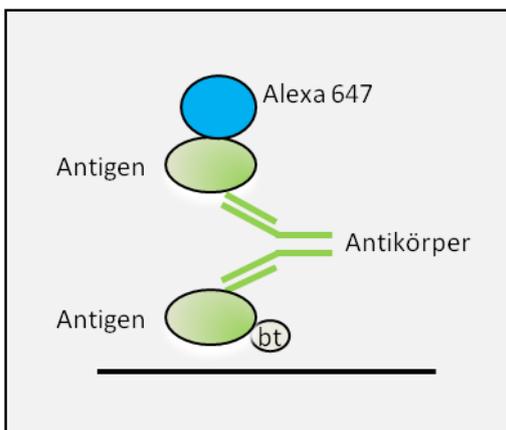


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Methoden-Formates auf der Gyrolab-Plattform.

Streptavidin-Kügelchen in der Bioaffy CD werden mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach einem weiteren Waschschrift wird die CD mit Fluorophor-gekoppeltem Antigen behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgt die Messung.

1.5.4 Octet

Auf der Octet-Plattform können Affinitäten, Kinetiken sowie Konzentrationen von Biomolekülen in Echtzeit bestimmt werden. Im Gegensatz zum ELISA, in dem die Lösungen in den Kavitäten der ELISA-Platte inkubiert werden, findet hier die Inkubation auf der Oberfläche einer beschichteten Glasnadel statt. In dieser Arbeit

wurden Streptavidin-beschichtete Nadeln verwendet. Das biotinylierte Fänger-Protein wird an diese Glasnadeln gebunden. Im Unterschied zum ELISA erfolgt die Detektion hier mittels Bio-Layer-Interferometrie. Dabei wird kontinuierlich weißes Licht durch das Innere der Glasnadeln gesendet, welches von der Referenzschicht an der Spitze der Glasnadel sowie von der Schicht der gebundenen Proteine wieder zurückreflektiert wird. Binden vermehrt Proteine an die Spitze der Glasnadel, verändert sich das Interferenzmuster, was in Echtzeit als Verschiebung der Wellenlänge gemessen werden kann (Schmitt et al., 1997). Durch diese Art der Messung muss das für die Detektion verwendete Protein, im Gegensatz zu ELISA und Gyrolab, nicht an weitere Proteine oder Fluorophore gekoppelt sein (Dysinger and King, 2012). Es könnte auch auf das Detektionsmolekül verzichtet werden, allerdings kann es zur Signalverstärkung beitragen. Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau eines Methoden-Formates.

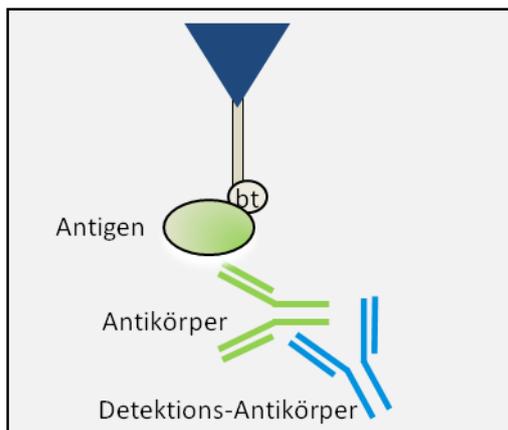


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Methoden-Formates auf der Octet-Plattform.

Streptavidin-beschichtete Glasnadeln werden nach erfolgter Blockierung und anschließendem Waschschrift mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation der Proben. Danach erfolgt die Inkubation mit Detektions-Antikörper. Die Messung mittels Bio-Layer-Interferometrie erfolgt in Echtzeit.

1.6 Validierungsparameter für Messmethoden zur Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern

Die entwickelten Messmethoden müssen reproduzierbare und korrekte Daten liefern. Eine Validierung der Methoden ist daher unabdingbar und zudem für GLP Studien vorgeschrieben. Im Folgenden sind einige wichtige Validierungsparameter aufgelistet und näher beschrieben. Es wurde sich in diesem Abschnitt an der Guideline bioanalytical method validation der Europäischen Arzneimittel-Agentur orientiert (European Medicines Agency, 2011). Während der Methodvalidierung werden die Studienproben durch Qualitätskontrollproben (QC-Proben) bekannter Konzentration imitiert. Diese QC-Proben werden gegen eine unabhängig hergestellte Kalibrierreihe, welche aus Proben bekannter Analytkonzentrationen bestehen, gemessen.

- Genauigkeit und Präzision
- Selektivität
- Verdünnungslinearität
- Spezifität
- Stabilität
- Parallelismus
- Wiederholungsmessung von Proben

Genauigkeit und Präzision

Die Genauigkeit einer Methode gibt an, wie nah der gemessene Wert am nominalen Wert liegt. Die Genauigkeit wird häufig als prozentuale Abweichung zum Nominalwert angegeben. Die intra-run Genauigkeit wird bestimmt, indem Replikate der hergestellten Proben analysiert werden. Fünf unterschiedliche Konzentrationen des Analyten werden vorbereitet, die den Arbeitsbereich der Methode abdecken. Pro Konzentrations-Level werden mindestens fünf Replikate analysiert. Die mittlere gemessene Konzentration sollte innerhalb von $\pm 20\%$ um den nominalen Wert schwanken. Für das untere Limit der Quantifizierung (LLOQ für Lower Limit of Quantification) und das obere Limit der Quantifizierung (ULOQ für Upper Limit of Quantification) wird eine Genauigkeit von $\pm 25\%$ zugelassen. Die inter-run Genauigkeit wird bestimmt, indem Proben von mindestens sechs Experimenten an zwei oder mehr unterschiedlichen Tagen gemessen werden. Die Präzision einer Methode beschreibt, wie sehr wiederholt gemessene Werte einer einzelnen Probe voneinander abweichen. Sie wird angegeben als Variationskoeffizient (CV: coefficient of variation). Der Wert für den Variationskoeffizienten sollte $\leq 25\%$ am LLOQ und am ULOQ liegen, für Proben in einem Konzentrationsbereich dazwischen bei $\leq 20\%$.

Selektivität

Die Messmatrix (Plasma) ist sehr komplex in der Zusammensetzung und kann von Tier zu Tier oder Mensch zu Mensch eine gewisse Variabilität aufweisen. Daher muss sichergestellt sein, dass die individuelle Matrixzusammensetzung keinen Einfluss auf die Messung hat (Liu et al., 2012). Um zu zeigen, dass die Messmethode den Antikörper in der relevanten Matrix selektiv messen kann, wird Plasma von zehn Individuen mit Analytkonzentrationen im Bereich des LLOQ und im hohen Konzentrationsbereich (HQC) hergestellt und analysiert. Da Probleme zumeist im unteren

Konzentrationsbereich auftreten, wird die Selektivität insbesondere am LLOQ bestimmt. Die Selektivität einer Methode ist dann akzeptiert, wenn die Messsignale für die individuelle Matrix eine Genauigkeit von $\pm 25\%$ vom nominalen Wert am LLOQ und $\pm 20\%$ im HQC aufweisen.

Verdünnungslinearität

Um zu zeigen, dass Proben oberhalb des Arbeitsbereiches der Messmethode über die minimal notwendige Verdünnung hinaus verdünnt werden können, ohne die Genauigkeit zu beeinflussen, werden Proben mit einer Konzentration oberhalb des Arbeitsbereiches hergestellt. Anschließend werden sie mit Plasma soweit verdünnt, dass sie Analytkonzentrationen aufweisen, welche im Arbeitsbereich liegen. Es werden mindestens drei verschiedene Verdünnungen getestet. Danach folgt die minimal notwendige Verdünnung in entsprechender Pufferlösung. Die rückberechneten Konzentrationen der individuellen Proben sollten sich innerhalb von $\pm 20\%$ um den Mittelwert der nominalen Konzentration befinden (Lee and Kelley, 2011). Darüber hinaus sollte die Präzision der finalen Konzentrationen aller Verdünnungen innerhalb von $\pm 20\%$ liegen. Weiterhin ist es möglich einen "Hook-Effekt" festzustellen. Das bedeutet, dass konzentrationsabhängig die Signale bis zu einem gewissen Punkt steigen, darüber hinaus aber wieder sinken. Dieser Effekt kommt häufig in homogenen Ansätzen vor, wenn die Analyt-Konzentration so hoch ist, dass die Menge an Detektionsmolekül nicht ausreicht, um jedes Analytmolekül zu binden. Je höher die Konzentration des Analyten im Verhältnis zur Detektionsmolekül-Konzentration, desto höher der Anteil an Analyt, der nicht an Detektionsmolekül gebunden ist. Gibt man den Reaktionsansatz dann auf eine mit Fängerprotein beschichtete Platte, dann besetzen viele der ungebundenen Analytmoleküle Bindestellen am Fängerprotein. Je mehr Fängerproteine auf diese Weise besetzt sind, desto geringer das gemessene Signal im Assay (Selby, 1999).

Spezifität

Die Spezifität einer Messmethode gibt an, ob der Analyt spezifisch in Anwesenheit von strukturell ähnlichen Komponenten (Ko-Medikation) in der Matrix gemessen werden kann. Für die Bestimmung der Spezifität wird Proben-Matrix mit strukturell ähnlichen Proteinen in steigender Konzentration versetzt. Am LLOQ und am ULOQ wird dann

die Genauigkeit bestimmt. Das Akzeptanzkriterium für die Spezifität liegt bei $\pm 25\%$ Genauigkeit für den Analyten.

Stabilität

Die Stabilität der Proben für die zu validierende Methode wird getestet, um sicherzugehen, dass sich der Umgang mit Proben (zum Beispiel Analyse und Lagerung) nicht auf die spätere Messung auswirkt. Allgemein sollten Bedingungen getestet werden, die für die zu analysierenden Proben nach der Methodvalidierung von Relevanz sind, also Lagerungsbedingungen die mindestens denen der Methode entsprechen.

Um die Stabilität zu testen, werden Stabilitätsproben im oberen und im unteren Arbeitsbereich der Methode hergestellt und unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert. Die Stabilität bei Raumtemperatur wird getestet, indem Proben für einige Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Um die Stabilität des Analyten gegenüber Auftau- und Einfrierzyklen zu testen, werden Proben für 24 h eingefroren und anschließend für 1 h aufgetaut. Dieser Zyklus wird mindestens dreimal wiederholt. Darüber hinaus wird die Langzeitstabilität der Proben im Tiefkühlschrank getestet. Das Stabilitätskriterium ist erfüllt, wenn die gemessene Konzentration der Proben nicht mehr als $\pm 20\%$ von der Nominalkonzentration abweicht.

Parallelismus

Sobald Studienproben vorhanden sind, sollte ein Test auf Parallelismus durchgeführt werden. Ähnlich wie beim Test auf Verdünnungslinearität wird hier eine Probe mit einer Konzentration oberhalb des Arbeitsbereichs mit Matrix in drei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Anschließend erfolgt die Verdünnung mit entsprechender Pufferlösung. Die Präzision zwischen Proben innerhalb einer Verdünnungsreihe sollte $\leq 30\%$ sein.

Wiederholungsmessung von Proben

Die während der Validierung verwendeten Kalibrier- und QC-Proben könnten sich gegenüber den Studienproben in Bezug auf Proteinbindung, Probeninhomogenität oder Ko-Medikation unterscheiden. Daher sollten Studienproben an unterschiedlichen Tagen

in unabhängigen Experimenten erneut gemessen werden. Bei einer Anzahl ≤ 1000 Proben, sollten 10 % (bei ≥ 1000 , 5 %) der Proben erneut analysiert werden. Die Differenz der gemessenen Konzentrationen sollte ≤ 20 % vom Mittelwert der Proben betragen. Dies sollte für mindestens 67 % der wiederholt gemessenen Proben der Fall sein.

1.7 Herausforderungen bei der Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern

1.7.1 Interferenzen

Die Quantifizierung der monoklonalen Antikörper findet in Plasma statt. Dieses stellt eine komplexe Matrix aus verschiedenen Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten und weiteren Bestandteilen dar (Gorovits et al., 2014). Die Komplexität der Matrix sowie möglicherweise inter-individuelle Unterschiede in ihrer Zusammensetzung, sind bei der Analytik eine Herausforderung. Kommt es durch eine Substanz in der Probe zu einer Veränderung des korrekten Messwertes für einen Analyten, spricht man von einer Interferenz. Diese kann sowohl Analyt-abhängig als auch Analyt-unabhängig sein. Im ersten Fall ist eine Messwertveränderung infolge eines direkten Effekts auf die Detektion des Analyten denkbar, im zweiten Fall können Messwerte selbst in Abwesenheit des Analyten auftreten (Kroll and Elin, 1994). Darüber hinaus können sie eingeteilt werden in: Interferenzen, welche zu einem erhöhten Signal führen und Interferenzen, die zu einem verringerten Signal führen (Schwickart et al., 2014).

Je nachdem welches ELISA-Format für die Quantifizierung verwendet wird, sind unterschiedliche Interferenzen möglich. In einem ELISA, in dem sich die Bindung von Reagenzien an den Fc-Teil eines zu quantifizierenden Antikörpers zunutze gemacht wird (generisches Format), könnten Substanzen in der Probe, welche ebenfalls den Fc-Teil binden, zu einer Interferenz führen. Beispiele hierfür sind Antikörper, welche gegen den zu quantifizierenden Antikörper gerichtet sind. Dies könnten anti-Tier Antikörper sein, die in einer Konzentration von mg/ml mehrere Jahre persistieren können. Eine besondere Art dieser Antikörper sind die sogenannten HAMAs (human anti-mouse Antibodies). Diese kommen mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 80 % in vielen Menschen vor (Kricka, 1999). Sie stören ELISA-Methoden, in denen Antikörper aus der Maus als Reagenzien verwendet werden (John et al., 1989). In einem Format, in dem die Bindestellen des Antikörpers (Paratop) frei (ungebunden) sein müssen, wäre eine Interferenz durch Substanzen denkbar welche diese Bindestelle besetzen. Beispiele hierfür können neutralisierende Antikörper sein, die in Folge der

Behandlung mit Antikörper gebildet werden können (Pratt, 2018; Weeraratne et al., 2011). Diese Antikörper gegen den therapeutischen monoklonalen Antikörper, werden auch ADAs (anti-drug antibody) genannt. Neutralisierende Antikörper sind eine spezielle Untergruppe der ADAs. Zusätzlich können Interferenzen auftreten, wenn sich die Konzentration bestimmter Matrixbestandteile infolge einer Behandlung mit therapeutischem Antikörper verändert. Bei Antikörpern gegen lösliche Proteine im Plasma könnten Variationen der Proteinkonzentration aufgrund inter-individueller Schwankungen die Messung stören (Lee and Kelley, 2011). Auch die Akkumulation von Antigen nach Behandlung mit therapeutischem Antikörper ist bekannt (Fischer et al., 2012) und kann zu Interferenzen führen (Talbot et al., 2015). Diese kann durch die vermehrte Freisetzung des Antigens nach Behandlung mit Antikörperzustand kommen (Gijbels et al., 1995; Wolbink et al., 2005) oder durch eine reduzierte Clearance nach Bindung an den therapeutischen Antikörper (Barrera et al., 2001; Casale et al., 1997; Gordon et al., 2001; Hamilton et al., 2005; Lachmann et al., 2009). So können interferierende Effekte auch durch das Antigen ausgelöst werden (Partridge et al., 2013).

Darüber hinaus gibt es weitere Proteine, die eine Interferenz auslösen können. Dazu gehören Lysozyme, die an Immunglobuline binden können (Selby, 1999), Paraproteine (funktionslose oder unvollständige Immunglobuline), die an verwendete Reagenzien binden können (Luzzi et al., 2003) und Komplementproteine, die an Immunglobuline binden können (Weber et al., 2011). Außerdem Rheumafaktor und heterophile anti-IgG Antikörper sowie Antikoagulantien und Proteasen (Findlay et al., 2000; Tate and Ward, 2004).

1.7.2 Messung der freien Antikörperfraktion

Bei therapeutischen Antikörpern, welche gegen ein lösliches Protein im Blut gerichtet sind, herrscht ein Gleichgewicht zwischen freien ungebundenen Antikörper, dem ungebundenen Antigen und dem Komplex aus Antikörper und Antigen (Fischer et al., 2012). Ist eine der beiden Bindestellen gebunden, könnte durch die zweite noch freie Bindestelle ein weiteres Antigen gebunden werden. Der Antikörper wird dann als partiell frei oder partiell ungebunden bezeichnet. Es können also gebundene, partiell gebundene/ partiell freie sowie freie Antikörper-Fractionen parallel existieren. Abbildung 8 zeigt die schematische Darstellung der unterschiedlichen Antikörperfraktionen in der Probe. Der freie/ partiell freie Antikörper, kann pharmakologische Wirkungen entfalten und ist daher häufig Ziel von

pharmakokinetischen Messungen (Lee et al., 2011). Typischerweise wird eine Methode für die Messung von freiem Antikörper im ELISA-Format entwickelt (Yang and Quarmby, 2011). In der Probe herrscht ein Bindungsgleichgewicht zwischen Antikörper und Antigen vor, welchem reversible Bindungen zugrunde liegen. Während der Analyse einer solchen Probe mittels ELISA, kann dieses dynamische Bindungsgleichgewicht durch eine Vielzahl von Faktoren verändert werden, welche nachfolgend näher beschrieben sind. Daher besteht die Schwierigkeit bei der korrekten Messung der freien Antikörperfraktion darin, ein in der Probe vorherrschendes Gleichgewicht möglichst nicht zu beeinflussen. Denn dann würden lediglich artifiziell, freie Antikörperkonzentrationen (durch Störung des Bindungsgleichgewichtes in der Probe) gemessen werden und nicht die tatsächlich freie Antikörper-Konzentrationen.

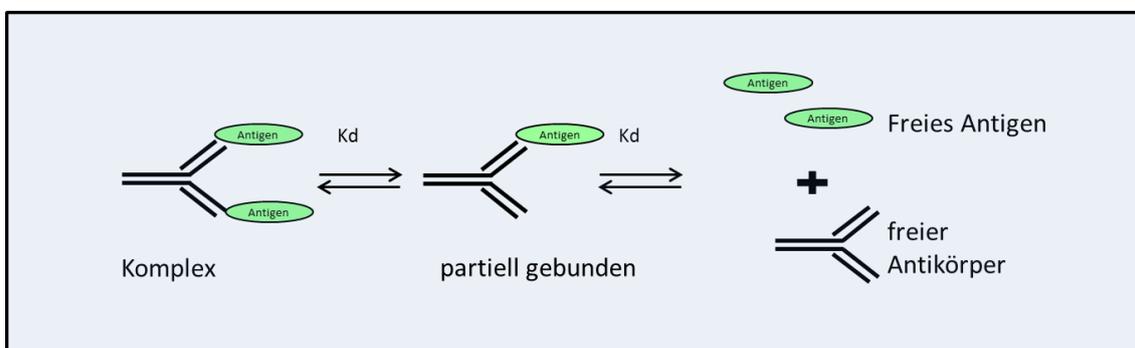


Abbildung 8: Schematische Darstellung des dynamischen Bindungsgleichgewichtes in der Probe.

In der Probe liegt der zu quantifizierende Antikörper gebunden an Antigen, teilweise gebunden und frei vor. Eine Methode zur Messung der freien Fraktion des Antikörpers in Plasma wird typischerweise im ELISA-Format entwickelt. Damit die freie Fraktion des Antikörpers korrekt quantifiziert werden kann, darf das Messprozedere das dynamische Bindungsgleichgewicht in der Probe nicht verändern.

Um die freie Fraktion des Antikörpers korrekt zu quantifizieren, reicht es daher nicht aus, ein geeignetes ELISA-Format zu wählen (Staack et al., 2012). Um Hintergrundsignale durch unspezifische Bindungen zu reduzieren, werden die Proben, wie bereits beschrieben, vor der Messung im ELISA verdünnt (Kelley and DeSilva, 2007). Die Probenverdünnung ist einer der Faktoren, die sich auf das dynamische Bindungsgleichgewicht auswirken. Eine höhere Verdünnung führt im dynamischen Bindungsgleichgewicht zwischen Antikörper und Antigen zu einer Verschiebung in Richtung Dissoziation. Dies ist abhängig von der Höhe der Verdünnung und der Affinität der Reagenzien (Staack et al., 2012). Die freie Fraktion des Analyten würde somit überschätzt werden.

Auch das Kalibrierkonzept hat einen Einfluss auf die korrekte Quantifizierung der freien Antikörperfraktion (Staack et al., 2012). Typischerweise werden Proben im ELISA relativ gegen eine Kalibrierkurve mit bekannten Analytkonzentrationen

quantifiziert. Die FDA fordert in ihrem Guidance-Dokument für bioanalytische Methodenvalidierung, dass Kalibrierproben in der Matrix hergestellt werden, die der Matrix der Studienproben entspricht (U.S. FDA, 2018). Für die Entwicklung einer Messmethode zur Quantifizierung der freien Antikörperfraktion ist dies allerdings nicht praktikabel, da in der Matrix enthaltenes lösliches Antigen an den zu quantifizierenden Antikörper bindet (Schick et al., 2016). Das Signal der Kalibrierproben kommt dann nicht durch die nominal eingesetzte Antikörper-Konzentration zustande, sondern durch die neue freie Fraktion des Antikörpers. Das Signal einer unbekanntenen Probe wird dann fälschlicherweise der nominal eingesetzten Konzentration zugeordnet. So kommt es zur Überschätzung der freien Fraktion (Staack et al., 2012). Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

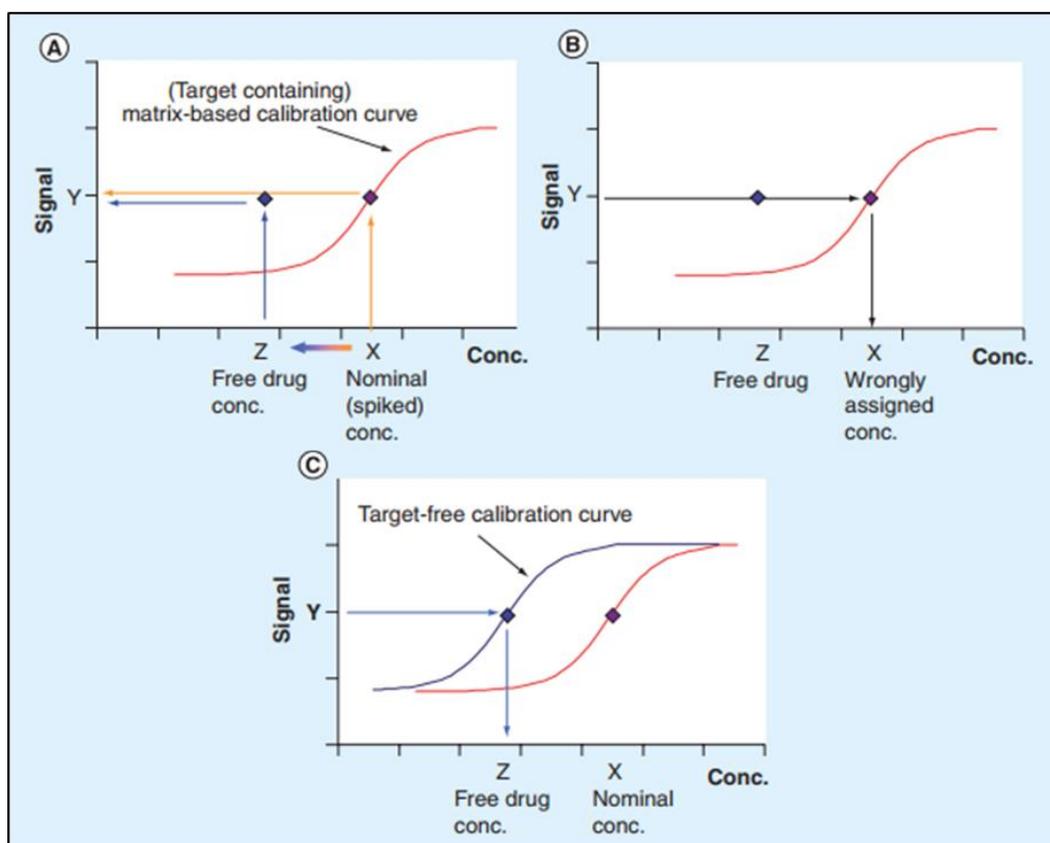


Abbildung 9: Darstellung der Überschätzung der freien Antikörperfraktion in einer Matrix, die Antigen (in der Grafik als Target bezeichnet) enthält.

In der Matrix enthaltenes Antigen bindet an den zu quantifizierenden Antikörper. Das Signal für die freie Antikörper-Konzentration kommt infolgedessen dann nicht mehr durch die nominal eingesetzte Antikörper-Konzentration zustande, sondern durch die neue freie Fraktion. Abbildung entnommen aus Staack et al., 2012.

Daher sollte entweder eine Surrogat-Matrix aus einer anderen Spezies verwendet werden oder eine Antigen-abgereicherte Matrix. Die abgereicherte Matrix wird von Schick und Kollegen empfohlen, da sie repräsentativ für die Matrix der Studienproben ist. Auch nach Auffassung weiterer Arbeitsgruppen sollte die Berechnung der Konzentrationen an freiem Analyten mittels Rückberechnung gegen eine

Kalibrationskurve in Matrix erfolgen, die kein Antigen enthält (Richards et al., 2016; Schick et al., 2016; Staack et al., 2014; Staack et al., 2012). Allerdings muss dafür gewährleistet sein, dass die Abreicherung vollständig und reproduzierbar durchzuführen ist (Schick et al., 2016).

Probenahme und Lagerung können das Gleichgewicht ebenfalls beeinflussen (Schwickart et al., 2014). Auch Inkubationszeiten und Vorbereitungszeiten können die zu messende freie Fraktion stark verändern. Bei Schick und Kollegen führte eine Zeit von über 10 min zwischen Probenverdünnung und Analyse zu einer massiven Überschätzung der freien Fraktion in den Proben (Schick et al., 2016). Reagenzien mit hoher Affinität gegenüber dem Analyten können mit der Bindung zwischen Analyt und Antigen konkurrieren und so das Gleichgewicht verändern (Hollevoet et al., 2014). Auch die Konzentration von Fängerprotein kann einen Einfluss ausüben (Cézé et al., 2009). Die Kombination aus Affinität der Reagenzien, Kinetik, Probeninkubationszeit und Plattform bestimmt die Fähigkeit einer Methode die freie Fraktion richtig zu messen (Talbot et al., 2015).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern können Interferenzen auftreten, die zu unerwarteten pharmakokinetischen Kurvenverläufen führen. Diese Interferenzen in pharmakokinetischen Messungen können im Verlauf eines Projektes zu einer Fehlinterpretation von Daten führen. Anhand einer Messmethode bei der Bayer AG, in der ein solches Problem aufgetreten ist, sollten Lösungsansätze entwickelt werden, um den interferierenden Effekt aufzuklären. So sollte gegebenenfalls ein generelles Prozedere abgeleitet werden, mit welchem in Zukunft Probleme dieser Art zügig aufgeklärt werden können.

Bei therapeutischen Antikörpern, welche gegen ein lösliches Protein im Blut gerichtet sind, herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem freien, ungebundenen Antikörper, dem zu bindenden Antigen und dem Komplex aus Antikörper und Antigen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine solche, bereits etablierte ELISA-Methode für die Messung eines freien Antikörpers auf weitere Messplattformen zu übertragen. Für die korrekte Quantifizierung ist es wichtig, dass das Bindungsgleichgewicht nicht während der Messung verändert wird. Daher sollten Plattformen verwendet werden, bei denen ein geringerer Einfluss auf das Bindungsgleichgewicht erwartet wird. Anschließend

sollte gezeigt werden, dass die freie Fraktion korrekt quantifiziert wird und der Transfer grundsätzlich möglich ist.

Zusätzlich zur Messung der freien Antikörperfraktion kann es sinnvoll sein, die Konzentration des im Plasma vorhandenen Antigens zu bestimmen. Für den Fall, dass das Antigen Aktivität aufweist, können die Daten einer solchen Messung dazu beitragen, die Pharmakodynamik des therapeutischen Antikörpers zu charakterisieren. Für ein internes Projekt sollte eine Methode zur Messung von klinischen Proben entwickelt werden. Die besondere Schwierigkeit der Messung liegt darin, dass die Konzentrationen des therapeutischen Antikörpers in den zu messenden Proben sehr hoch sind und Patientenplasma inter-individuelle Unterschiede in der Konzentration des Antigens aufweist. Zusätzlich wird die Messung dadurch erschwert, dass ein dem Antigen strukturell ähnliches Vorläuferprotein in einer vielfach höheren Konzentration im Vergleich zum Antigen ebenfalls in der Probe enthalten ist.

2 Material

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
0.2 mL PCR-Tubes	ThermoFisher Scientific, USA
96 Well pp, Mikroplatten, V-bottom, natürlich	Greiner, Deutschland
96-well ps, Mikroplatten F-bottom, kristall-klar	Greiner, Deutschland
Corning® 15 mL Zentrifugenröhrchen	Corning, USA
Corning® 50 mL Zentrifugenröhrchen	Corning, USA
Corning® Flasche 125 mL	Corning, USA
Corning® Mikroplatten Abdichtungsfolie	Corning, USA
Deionisiertes Wasser	Merck Millipore, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 mL - 2 mL	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf™ epTIPS™ Reloads, Pipettenspitzen	ThermoFisher Scientific, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, USA
EZ-Link® Sulfo-NHS Biotin	ThermoFisher Scientific, USA
GLO-Substrat	R & D systems, USA
humanes Sammelplasma	CoaChrom Diagnostica GmbH, Österreich
iBlot 2 Transfer Stacks, Nitrozellulose, mini	ThermoFisher Scientific, USA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, USA
Matrix™ uncodierte und alphanumerische Röhrchen	ThermoFisher Scientific, USA
MSD GOLD 96-well Streptavidin Platte	Mesoscale Discovery, USA
MSD GOLD sulfo-tag NHS-Ester	Mesoscale Discovery, USA
MSD MULTI-ARRAY® 96-well Plate, highbind	Mesoscale Discovery, USA
MSD MULTI-ARRAY® 96-well Plate, lowbind	Mesoscale Discovery, USA
MSD MULTI-ARRAY® 96-well Plate, midbind	Mesoscale Discovery, USA
Novagen Entwicklungsmappe	Merck Millipore, USA
Novex 12% Tris-Glycin Mini Gele, 10-well	ThermoFisher Scientific, USA
Parafilm M	American National Can, USA
Petrischale 100x100x20 mm	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland
Ragenzien Reservoir 15 mL	ThermoFisher Scientific, USA
SeeBlue Pre-stained Protein Standard	ThermoFisher Scientific, USA
SimplyBlue™ SafeStain	ThermoFisher Scientific, USA
TFPI depletiertes Affenplasma	Bayer AG, Deutschland
XI depletiertes Humanplasma	Haematologic Technologies, Inc., USA
Zeba Spin Entsalzungssäulchen, 2 mL, 40 kDa	ThermoFisher Scientific, USA
Zeba Spin Entsalzungssäulchen, 2 mL, 7 kDa	ThermoFisher Scientific, USA

Antikörper

Antikörper	Firma
Esel anti-Human IgG H+L, HRP-gekoppelt	Jackson immunoresearch
polyklonaler Ziege anti-Human IgG, preadsorbiert	Southern-Biotech
BAY-12-IgG Antikörper	Bayer AG, Deutschland
BAY-18-IgG Antikörper	Bayer AG, Deutschland
BAY-12-Fab Fragment	Bayer AG, Deutschland

- 10 mL	10 % Tween20
Blockierungspuffer:	PBS, pH 7.5 mit 2 % BSA
- 150 mL	PBS, pH 7.5
- 30 mL	10 % BSA
Assaypuffer:	PBS, pH 7.5 mit 0.5 % BSA
- 200 mL	PBS, pH 7.5
- 10 mL	10% BSA
Readpuffer:	MSD Read Buffer T 2x
- 20 mL	MSD Read Buffer T 4x
- 20 mL	Wasser (Millipore)

Geräte

Gerät	Firma
AT250 Waage	Mettler-Toledo International Inc., USA
Capit all	Tap Biosystems, UK
E1-ClipTip elektronische Mehrkanalpipette 12-Kanal	Eppendorf, Deutschland
E1-ClipTip elektronische Mehrkanalpipette 8-Kanal	Eppendorf, Deutschland
ELx405™ Select CW Microplate Washer	BioTek, USA
Forma Steri-Cult CO2 Inkubator	ThermoFisher Scientific, USA
GyroLab GW10098	Gyrolab Protein Technologies, Schweden Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
HeidolphReax 2 - Überkopfschüttler	ThermoFisher Scientific, USA
Hera Freeze HFU T Series Tiefkühlschrank	ThermoFisher Scientific, USA
iblot2	ThermoFisher Scientific, USA
iEMS, Incubator/Shaker	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Infinite M1000 multilabelreader	Tecan Group Ltd., Schweiz
Liebherr medline Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Liebherr Premium Gefrierschrank	Liebherr, Schweiz
MagnaRack Magnetic Separation Rack	ThermoFisher Scientific, USA
Milli-Q Advantage A10 pure water system	Millipore GmbH, Deutschland
NanoDrop2000c	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Novex Minicell	ThermoFisher Scientific, USA
OctetRed96	Moleculardevices, LLC., USA
PC500 Series Vacuubrand	Vacuubrand GmbH + Co KG, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo International Inc., USA
Pipetten: 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 50-200 µL, 100-1000 µL	Eppendorf, Deutschland
Pipetten: 20-200 µL, 500-5000µL, 1-10 mL	Eppendorf, Deutschland IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Schüttler Vortex 1	Deutschland
SECTOR Imager 6000	MesoScale Discovery, USA

Shaker, HS501D/VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Netzgerät für Gelelektrophorese	ThermoFisher Scientific, USA
Tecan Freedom Evo MCA 150, 96 channel system	Tecan Group Ltd., Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
Titramax 1000 (+Inkubator 1000)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5810/5810R	Eppendorf, Deutschland

Proteine

Proteine	Firma
Kallikrein	HaemochromDiagnostica
Präkallikrein	HaemochromDiagnostica
rekombinantes humanes TFPI	R&D Systems, USA
Rekombinantes Komplementfaktor-H verwandtes Protein 5	Bio-Techne, USA
Rekombinanter humaner Faktor XI	HTI/Cellsystems, Deutschland
Rekombinantes humanes Ficolin-2	R&D Systems, USA
Rekombinantes humanes CD42/GPIbalph	R&D Systems, USA
Heparin Natriumsalz	R&D Systems, USA
Rekombinanter humaner Faktor XIIa	MolecularInnovations, USA
Rekombinantes humanes Prothrombin	HTI/Cellsystems, Deutschland
Rekombinanter humaner Faktor IX	HTI/Cellsystems, Deutschland
Rekombinanter humaner Faktor XII	HTI/Cellsystems, Deutschland
Rekombinanter humaner Koagulationsfaktor II/Thrombin	R&D Systems, USA

Software

Software	Firma
CCW	Integ Laborsysteme, version 2.97
Octet Daten Aquisitions und Analyse Software	Moleculardevices, LLC., USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA
MSD Discovery Workbench 4.0	Mesoscale Discovery, USA
Gyrolab Evaluator Software	Gyrolab Protein Technologies, Schweden

3 Methoden

3.1 Vorbereitung der Reagenzien

3.1.1 Kopplung von Biotin an IgG-Antikörper

Das kovalente Verbinden von Proteinen mit Biotin erfolgt über einen Linkerarm des Biotins an eine reaktive NHS-Gruppe.

Vor der Kopplung wurde ein Pufferaustausch durchgeführt. Das zu koppelnde Protein sollte bei einem pH von 7.9 in einer Konzentration von 1 mg/ml vorliegen. Je nach Größe des Proteins sowie des Volumens der Lösung wurde die Säule (ZebaDesalt Spin Column) gewählt. Für Antikörper mit einer Größe von 150 kDa wurde eine Säule mit einem Molekulargewichts-Ausschluss von 40 kDa gewählt. Für Proteine mit einer Größe von 40 kDa hingegen eine Säule mit einem Molekulargewichts-Cutoff von 7 kDa. Die 2 ml Säule wurde zum Entfernen der Aufbewahrungslösung 2 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Lösung wurde verworfen und die Säule 3-mal mit je 1 ml Waschpuffer für 2 min gewaschen. Die Säule wurde in ein neues Gefäß gegeben und die Probe vorsichtig auf die Säule pipettiert. Danach wurde nach Zentrifugation für 2 min bei 1000 g das Volumen der Lösung bestimmt.

Erwärmen des Biotinreagenz (EZ-Link® Sulfo-NHS Biotin) auf Raumtemperatur. Kurz vor Verwendung wird eine 10 mM Biotin Lösung hergestellt. Dafür wird 224 µL Reinstwasser zu dem 1 mg Mikrotube gegeben und vorsichtig gemischt. Die Biotin-Lösung wird zu der Protein-Lösung (PBS-Puffer pH 7.9) gegeben, sodass Biotin in einem molaren Überschuss von 10x gegenüber dem Protein in dem Gemisch enthalten ist. Anschließend wird die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur, Dunkelheit und gelegentlichem vorsichtigen Schwenken inkubiert. Die Aufreinigung der Lösung erfolgt analog zum Pufferaustausch. Nach erfolgter Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit wird die biotinylierte Proteinlösung zur langfristigen Aufbewahrung mit 10 % BSA in PBS 50 zu 1 verdünnt, um eine Endkonzentration von 0.2 % BSA in der Lösung zu erreichen. Die Lösung wird aliquotiert und bei $< -65^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.2 Kopplung von Sulfo-Tag NHS-Ester

Für die Anwendung der MSD-Technologie (Elektrochemilumineszenz) ist es notwendig, dass das Detektionsprotein mit einem Elektrochemilumineszenz (ECL)-Tag (z.B. MSD Gold Sulfo-Tag NHS-Ester) gekoppelt wird. Dabei wird analog zur Biotinylierung auch hier ein Pufferaustausch durchgeführt. Direkt vor der Verwendung

wird der Sulfo-Tag NHS-Ester mit auf Eis gekühltem Wasser angelöst und gemischt. Die Lösung wird zu der Protein-Lösung (PBS-Puffer pH 7.9) gegeben, sodass ein molarer Überschuss von 20x gegenüber dem Protein im Gemisch enthalten ist. Anschließend wird die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur, Dunkelheit und gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Aufreinigung der Lösung erfolgt analog zum Pufferaustausch. Nach erfolgter Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit wird die Proteinlösung zur langfristigen Aufbewahrung mit 10 % BSA in PBS 50 zu 1 verdünnt, um eine Endkonzentration von 0.2 % BSA in der Lösung zu erreichen. Die Lösung wird aliquotiert und bei $< -65^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.3 Kopplung von AlexaFluor 647

Für die Anwendung der Gyrolab-Technologie ist es notwendig, das Detektionsprotein mit einem ALEXA-Fluorophor zu koppeln. Zu Beginn wird ein Pufferaustausch durchgeführt, damit das Protein in einem NaHCO_3 -Puffer (pH 7.9) vorliegt. Anschließend wird entsprechend den Herstellerangaben mit dem Kit Alexa Fluor®647 Protein Labeling Kit verfahren. Anschließend wird die Protein-Konzentration nach Lambert-Beer mittels Absorption bei 280 nm bestimmt. Für die Messung wird ein Aliquot der aufgereinigten, mit Alexa Fluor 647™ gelabelten Proteinlösung unverdünnt oder bei zu hohen OD-Werten mit PBS verdünnt bei 280 nm und bei 650 nm gemessen.

Zum Schluss wird die Kopplungsrate berechnet:

$$\frac{(A_{280} \text{ Konjugat} - 0.03 (A_{650})) * VF}{A_{280} \text{ Protein } 1\text{mg/ml}} = \text{mg Protein pro ml}$$

$$\frac{\text{mg Protein pro ml}}{\text{Protein MW}} = \text{mmol Protein pro ml}$$

$$\frac{A_{650} * VF}{\text{ProteinM}239000 * \text{mmolProteinproml}} = \text{Kopplungsrate}$$

A280 = Absorption des Proteinkonjugats bei 280 nm

A650 = Absorption des Proteinkonjugats bei 650 nm

0.03 (A650) = 0.03 * Absorption des Proteinkonjugats bei 650 nm

VF = Verdünnungsfaktor für das Proteinkonjugat

A280 Protein 1 mg/ml = Absorption einer Proteinlösung (1 mg/ml) bei 280 nm

239000 = Extinktionskoeffizient des AlexaFluor647™-Label

b = Schichtdicke der Küvette

Die Aufreinigung der Lösung erfolgt analog zum Pufferaustausch.

Die Proteinlösung wird zur langfristigen Aufbewahrung mit 10 % BSA in PBS 50 zu 1 verdünnt, um eine Endkonzentration von 0.2 % BSA in der Lösung zu erreichen. Die Lösung wird aliquotiert und bei $< -65^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Kopplung von Antigen an magnetische Kügelchen

Ein Glasvial mit 2 ml Kügelchen (dynabeads M-280 Streptavidin) wird für 30 secs gevortext. 0.5 ml der Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Waschlösung (PBS mit 0.1 % BSA) für 5 secs mittels Vortexer gemischt. Danach folgt die Trennung der Kügelchen von der Waschlösung auf einem magnetischen Eppendorf-Ständer für 1min. Der Überstand wird verworfen und das Eppendorfgefäß, welches die Kügelchen enthält, aus dem Eppendorf-Ständer genommen. Anschließend wurden die Resuspension mit 0.5 ml Waschlösung und die Inkubation mit Antigen durchgeführt. Dazu werden 8 μg biotinyliertes Antigen zu der Lösung gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine ordentliche Durchmischung zu gewährleisten, erfolgt die Inkubation in einem Überkopf-Schüttler. Anschließend erfolgt die Trennung der beschichteten Kügelchen auf einem magnetischen Eppendorf-Ständer. Nach 2 min haben sich die magnetischen Kügelchen an der Seitenwand des Eppendorf-Gefäßes angelagert und die Lösung kann vorsichtig abpipettiert und verworfen werden. Die Kügelchen werden in Waschlösung (PBS mit 0,1 % BSA) aufgenommen und für 10 Sekunden gevortext, um eine vollständige Durchmischung zu gewährleisten. Daraufhin wurde ein weiterer Trennungsschritt mit anschließendem Waschen durchgeführt. Insgesamt wird dieser Vorgang 4-mal durchgeführt. Die gewaschenen Kügelchen werden in 500 μL PBS mit 0.1 % BSA aufgenommen. Dadurch ergibt sich eine Konzentration von 10 mg/ml.

3.2.2 Kopplung von anti-human IgG an magnetische Kügelchen

Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, die Pufferzusammensetzung ist nicht angegeben. Die Kügelchen (DynabeadsM-270) werden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung von Kondenswasser nach dem Öffnen des Glasvials zu verhindern. Es werden 5 mg der Kügelchen abgewogen und mit 1 ml C1 Puffer versetzt. Anschließend wird die Lösung mittels Vortexer gemischt. Das Gefäß wird auf einen magnetischen Eppendorf-Ständer gestellt und der Überstand nach 2 min vorsichtig abpipettiert und verworfen. Es werden 58 μL anti-human Antikörper ($c = 5.8 \text{ mg/ml}$)

und 192 μL C1 Puffer zu den gewaschenen Kügelchen gegeben. Nach der Durchmischung mittels Vortexer werden 250 μL C2 Puffer hinzugefügt und die Lösung wird ein weiteres Mal gevortext. Es erfolgt die Inkubation auf dem Überkopfschüttler bei 37°C über Nacht. Dazu wurde ein 2 mL Eppendorfgefäß mit rundem Boden verwendet damit keine Flüssigkeit im Konus verbleibt und eine gute Durchmischung gewährleistet ist. Nach der Übernacht-Inkubation wird das Reaktionsgefäß auf dem magnetischen Eppendorfständer für 2 min inkubiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Es werden 800 μL HB Puffer mit 0.05 % Tween-20 versetzt und diese zu den beschichteten Kügelchen gegeben. Nach ordentlicher Durchmischung mittels Vortexer wird das Gefäß erneut für 2 min in den Eppendorf-Ständer gestellt und anschließend der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dieses Prozedere wird mit 800 μL LB Puffer (+ 0.05 % Tween-20) wiederholt. Danach folgen drei Waschschrte mit SB Puffer (ohne Tween-20). Anschließend wird ein weiterer Waschschrte mit SB Puffer durchgeführt, wobei für 15 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert wird. Nach Inkubation auf dem Eppendorf-Ständer und abpipettieren des Überstandes werden die gewaschenen Kügelchen in 100 μL SB Puffer pro 1 mg Kügelchen aufgenommen. Die finale Konzentration der Kügelchen beträgt demnach 10 mg/ml.

Die Kügelchen werden bei 2-8°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.3 Co-Immunpräzipitation

Die Proben werden 1:25 mit PBS (+ 0.05 % Tween-20) verdünnt und 200 μL der verdünnten Proben werden mit 200 μL Kügelchen versetzt. Es folgt eine Inkubation über Nacht bei 2-8°C im Überkopfschüttler. Am zweiten Tag werden die Kügelchen auf dem magnetischen Eppendorf-Ständer für 5 min inkubiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Die verbliebenen Kügelchen werden dreimal mit 1 ml PBS (+ 0.05 % Tween-20) gewaschen. Danach folgt die Elution der gebundenen Proteine. Für weiterführende Experimente wurde die eine Hälfte der Kügelchen für einen Elutionsansatz verwendet und die zweite Hälfte für einen zweiten Elutionsansatz. Für die Analyse des Eluats mittels SDS-PAGE wurden Kügelchen nach dem Waschen in 200 μL Lämmli-puffer aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde auf reduzierendes Agens im Puffer verzichtet, um die Fragmentierung des Beschichtungs-Antikörpers zu verhindern, welche im nachfolgenden SDS-GEL stören könnte. Die Kügelchen wurden vom Überstand mittels

Magnet getrennt und der Überstand wurde für 5 min bei 85°C inkubiert. Nach Abkühlen des Eluats auf Raumtemperatur wurden 30 µL in der SDS-PAGE eingesetzt.

Für die zweite Elution wurde die übrige Hälfte der Kügelchen in einer wässrigen Lösung aus 40 % Acetonitril und 1 % Ameisensäure aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Acetonitril mittels Stickstoffevaporation aus der Lösung entfernt. Zu der verbleibenden Eluatlösung wurden 50 µL PBS gegeben.

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot der Eluate

3.2.4.1 Detektion von Analyt

Die Proteine wurden von den Kügelchen eluiert, indem diese für 30 min in 200 µL Lämmli-puffer aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Dabei wurde auf reduzierendes Agens im Puffer verzichtet, um die Fragmentierung des anti-human Antikörpers auf den Kügelchen zu verhindern, welche im nachfolgenden SDS-GEL stören könnte. Die Kügelchen wurden mittels Magnet vom Überstand getrennt und der Überstand, in welchem sich die Proteine befinden, wurde für 5 min bei 85°C inkubiert. Nach Abkühlen des Eluats auf Raumtemperatur wurden 30 µL in der SDS-PAGE (12 %) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Semidry-Blot. Anschließend wurde die Membran für 5 min in Wasser gewaschen. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt in 5 % Milchpulver (in PBS-T). Die Inkubation des anti-human IgG Antikörpers mit einer Konzentration von 0.5 µg/ml in 1 % Milchpulver (in PBS-T) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppeltem anti-Spezies Antikörper in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in 1 % Milchpulver (in PBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 5 min, erfolgte die Inkubation mit ECL-Substrat. Die Peroxidaseaktivität wurde nach 5 min durch Detektion der Chemilumineszenz per Fotofilm visualisiert.

3.2.4.2 Vergleich zwischen Proben und Sammelplasma

Nach Verdünnung der Proteine in Laemmlipuffer, wurden unterschiedliche Konzentrationen dieser zusammen mit 1:50 verdünntem Sammelplasma und ausgewählten Proben mittels SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot. Dafür

wurde im iBLOT2 eine Spannung von 25 V für 25 min angelegt. Anschließend wurde die Membran für 5 min in Wasser gewaschen. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt in 5 % Milchpulver (in PBS-T). Die Inkubation des primären Antikörpers mit einer Konzentration von 0.5 µg/ml in 1 % Milchpulver (in PBS-T) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem anti-Spezies Antikörper in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in 1 % Milchpulver (in PBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 5 min, erfolgte die Inkubation mit ECL-Substrat. Die Peroxidaseaktivität wurde nach 5 min durch Detektion der Chemilumineszenz per Fotofilm visualisiert.

Zur Detektion von CFHR5 wurde ein polyklonaler anti-CFHR5 Antikörper aus der Ziege als primärer Antikörper verwendet. Zur Detektion von Ficolin-2 wurde ein polyklonaler anti-Ficolin-2 Antikörper aus der Ziege als primärer Antikörper verwendet. Zur Detektion von Vorläuferprotein wurde ein polyklonaler anti-Vorläuferprotein Antikörper aus der Ziege als primärer Antikörper verwendet.

Als sekundärer Antikörper wurde jeweils ein Peroxidase-gekoppelter anti-Ziege Antikörper verwendet.

3.2.5 Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

Die Flüssigchromatographie sowie die Massenspektrometrie wurden in der Bioanalytik von Bayer in Wuppertal durchgeführt.

Die verdauten Peptide wurden an einer Nano LC (Dionex Ultimate 3000) über eine Acclaim PepMap Säule (75 µm x 15 cm) aufgetrennt. Dazu wurden die Analyten zunächst drei Minuten lang mit einem Laufmittel bestehend aus 0.1 % TFA in Wasser auf eine C18 PepMap 100 Trapping Säule (300 µm x 5 mm) mit einer Flussrate von 20 µL/min gespült. Dafür wurde als Pumpe eine Dionex NCP-3200RS verwendet. Anschließend wurden die Peptide mit einem Gradientensystem bestehend aus 0.1 % HCOOH in Wasser (Puffer A) und 0.1 % HCOOH in Acetonitril (Puffer B) durch einen linearen Gradienten von 5-50 % über 40 Minuten mit einer Flussrate von 0.2 µL/min eluiert. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40°C. Das Injektionsvolumen betrug immer 2 µL.

Die massenspektrometrische Analyse wurde durchgeführt mit einem Triple TOF6600 (Sciex). Dabei wurde Elektrosprayionisierung in positiv ion polarity mode verwendet

und die Daten mittels information dependent acquisition aufgenommen. An der Quelle wurde eine Spannung von 2800 V angelegt, die Kapillartemperatur betrug 180°C und die Ionisationsspannung zur Fragmentierung betrug 10 V. Die Peptid Vorläufer wurden in einem Bereich von 230-2000 m/z mit einer Akkumulationszeit von 0.25 Sekunden und die Fragment-Ionen in einem Bereich von 400-1600 m/z mit einer Akkumulationszeit von 0.1 Sekunden detektiert. Detektierte Ionen wurden für 9 Sekunden exkludiert. Es wurde eine Iontoleranz von 50 ppm festgelegt.

Die Rohdaten wurden mittels Mascot Distiller vorbereitet und anschließend durch Mascot ausgewertet.

3.3 ELISA-Methoden

3.3.1 Generischer ELISA

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Chemilumineszenz-Auslesung auf dem Infinite M1000 (Tecan) gemessen. Ziegen anti-human IgG wird auf Platten mit hoher Bindekapazität gebunden, anschließend erfolgen die Bindung des Analyten und die Detektion mittels Peroxidase-gekoppeltem Esel anti-human IgG.

Ablauf

Eine 96-well Platte mit hoher Bindekapazität (Greiner) wird mit 100 µL/well Fängermolekül (Ziege anti-human IgG Southern-Biotech) in PBS (pH 7.8) über Nacht im Kühlschrank (2-8°C) inkubiert. Die Konzentration beträgt 0.4 µg/ml. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Anschließend folgen drei Waschschrte mit 300 µL/well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Danach wird die Platte mit 300 µL/well Block-Lösung (2 % BSA in PBS pH 7.8) bei 30 ± 3°C für 2 h ± 10 min im iEMS Inkubator erwärmt. Nach dem Blocken der Platte folgen 3 weitere Waschschrte. Die Qualitätskontrollproben, die Kalibrationsproben, sowie die unbekannt Proben werden 1:1000 mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 0.25 % BSA und 0.05 % Tween) verdünnt. Dazu werden 495 µL Assay Puffer zu 5 µL Probe hinzu pipettiert. In einem zweiten Schritt werden 270 µL Assay Puffer zu 30 µL der ersten Verdünnung hinzugefügt. Nach jedem Verdünnungsschritt wird mittels Pipettierroboter (Tecan) 27-mal mit mindestens 65 % des Volumens auf und ab pipettiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der verdünnten Proben. Dazu werden 100 µL auf die Platte übertragen und diese anschließend für 1 h ± 10 min bei

30°C ± 3°C im iEMS Inkubator inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wird die Platte zur Detektion des Analyten mit 100 µL/well Peroxidase-gekoppeltem Esel anti-human IgG in einer Konzentration von 0.032 µg/ml in Assay Puffer bei 30 ± 3°C für 1 h ± 10 min im iEMS Inkubator inkubiert. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Nach drei weiteren Waschschritten werden GLO-Substrat Lösung A und B für 10 min bei 14°C im Inkubator gekühlt, anschließend gemischt und 100 µL der Lösung auf die Platte pipettiert. Die Messung der Chemilumineszenz im Bereich von 400-700 nm mittels Infinite M1000 erfolgt sofort.

Auswertung

Als Regressionsmodell wurde eine 5-Parameter logistische Regression verwendet.

Methodenparameter

Arbeitsbereich LLOQ-ULOQ, [mg/L]:	2,5-100
Minimal notwendige Probenverdünnung (in Assaypuffer):	1:1000
Maximal validierte ProbenVorverdünnung (in Matrix):	30
Maximalanalysierbare Konzentration [mg/L]:	3000

3.3.2 Antigen-Brücken ELISA zur Interferenztestung

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Elektrochemilumineszenz-Auslesung auf dem Sector Imager 6000 (MesoScale Discovery) gemessen. Biotinyliertes humanes Antigen wird auf Streptavidin-Platten gebunden, anschließend erfolgen die Bindung des Analyten und die Detektion mittels sulfo-gelabeltem humanen Antigen.

Ablauf

Eine 96-well Streptavidin Gold Platte von MSD wird mit 2 % BSA in PBS (pH 7.8) mit 300µL/well im iEMS Inkubator bei 30 ± 3°C für 1 h ± 10 min blockiert. Anschließend folgen drei Waschschriffe mit 300 µL/well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Daraufhin wird die Inkubation mit 50 µL/well biotinyliertem Target in Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 0.5 % BSA) bei 30 ± 3°C für 1 h ± 10 min im iEMS Inkubator durchgeführt. Die Konzentration des Antigens in Lösung beträgt 1 µg/ml. Diese Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Nach Inkubation mit biotinyliertem Antigen wird die Platte erneut dreimal gewaschen. Die Qualitätskontrollproben, die Kalibrationsproben, sowie die unbekannt Proben

werden 1:50 mit Assay Puffer verdünnt (10 μL sample + 90 μL Assay Puffer und in einem zweiten Schritt 60 μL der ersten Verdünnung + 240 Assay Puffer). Nach jedem Verdünnungsschritt wird mittels Tecan 96 Pipettierroboter 27-mal mit mindestens 65 % des Volumens auf und ab pipettiert. Es folgen drei weitere Waschschriffe. Zur Detektion des Analyten wird die Platte mit 50 μL /well sulfo-gelabeltem Antigen in einer Konzentration von 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Assay Puffer bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator inkubiert. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Nach drei weiteren Waschschriffen werden 150 μL /well 2x Read Buffer T (hergestellt aus 4x Konzentrat 1:1 verdünnt mit MilliPore Wasser) auf die Platte pipettiert. Die Messung mittels Sector Imager 6000 erfolgt sofort.

Auswertung

Als Regressionsmodell wurde eine 5-Parameter logistische Regression verwendet.

Methodenparameter

Arbeitsbereich LLOQ-ULOQ, [mg/L]:	5-1000
Minimal notwendige Probenverdünnung (in Assaypuffer):	50
Maximal validierte Proben Vorverdünnung (in Matrix):	10
Maximalanalysierbare Konzentration [mg/L]:	10000

3.3.3 Biomarker-Kit zur Messung des Vorläuferproteins

Die Kavitäten des Visulize Antigen-Kits sind bereits mit polyklonalem anti-human Antigen Antikörper beschichtet. Verdünnte Plasmaproben werden in die Kavitäten gegeben und enthaltenes Antigen bindet an die Fänger-Antikörper. Nach dem Waschen der Platte wird Peroxidase-gekoppelter Detektionsantikörper hinzugefügt. Nach einem weiteren Waschschriff wird Tetramethylbenzidin als Substrat für die Peroxidasereaktion für eine bestimmte Zeit inkubiert. Nach stoppen der Reaktion mit Säure wird die Platte spektrophotometrisch analysiert. Dazu wird die Absorption bei 450 nm gemessen. Diese ist direkt proportional zu der Menge des gebundenen Antigens. Die Konzentration des Antigens wird relativ gegen eine Kalibrierkurve mit bekannten Antigen-Konzentrationen ermittelt.

3.3.4 Sequenzieller ELISA zur Detektion von Antigen

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Chemilumineszenz-Auslesung auf dem Infinite M1000 (Tecan) gemessen. BAY-18-

Fab wird auf Platten mit hoher Bindekapazität gebunden, anschließend erfolgen die Bindung des Analyten und die Detektion mittels biotinyliertem Inhibitor und Streptavidin-gekoppelter Peroxidase.

Ablauf

Eine 96-well Platte mit hoher Bindekapazität (Greiner) wird mit 100 µL/well Fänger-Antikörper (BAY-18-Fab) in PBS (pH 7.8) über Nacht im Kühlschrank (2-8°C) inkubiert. Die Konzentration beträgt 10 µg/ml. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung hergestellt. Anschließend folgen drei Waschschrte mit 300 µL/well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Danach wird die Platte mit 300 µL/well Block-Lösung (3 % BSA in PBS pH 7.8) bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator erwärmt. Nach dem Blocken der Platte folgen 3 weitere Waschschrte. Die Proben werden 1:100 mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 0.5 % BSA) verdünnt. Dazu werden 90 µL Assay Puffer zu 10 µL Probe pipettiert. In einem zweiten Schritt werden 225 µL Assay Puffer zu 25 µL der ersten Verdünnung hinzugefügt. Nach jedem Verdünnungsschritt wird mittels Pipettierroboter (Tecan) 27-mal mit mindestens 65% des Volumens auf und ab pipettiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der verdünnten Proben. Dazu werden 100 µL auf die Platte übertragen und diese anschließend für $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ bei $30^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ im iEMS Inkubator inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten wird die Platte zur Detektion des Analyten mit 100 µL/well biotinylierten Inhibitor in einer Konzentration von 450 nM in Assay Puffer bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator inkubiert. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Nach drei weiteren Waschschrten erfolgt die Inkubation Streptavidin-HRP 1:1000 verdünnt in Assay Puffer für 1 h bei 30°C im iEMS Inkubator. Nach 50 min werden GLO-Substrat Lösung A und B für 10min bei 14°C im Inkubator gekühlt, anschließend gemischt und 100 µL der Lösung auf die Platte pipettiert. Die Messung der Chemilumineszenz im Bereich von 400-700 nm mittels Infinite M1000 erfolgt nach 10 min.

3.3.5 Homogener ELISA zur Detektion von Antigen

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer und biotinyliertem Inhibitor, werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Chemilumineszenz-Auslesung auf dem Infinite M1000 (Tecan) gemessen. BAY-18-Fab wird auf Platten mit hoher Bindekapazität gebunden. Ein Gemisch aus Probe und Inhibitor wird nach Inkubation auf die

beschichtete Platte gegeben. Anschließend erfolgt die Detektion Streptavidin-gekoppelter Peroxidase.

Ablauf

Eine 96-well Platte mit hoher Bindekapazität (Greiner) wird mit 100 μL /well Fänger-Antikörper (BAY-18-Fab) in PBS (pH 7.8) über Nacht im Kühlschrank ($2-8^\circ\text{C}$) inkubiert. Die Konzentration beträgt 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung hergestellt. Anschließend folgen drei Waschschrte mit 300 μL /well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Danach wird die Platte mit 300 μL /well Block-Lösung (3 % BSA in PBS pH 7.8) bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator erwärmt. Nach dem Blocken der Platte folgen 3 weitere Waschschrte. Die Proben werden 1:10 mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 0.5% BSA) verdünnt. Dazu werden 90 μL Assay Puffer zu 10 μL Probe pipettiert. In einem zweiten Schritt werden 50 μL biotinylierter Inhibitor (900 nM) in Assay Puffer zu 50 μL der ersten Verdünnung hinzugefügt. Die Durchmischung erfolgte mit Hilfe des Pipettierroboters (Tecan). Es wurde 27-mal mit mindestens 65 % des Volumens auf und ab pipettiert. Anschließend wurde der Mix für 2 h bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden 100 μL des Gemisches auf die Platte übertragen und diese anschließend im iEMS Inkubator inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten wird die Platte zur Detektion des Analyten mit 100 μL /well Streptavidin-gekoppelter Peroxidase (1:1000 verdünnt) in Assay Puffer für 1 h bei 30°C im iEMS Inkubator inkubiert. Nach 50 min werden GLO-Substrat Lösung A und B für 10 min bei 14°C im Inkubator gekühlt, anschließend gemischt und 100 μL der Lösung auf die Platte pipettiert. Die Messung der Chemilumineszenz im Bereich von 400-700 nm mittels Infinite M1000 erfolgt nach 10 min.

3.3.6 Sequenzieller ELISA mit Substratkonversion

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Fluoreszenz-Auslesung auf dem Infinite M1000 (Tecan) gemessen. BAY-18-IgG wird auf Platten mit hoher Bindekapazität gebunden, anschließend erfolgen die Bindung des Analyten und die Detektion mittels Fluoreszenz-Messung des Substrates.

Ablauf

Eine 96-well Platte mit hoher Bindekapazität (Greiner) wird mit 100 μL /well Fänger-Antikörper (BAY-18-IgG) in PBS (pH 7.8) über Nacht im Kühlschrank ($2-8^\circ\text{C}$) inkubiert. Die Konzentration beträgt 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Arbeitslösung wird aus einer

Stammlösung durch entsprechende Verdünnung hergestellt. Anschließend folgen drei Waschschrte mit 300 μL /well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Danach wird die Platte mit 300 μL /well Block-Lösung (3 % BSA in PBS pH 7.8) bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator erwärmt. Nach dem Blocken der Platte folgen 3 weitere Waschschrte. Die Proben werden 1:20 mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 0.5 % BSA) verdünnt. Dazu werden 90 μL Assay Puffer zu 10 μL Probe pipettiert. In einem zweiten Schritt werden 60 μL Assay Puffer zu 60 μL der ersten Verdünnung hinzugefügt. Nach jedem Verdünnungsschritt wird mittels Pipettierroboter (Tecan) 27-mal mit mindestens 65 % des Volumens auf und ab pipettiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der verdünnten Proben. Dazu werden 100 μL auf die Platte übertragen und diese anschließend für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ bei $30^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ im iEMS Inkubator inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten wird die Platte zur Detektion des Analyten mit 100 μL /well I-1575 in einer Konzentration von 500 μM in Assay Puffer unterschiedlicher pH-Werte bei $30 \pm 3^\circ\text{C}$ für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ im iEMS Inkubator inkubiert. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer unterschiedlicher pH-Werte hergestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach Anregung bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emmissionswellenlänge von 465 nm.

3.3.7 Antigen-Brücken ELISA zur Messung von freiem Antikörper

Prinzip

Nach Verdünnung der Proben mit Puffer werden diese mittels Ligand-Bindungs-Assay mit Elektrochemilumineszenz-Auslesung auf dem Sector Imager 6000 (MesoScale Discovery) gemessen. Biotinyliertes Antigen wird auf Streptavidin-Platten gebunden, anschließend erfolgen die Bindung des Analyten und die Detektion mittels sulfo-Tag NHS-Ester gekoppelten Antigen.

Ablauf

Eine 96-well Streptavidin Gold Platte von MSD wird mit Blockierlösung (5 % BSA in PBS pH 7.8) mit 150 μL /well für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 300-400 rpm inkubiert. Anschließend folgen drei Waschschrte mit 300 μL /well PBS (pH 7.8 mit 0.05 % Tween). Es folgt die Inkubation mit 40 μL /well biotinyliertem Antigen in Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 1 % BSA) bei Raumtemperatur für $1 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ auf einem Schüttler mit 300-400 rpm. Die Konzentration des Antigens in Lösung beträgt 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 1% BSA) hergestellt. Nach Inkubation mit biotinyliertem Antigen wird die Platte erneut dreimal gewaschen.

Die Qualitätskontrollproben, die Kalibrationsproben, sowie die unbekanntes Proben werden 1:50 mit Assay Puffer verdünnt (10 µL Probe + 90 µL Assay Puffer und in einem zweiten Schritt 60 µL der ersten Verdünnung + 240 µL Assay Puffer). Nach jedem Verdünnungsschritt wird mittels Tecan 96 Pipettierroboter 27-mal mit mindestens 65 % des Volumens auf und ab pipettiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der verdünnten Proben. Dazu werden 25 µL auf die Platte übertragen und diese anschließend für 1 h ± 10min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 300-400rpm inkubiert. Es folgen drei weitere Waschschrte. Zur Detektion des Analyten wird die Platte mit 25 µL/well sulfo-Tag NHS-Ester gekoppelten Antigen in einer Konzentration von 0.1 µg/ml in Assay Puffer bei Raumtemperatur für 1 h ± 10 min inkubiert. Die Arbeitslösung wird aus einer Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit Assay Puffer hergestellt. Nach drei weiteren Waschschrten werden 150 µL/well 2x Read Buffer T (hergestellt aus 4x Konzentrat 1:1 verdünnt mit MilliPore Wasser) auf die Platte pipettiert. Die Messung mittels Sector Imager 6000 erfolgt sofort.

Auswertung

Als Regressionsmodell wurde quadratische Regression verwendet.

Methodenparameter

Arbeitsbereich LLOQ-ULOQ, [mg/L]:	39-10000
Minimal notwendige Probenverdünnung (in Assaypuffer):	50

3.3.8 Antigen-Brücken Gyrolab zur Messung von freiem Antikörper

Die Qualitätskontrollproben, die Kalibrationsproben sowie die unbekanntes Proben wurden 1:5 mit Assay Puffer (PBS pH 7.8 mit 1 % BSA) verdünnt. Biotinyliertes Antigen wurde als Fängerprotein, AlexaFluor 647-gebundenes Antigen als Detektionsprotein verwendet. Fängerprotein wurde in Assay Puffer (Rexxip HX) zu einer Konzentration von 2000 nM verdünnt. Anschließend wurde diese Lösung so mit biotinyliertem BSA in PBS verdünnt, dass eine finale Konzentration von 1000 nM und 80 % biotinyliertes BSA in PBS in der Lösung enthalten war. Biotinyliertes BSA wurde als Spacer zwischen den Fängerproteinmolekülen verwendet, um eine gleichmäßige Verteilung der Fängerproteinmoleküle zu gewährleisten. Das Detektionsprotein wurde in Rexxip (F) zu einer Konzentration von 25 nM verdünnt. Diese Lösungen sowie alle Proben wurden bei 12000 rpm für 15 min zentrifugiert. Alle Lösungen wurden in eine

96-well Mikrotiterplatte gegeben und mit einer Klebefolie versiegelt. Anschließend wurde die Platte in das Gerät geladen. Die Komponenten wurden sequenziell durch das Gyrolab System auf die Streptavidin-beschichteten Kügelchen in den Mikrostrukturen der Bioaffy1000CD übertragen. Durch Rotation der CD, flossen die Lösungen durch die Mikrostrukturen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Streptavidin-Kügelchen in den Mikrostrukturen der CD mit Waschpuffer (PBS 0.05 % Tween) gewaschen. Zusätzlich erfolgte nach Übertragen der Proben und der Reagenzien ein Waschen der Pipettier-Nadeln mit Gyrolab-Waschpuffer mit einem pH-Wert von 11. Die Nutzung des stringenteren Puffers diente dazu, dass Analytlösung durch die Nadeln des Systems nicht fälschlicherweise übertragen wird. Nach Messung der Fluoreszenz in jeder Mikrostruktur wurden die Rohdaten mit der Gyrolab Evaluator Software analysiert (Gyrolab Protein Technologies, Uppsala, Sweden).

3.3.9 Antigen-Brücken Octet zur Messung von freiem Antikörper

Die Qualitätskontrollproben, die Kalibrationsproben, sowie die unbekannt Proben wurden 1:2 mit Assay Puffer verdünnt. Biotinyliertes Antigen wurde als Fängerprotein, ungelabeltes Antigen als Detektionsmolekül verwendet. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen, wurden Streptavidin-beschichtete Nadeln für 1 min in einer 3 % BSA in PBS-Lösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation der Nadeln für 4 min in 100 µL/well Fängerprotein-Lösung in einer Konzentration von 200 nMol (in PBS mit 0.5 % BSA). Nach dem die Nadeln für 1min zur Equilibrierung in Assay Puffer (1 % BSA in PBS) inkubiert wurden, erfolgte die Inkubation mit Proben für 15 min. Nach einem 3-minütigem Inkubationsschritt in Assaypuffer, folgte die Inkubation in Detektionslösung für weitere 15 min.

Die Rohdaten wurden mit der Daten Akquisitions- und Analyse Software analysiert (Molecular Devices, LLC., USA).

3.3.10 Formel zur Berechnung der freien Antikörperfraktion

Um einen Erwartungswert für den Anteil der freien Antikörper Fraktion mit gegebenen Antigen- und Antikörper-Konzentrationen sowie deren entsprechenden Affinitäten, wurde die Formel für das Massenwirkungsgesetz wie folgt umgeformt:

$$k_d = \frac{(A - AB) * (B - AB)}{AB}$$

$$k_d * AB = (A - AB) * (B - AB)$$

$$0 = ((A - AB) * (B - AB)) - AB * k_d$$

$$0 = A * B - A * AB - B * AB + AB^2 - AB * k_d$$

$$0 = A * B - (A + B) * AB + AB^2 - AB * k_d$$

$$0 = AB^2 - (A + B + k_d) * AB + A * B$$

$$AB = \frac{A + B + k_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{A + B + k_d}{2}\right)^2 - (A * B)}$$

k_d = Dissoziationskonstante

A = Antikörperkonzentration

B = Antigenkonzentration

AB = Konzentration des Komplexes

Durch Einsetzen der Antigen- und Antikörperkonzentrationen sowie der bekannten Dissoziationskonstante kann der Anteil der Antikörperkonzentration im Komplex, nach Einstellung des Gleichgewichts in der Probe, errechnet werden. So konnte ein Erwartungswert für den Anteil des freien Antikörpers errechnet werden, indem die Konzentration des Antikörpers im Komplex von der ursprünglich eingesetzten Antikörperkonzentration subtrahiert wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung interferierender Effekte bei der Quantifizierung eines monoklonalen Antikörpers in Cynomolgenplasma

Bei der Quantifizierung von monoklonalen Antikörpern mittels ELISA können unerwartete Interferenzen auftreten, die zu nicht erklärbaren pharmakokinetischen Kurvenverläufen führen. Diese Interferenzen in pharmakokinetischen Messungen können im Verlauf der Entwicklung zu einer Fehlinterpretation der Daten führen. Anhand einer internen Messmethode, in der ein solches Problem aufgetreten ist, sollten Lösungsansätze entwickelt werden, um den interferierenden Effekt aufzuklären. In einem Projekt wurden zur Unterstützung der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, gerichtet gegen ein im Blutplasma lösliches Antigen zwei unterschiedliche ELISA Methoden, entwickelt. Eine generische ELISA Methode, in welcher polyklonale anti-human-IgG Antikörper als Reagenzien verwendet werden und eine Antigen-Brücken Methode, in welcher das lösliche Antigen sowohl als Fängerprotein auf der ELISA-Mikrotiterplatte als auch als Detektionprotein verwendet wird. Ein generischer ELISA mit hoher Probenverdünnung ist häufig nicht anfällig für Interferenzen (Kiesgen et al., 2016), wodurch er sich gut dafür eignet, humane therapeutische Antikörper in Plasma verschiedener Tierspezies zuverlässig zu quantifizieren und so eine erste Dosis für Humanstudien abzuleiten. Zur Messung von klinischen Proben ist solch ein ELISA allerdings nicht geeignet, da eine Vielzahl von endogenen human-Antikörpern in den Proben den generischen ELISA stören würde (Lee et al., 2011). Beim Vergleich der beiden Methoden wurden substantielle Unterschiede in den erhaltenen pharmakokinetischen Profilen festgestellt. Es wurde eine Abweichung der mittels Antigen-Brücken ELISA ermittelten Konzentrationen in den Proben festgestellt.

Der in dem beschriebenen Projekt zu quantifizierende monoklonale Antikörper ist, wie erwähnt, gegen ein im Plasma vorhandenes, lösliches Protein gerichtet. Dieses Protein wird im Folgenden als „Antigen“ bezeichnet. Der zu quantifizierende, monoklonale Antikörper wird als „Analyt“ bezeichnet.

4.1.1 Stabilität des interferierenden Effekts

Da die Tierproben, in denen der Effekt aufgetreten ist, für über zwei Jahre gelagert wurden, musste zuerst sichergestellt werden, dass der Effekt, in den für dieses Projekt verwendeten Proben, noch stabil ist. Dazu wurden diese, zu Beginn des Projektes, mittels Antigen-Brücken ELISA vermessen. Anschließend folgte ein Vergleich der

Analytkonzentrationen mit den ursprünglich im Antigen-Brücken ELISA ermittelten Konzentrationen. Sollte der Effekt weiterhin stabil sein, werden vergleichbare Konzentrationen zwischen der ursprünglichen Messung und der aktuellen Messung erwartet. Tabelle 1 zeigt die gemessenen Konzentrationen der Proben, ermittelt zu beiden Zeitpunkten. Dargestellt ist auch die Abweichung der Konzentration. Es ist zu erkennen, dass die Analytkonzentrationen in den Proben der Zeitpunkte 0.5 h sowie 4 h bei der aktuelleren Messung um über 60-70 % abweichen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die 0.5 h sowie die 4 h Proben der ursprünglichen Messung 1:3 verdünnt wurden, da die Analyt-Konzentration ansonsten außerhalb des Arbeitsbereichs liegt. Auf diese Verdünnung wurde allerdings bei der aktuelleren Messung verzichtet. Durch diese Verdünnung ist ein interferierender Effekt womöglich abgeschwächt, wodurch die hohen Konzentrationen von 1205 mg/L und 598 mg/L zu erklären sind. In den restlichen Proben ist eine Abweichung von lediglich 30 % oder weniger festzustellen. Somit ist bestätigt, dass der interferierende Effekt in den für die vorliegende Arbeit verwendeten Proben, zum Zeitpunkt der Testung, stabil ist.

Tabelle 1: Analytkonzentration in den Proben, ermittelt durch Antigen-Brücken ELISA.

Zeit [h]	Analyt-Konzentration (mg/L)		Differenz
	Antigen-Brücken ELISA (ursprünglich)	Antigen-Brücken ELISA (aktuell)	
0.5	1205 (1:3)	366 (111)	-70%
4	598 (1:3)	214 (64)	-64%
24	145	102 (26)	-30%
48	111	86 (19)	-22%
72	87	78 (20)	-10%
168	60	59 (11)	-2%

Dargestellt ist die Analyt-Konzentration in den Proben, ermittelt durch den Antigen-Brücken ELISA (Standardabweichung in Klammern). Zudem ist die Differenz der Analyt-Konzentrationen dargestellt.

4.1.2 Isolation potentiell interferierender Proteine

Aufgrund des Methodenformates, in welchem der Effekt auftritt, sind unterschiedliche Interferenzen denkbar. Zum einen könnte ein unbekanntes Protein an das immobilisierte Antigen auf der Platte binden, zum anderen ist auch eine Bindung an das Paratop des Analyten möglich. In beiden Fällen würde die Messung des Analyten gestört werden. Um möglicherweise interferierende Proteine zu isolieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Für die Co-Immunpräzipitation wurden magnetische Streptavidinkügelchen (Thermo Fisher Scientific) mit dem biotinyliertem Antigen gekoppelt, um Antigen bindende Proteine zu isolieren (Abbildung 10). Zusätzlich wurden Kügelchen mit anti-human IgG Antikörper gekoppelt, um den Analyten und

eventuell an ihn gebundene Proteine zu isolieren (Abbildung 11). Dabei wurde bewusst darauf verzichtet den Analyten direkt an die Kügelchen zu koppeln, ansonsten würde dieser mit dem bereits in der Probe enthaltenen Analyten um mögliche Bindungen am unbekanntem Protein konkurrieren. Durch die Kopplung eines anti-human IgG Antikörpers an die Kügelchen sollten bereits bestehende Komplexe aus Analyt und unbekanntem Protein in der Probe gebunden werden.

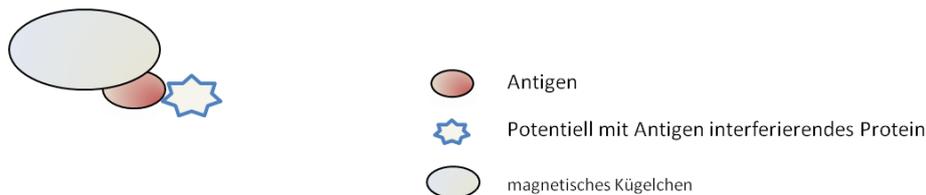


Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten magnetischen Kügelchen zur Aufreinigung von Antigen-bindenden Proteinen aus der Probe.

Biotin-gekoppeltes Antigen wurde an magnetische Streptavidin-Kügelchen gebunden und anschließend mit der Probe inkubiert. Mit Hilfe eines Magnets wurden die Kügelchen nach Inkubation aus der Probe entfernt.

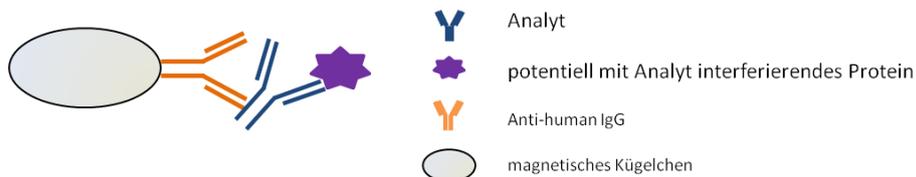


Abbildung 11: Schematische Darstellung der verwendeten magnetischen Kügelchen um Analyt-bindende Proteine aus der Probe aufzureinigen.

Analyt-bindende anti-human IgG Antikörper wurden kovalent an magnetische Kügelchen gebunden und anschließend mit der Probe inkubiert. Der Analyt wurde nicht direkt an die Kügelchen gebunden, um zu verhindern, dass dieser mit bereits in der Probe enthaltenen Analytmolekülen um Bindungen am unbekanntem Protein konkurriert.

Die zu analysierenden Proben wurden entweder mit anti-human IgG gekoppelten Kügelchen oder mit Antigen-gekoppelten Kügelchen inkubiert. Um zu überprüfen, ob die Co-Immunpräzipitation erfolgreich war, wurde der Überstand der inkubierten unbekanntem Proben im generischen ELISA nach erfolgter Co-Immunpräzipitation vermessen, um die Menge des noch vorhandenen Analyten zu quantifizieren. Die Daten sollten mit den Daten einer früheren Messung verglichen werden, in welcher die Analyt-Konzentration vor der Co-Immunpräzipitation bestimmt wurde (vgl. Tabelle 2). Für die Analyt-Konzentration in den Proben nach Inkubation mit anti-human IgG beschichteten Kügelchen wurde eine Abnahme der Konzentration von mehr als 30 % ermittelt. In der 168 h-Probe lag die Analyt-Konzentration unter der Quantifizierungsgrenze. Nach Inkubation der Proben mit Antigen beschichteten Kügelchen wurden Abnahmen der Analyt-Konzentration von fast 30 % für die 0.5 h-Probe festgestellt. Für die 24 h- sowie die 168 h-Probe konnte eine Abnahme von 14 % bzw. 29 % ermittelt werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine erfolgreiche Co-Immunpräzipitation. Hierbei gilt es zu beachten, dass die maximale Menge an Analyt, der durch die Co-Immunpräzipitation aus der Probe entfernt werden kann, von der

Menge der eingesetzten Kügelchen abhängig ist. Zusätzlich hat die Effizienz der Beschichtung der Kügelchen einen Einfluss. Für die mit IgG beschichteten Kügelchen wird für die 0.5 h Probe mit der eingesetzten Menge der Kügelchen, einer angenommenen Effizienz der Beschichtung von 50 % und einer 1:1 Stöchiometrie, eine Abnahme der Analyt-Konzentration von maximal ca. 75 % erwartet. Dies gilt für den Fall, dass 100 % der IgG-Moleküle auf den Kügelchen eine Bindung eingehen. Für die mit Antigen beschichteten Kügelchen wird für die 0.5 h Probe mit der eingesetzten Menge der Kügelchen, einer angenommenen Effizienz der Beschichtung von 50 % und einer Stöchiometrie von 1:2 (1 Analytmolekül bindet 2 Antigenmoleküle) eine Abnahme der Analyt-Konzentration von maximal ca. 80 % erwartet. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass es nicht das Ziel war 100 % des Analyten aus der Probe zu entfernen. Es sollte lediglich überprüft werden, ob die Co-Immunpräzipitation erfolgreich war. Im folgenden Kapitel wird überprüft, ob der Anteil des hier extrahierten Analyten ausreicht, um potentiell interferierende Proteine zu detektieren.

Tabelle 2: Analyt Konzentrationen vor und nach erfolgter Co-Immunpräzipitation.

Zeit [h]	Analyt-Konzentration [mg/L]		
	vor Co-IP	nach Co-IP (anti-human IgG Kügelchen)	nach Co-IP (Antigen Kügelchen)
0.5	1835	1201 (28) [-35%]	1308 (34) [-29%]
24	818	511 (0) [-38%]	707 (11) [-14%]
168	218	< Quantifizierungsgrenze	134 (10) [-29%]

Dargestellt sind die Analytkonzentrationen in den Proben der Zeitpunkte 0.5 h, 24 h und 168 h vor der Co-Immunpräzipitation sowie nach erfolgter Co-Immunpräzipitation mit anti-human IgG-beschichteten oder Antigen-beschichteten Kügelchen (Standardabweichung in runden Klammern). Die Abweichung der Analyt-Konzentration nach erfolgter Co-Immunpräzipitation ist jeweils in eckigen Klammern angegeben. Die Messung erfolgte mittels generischem ELISA.

4.1.3 Detektion potentiell interferierender Proteine

Der interferierende Effekt kam lediglich in Proben behandelte Tiere vor, nicht aber in Proben die aus Sammelplasma hergestellt wurden (Kiesgen et al., 2016). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die störenden Proteine in den Proben vermehrt vorhanden sein müssen, um den Effekt auszulösen. Um dies zu überprüfen, wurden an die Kügelchen gebundene Proteine zuerst eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Elution erfolgte ohne Zugabe eines reduzierenden Agens, damit der anti-human IgG Antikörper mit welchem die Kügelchen beschichtet wurden möglichst nicht fragmentiert. Die anschließende Inkubation des Eluats wurde bei 85°C für 5 min durchgeführt. Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen folgte eine Silberfärbung. Diese Färbung war, wie zu erwarten, sensitiver im Vergleich zu einer Coomassie-

Färbung (Daten nicht gezeigt), wodurch sie sich für den Vergleich der Bandenmuster zwischen Sammelplasma und Proben eignet. Abbildung 12 zeigt das Bandenmuster der Proteine, die von den Kügelchen eluiert wurden. Dargestellt sind auch die Unterschiede zwischen unbehandeltem Sammelplasma und Proben (rote Pfeile).

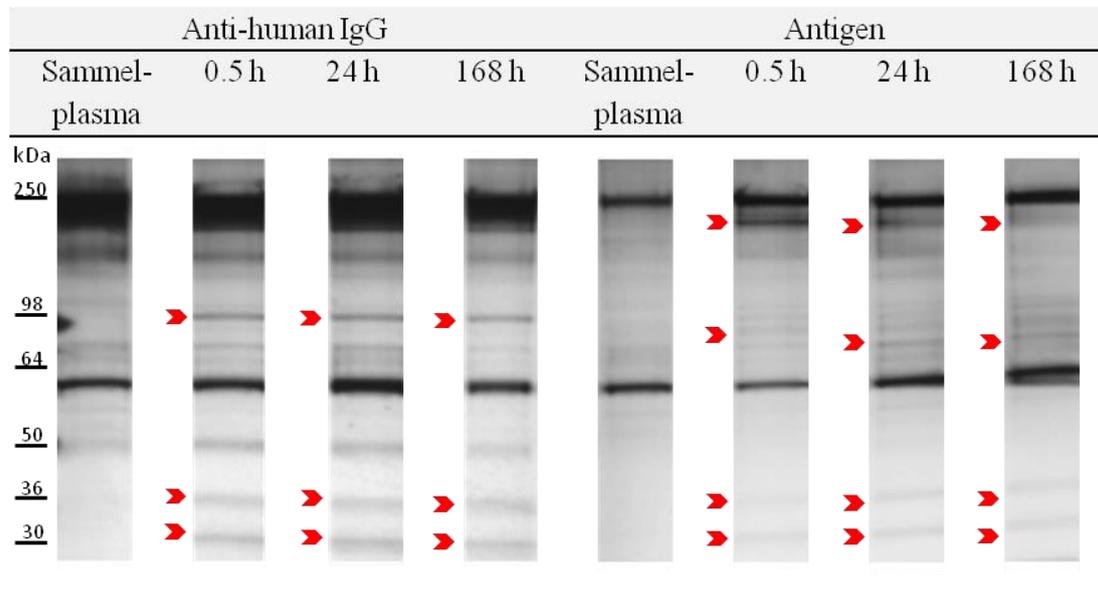


Abbildung 12: Unterschiede im Bandenmuster des Eluats zwischen Sammelplasma und behandelten Proben. Sammelplasma und Proben wurden 1:25 mit PBS-T verdünnt und anschließend mit anti-human IgG oder Antigen-beschichteten Kügelchen bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T, wurden Kügelchen aller Ansätze für 30 min bei RT in Laemmlipuffer ohne reduzierendes Agents inkubiert. Der Überstand wurde für 5 min bei 85°C inkubiert und per SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Silberfärbung. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist in kDa angegeben.

Es sind Unterschiede zwischen dem Bandenmuster des Sammelplasmas und den Proben erkennbar. Dies gilt sowohl für das Eluat der anti-human IgG Kügelchen als auch für die mit biotinyliertem Antigen beschichteten Kügelchen. Spur 1 zeigt das Bandenmuster der Proteine die nach Inkubation von Sammelplasma mit anti-human IgG Kügelchen eluiert wurden. Spur 2, 3 und 4 zeigen das Bandenmuster der Proben. Auf Höhe der 98 kDa Markerbande ist in den Proben eine Bande zu erkennen, die im unbehandelten Plasma nicht zu erkennen ist. Zusätzlich sind ca. auf Höhe der 36 kDa und 30 kDa Markerbande weitere Signale vorhanden. Vergleicht man das Bandenmuster der eluierten Proteine nach Inkubation von Sammelplasma und Proben mit Antigen-beschichteten Kügelchen, sind ebenfalls zusätzliche Banden in den Proben sichtbar. Unterhalb der 250 kDa Markerbande ist in der 0.5 h Probe deutlich eine zusätzliche Bande zu erkennen, welche in der 24 h Probe etwas schwächer ist und in der 168 h Probe kaum noch erkennbar ist. Auch oberhalb der Bande, die sich zwischen der 64 kDa

und 50 kDa Markerbande befindet, sind zusätzliche Banden zu erkennen. Auch auf Höhe der 36 kDa sowie 30 kDa Markerbanden wurden zusätzliche Signale detektiert.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass die Konzentration des Analyten in den Proben nach erfolgter Co-Immunpräzipitation abgenommen hat. Der Analyt sollte bei erfolgreicher Co-Immunpräzipitation also im Eluat detektierbar sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Proteine aus der SDS-PAGE mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend der Analyt detektiert. Dazu wurde als primärer Antikörper ein anti-human IgG aus der Ziege und als sekundärer Antikörper ein HRP-gekoppelter anti-Spezies Antikörper verwendet. Die SDS-PAGE wurde zweimal mit demselben Elutionsansatz durchgeführt. Einmal für die Silberfärbung, um den oben beschriebenen Vergleich anzustellen und ein weiteres Mal für den Western-Blot. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse des Western-Blots. Der Analyt wurde durch einen anti-human IgG Antikörper gebunden und anschließend mit einem HRP-gekoppelten anti-Spezies Antikörper detektiert. Im Eluat jeder behandelten Probe konnte der Analyt wiedergefunden werden. In der Spur der 168 h Probe ist jeweils nur eine schwache Bande zu erkennen. Zudem ist auch im Sammelplasma, welches mit anti-human IgG Kügelchen inkubiert wurde, ein Signal zu erkennen, obwohl in unbehandeltem Sammelplasma keinerlei Analyt vorhanden sein sollte. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich der anti-human IgG Antikörper auf den Kügelchen womöglich teilweise abgelöst hat. Der HRP-gekoppelte anti-Spezies Antikörper, der zur Detektion verwendet wurde, kann durch Bindung an diesen abgelösten Antikörper zu einem Signal führen. Durch den Western-Blot konnte bestätigt werden, dass der Analyt im Eluat jeder Probe vorhanden ist.

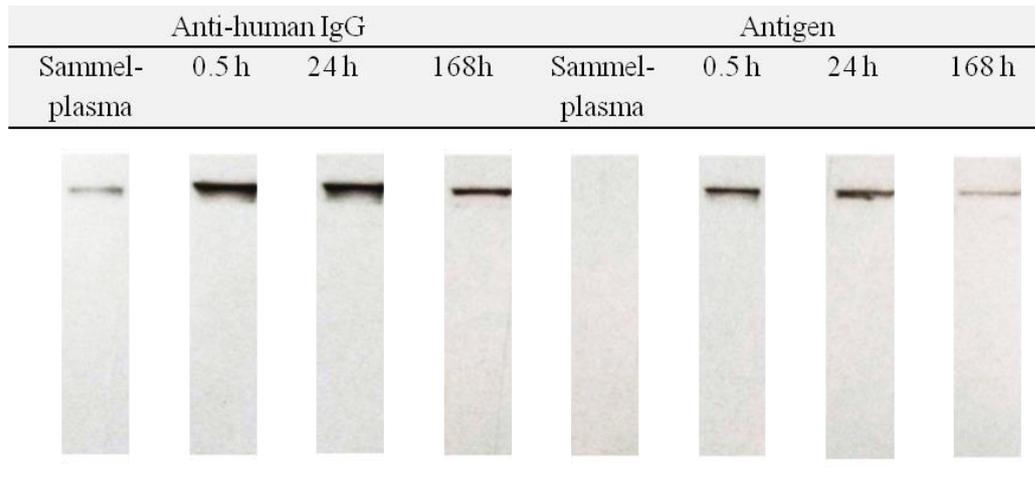


Abbildung 13: Detektion des Analyten im Eluat jeder Probe.

Sammelplasma und Proben wurden 1:25 mit PBS-T verdünnt und anschließend mit anti-human IgG oder Antigen-beschichteten Kügelchen bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T, wurden Kügelchen aller Ansätze für 30 min bei RT in Laemmli-puffer ohne reduzierendes Agents inkubiert. Der Überstand wurde für 5min bei 85°C inkubiert und per SDS-PAGE (12%) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot. Zur Detektion des Analyten wurden als primärer Antikörper ein anti-human IgG Antikörper aus der Ziege sowie ein entsprechender sekundärer HRP-gekoppelter anti-Spezies Antikörper verwendet.

4.1.4 Identifikation potentiell interferierender Proteine

Durch die bereits beschriebenen Versuche konnte einerseits gezeigt werden, dass die Co-Immunpräzipitation erfolgreich war und andererseits, dass in den Proben zusätzliche Proteine vorhanden sind, die an Analyt bzw. Antigen auf den Kügelchen binden. Um diese Proteine zu identifizieren, sind die Eluate einer Analyse mittels LC-MS/MS unterzogen worden. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass bei der Elution der Proteine für die bereits beschriebene SDS-PAGE parallel eine zweite Elution für die Analyse mittels LC-MS/MS durchgeführt wurde. So ist gewährleistet, dass beide Elutionen aus derselben Co-Immunpräzipitation hervorgehen.

Tabelle 3 zeigt die identifizierten Proteine in den einzelnen Proben, zugeordnet zur Inkubation mit den entsprechenden Kügelchen. Wie bereits durch den Western-Blot gezeigt, konnte mittels LC-MS/MS Analyse bestätigt werden, dass im Eluat jeder Probe der Analyt zu finden ist. Weiterhin konnte in jeder Probe, welche mit anti-human IgG beschichteten Kügelchen inkubiert wurde, CFHR5 identifiziert werden. In den 24 h- und den 168 h-Proben die mit anti-human IgG beschichteten Kügelchen inkubiert wurden bzw. in der 24 h Probe, die mit Antigen beschichteten Kügelchen inkubiert wurde, konnte Ficolin-2 identifiziert werden. Zwischen dem Antigen und dem strukturell sehr ähnlichen Vorläuferprotein konnte in diesem Experiment nicht unterschieden werden. In der 0.5 h Probe, die mit anti-human IgG gekoppelten Kügelchen inkubiert wurde sowie in der 0.5 h Probe, die mit Antigen gekoppelten

Kügelchen inkubiert wurde, konnte Antigen bzw. Vorläuferprotein gefunden werden. Außerdem wurde Antigen bzw. Vorläuferprotein auch in der 168 h Probe, die mit Antigen gekoppelten Kügelchen inkubiert wurde identifiziert. Weiterhin konnte in jeder Probe, die mit anti-human IgG beschichteten Kügelchen inkubiert wurde IgM gefunden werden.

Tabelle 3: Co-Prezipitierende Proteine, identifiziert mittels LC-MS/MS.

Zeitpunkt [h]	Anti-human IgG Kügelchen	Antigen-Kügelchen
Sammelplasma	Fibrinogen- β	Antigen/Vorläuferprotein
0.5	Analyt	Analyt
	Antigen/Vorläuferprotein	Antigen/Vorläuferprotein
	CFHR5	
	IgM	
	Immunglobulin J	
24	Analyt	Analyt
	Ficolin-2	Ficolin-2
	CFHR5	
	IgM	
	Fibrinogen- α chain	
	Complement C1q subcomponent subunit A	
168	Analyt	Analyt
	Ficolin-2	Antigen/Vorläuferprotein
	CFHR5	
	IgM	

Die Analyse mittels LC-MS/MS wurde von der Bioanalytik von Bayer in Wuppertal durchgeführt.

4.1.5 Überprüfung identifizierter Proteine auf eine Interferenz im ELISA

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Proteine in der Lage sind den interferierenden Effekt auszulösen, wurden rekombinante humane Proteine (R&D Systems) zusammen mit Analyt in Cynomolgenplasma über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend sollte der Analyt in diesen Proben mittels Antigen-Brücken ELISA quantifiziert werden, um den Einfluss dieser Proteine auf die Messmethode abzuklären. Sind die Proteine in der Lage einen interferierenden Effekt auszulösen, dann wäre die Konzentration des Analyten in diesen Proben, im Vergleich zu den Proben ohne zusätzliches Protein, reduziert. Bei diesem Vorgehen wurden die Proteine verwendet, die in relativ hohen physiologischen Konzentrationen im Plasma vorhanden sind. Als Anhaltspunkt wurde die Plasmakonzentration der Proteine in Humanplasma herangezogen. Die folgenden Proteine wurden für die Testung ausgewählt: CFHR5 aufgrund der Plasmakonzentration von 3-6 $\mu\text{g/ml}$ im Menschen (Csincsi et al., 2015), Ficolin-2 da eine ähnlich hohe Plasmakonzentration postuliert wird wie für CFHR5 (3-5.4 $\mu\text{g/ml}$ im Menschen (Kilpatrick and Chalmers, 2012)). Außerdem wurden das Antigen sowie das

Vorläuferprotein getestet. Da das Antigen im Antigen-Brücken ELISA auch als Reagenz verwendet wird, kann eine hohe Plasmakonzentration theoretisch zu einer Interferenz führen. Das Vorläuferprotein wird aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Antigen aus demselben Grund für die folgende Testung herangezogen. IgM wurde nicht auf eine Interferenz im ELISA getestet, da für die intern entwickelten therapeutischen Antikörper eine Immunogenitäts-Analytik stattfindet, wodurch eine Interferenz, ausgelöst durch Antikörper, unwahrscheinlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Testung der Proteine auf einen interferierenden Effekt der Fokus auf die mehrfach gefundenen Proteine gelegt. Alle eingesetzten Proteine sind rekombinante Humanproteine. Da die zu untersuchende Interferenz in Cynomolgen aufgetreten ist, wurde die Ähnlichkeit der Proteine mittels Sequenz-Alignments überprüft. Die hier verwendeten humanen Proteine besitzen eine hohe Homologie zu dem entsprechenden Cynomolgenprotein ($> 80\%$, Daten nicht gezeigt). Die Identifikation der Proteine erfolgte durch Abgleich mit einer Proteindatenbank (SwissProt), welche Proteinsequenzen unterschiedlicher Spezies umfasst.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Messung von Proben, die mit Analyt und rhCFHR5 oder rhFicolin-2 versetzt wurden, im Vergleich zu Proben, die nur Analyten enthalten. Beide Proteine wurden 10x physiologisch eingesetzt, wodurch sich ein Verhältnis von Analyt zu CFHR5 von ca. 1:1 und ein Verhältnis von Analyt zu Ficolin-2 von ca. 1:2 ergeben. In weiß dargestellt sind die Signale für steigende Analytkonzentrationen (eine niedrige, mittlere, hohe Konzentration) und in schwarz dargestellt ist das Signal für die Probe, die Analyt und zusätzliches Protein enthält. Die Testung auf Interferenz erfolgt bei der Konzentration von 667 nM Analyten. Dies ist ein dynamischer Abschnitt im Arbeitsbereich der Methode, bei dem eine kleine Konzentrationsänderung eine große Abweichung im gemessenen Signal zur Folge hat. Damit eignet sich diese Analyt-Konzentration für die Testung auf Interferenz-Effekte. Für den Fall, dass sich ein interferierender Effekt ähnlich wie in den Proben abzeichnet, ist ein verringertes Signal zu erwarten. Für die 10-fache physiologische Konzentration an Proteinen, konnte kein verringertes Signal in der Messung der Analyt-Konzentration festgestellt werden. Es gibt also, in der getesteten Konzentration, keinen Hinweis auf eine Interferenz durch diese Proteine.

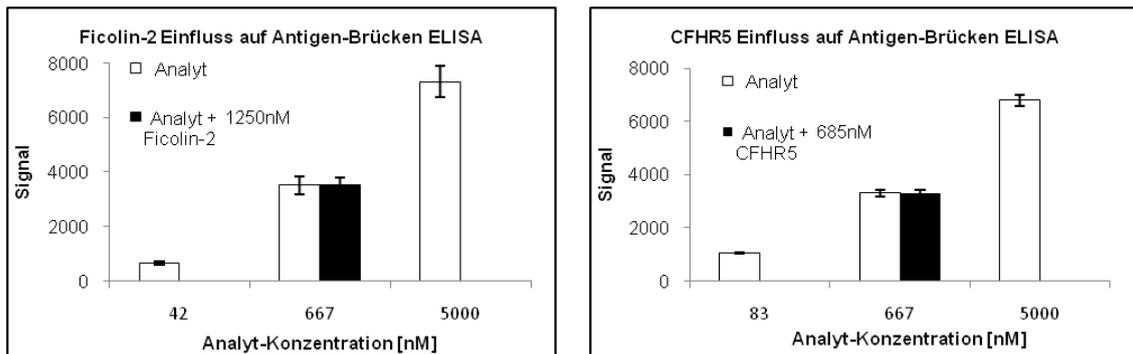


Abbildung 14: Einfluss von CFHR5 und Ficolin-2 auf den Antigen-Brücken ELISA.

Sammelplasma wurde mit Analyt oder Analyt und Protein versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Aufgetragen ist die Analyt-Konzentration in Abhängigkeit zum gemessenen Signal. In weiß dargestellt ist das Signal in Abhängigkeit der Analyt-Konzentration, für Proben ohne zusätzliches Protein. In schwarz ist das Signal für die Probe dargestellt, die zusätzliches Protein enthält.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Messung von Proben, die mit Analyt und unterschiedlichen Mengen an Antigen versetzt wurden, im Vergleich zu Proben, die nur Analyt enthalten. Aufgetragen ist die relative Abweichung im gemessenen Signal in Abhängigkeit zur eingesetzten Protein-Konzentration. Der Vergleichswert ist dabei die nominale Konzentration des Analyten in Proben, die keine zugegebenen Proteine enthalten. Erst ab einer relativen Abweichung von mehr als -20 % wird von einer Abweichung ausgegangen, die nicht lediglich auf Schwankungen in der Messung zurückzuführen sind (siehe Kapitel 1.6). Eine Konzentration von bis zu 120 nM Antigen führt zu keiner Abweichung im gemessenen Signal der Proben, welche 1250 nM Analyt enthalten. Eine Konzentration von 120 nM Antigen führt in Analytkonzentrationen von 3130 nM bis 5000 nM zu einer Abnahme von ca. 30 %. Proben mit höherer Analyt-Konzentration mussten vor der Messung 1:3 verdünnt werden, da die Analyt-Konzentration oberhalb des Arbeitsbereiches der Messmethode liegt. In diesen Proben ist keine Abnahme der Konzentration festzustellen, da durch die Verdünnung ein interferieren der Effekt womöglich abgeschwächt ist.

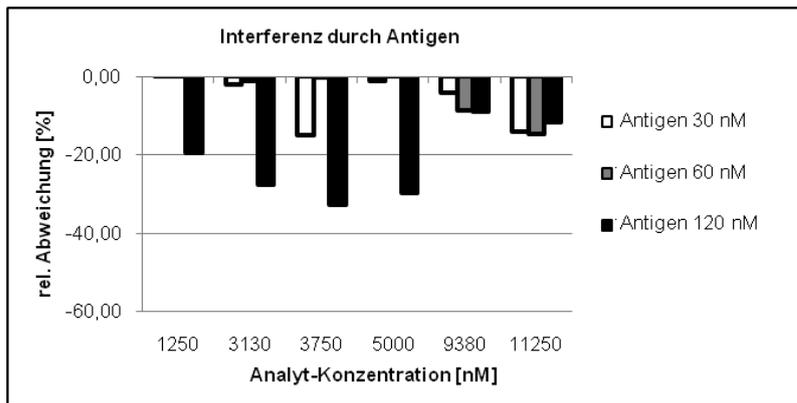


Abbildung 15: Überprüfung des Antigens auf eine Interferenz im ELISA.

Proben wurden über Nacht bei 4°C mit Antigen inkubiert und anschließend im ELISA vermessen. Dargestellt ist die relative Abweichung der Analyt-Konzentration, in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration. Die Abweichung ist bezogen auf die Kalibrierproben, welche kein zusätzliches Antigen enthalten.

Abbildung 16 zeigt die Messung von Proben, die mit Analyt und unterschiedlichen Mengen an Vorläuferprotein versetzt wurden, im Vergleich zu Proben, die nur Analyten enthalten. Eine Konzentration von 30 nM Vorläuferprotein führt lediglich in einer Probe zu einer Konzentrationsabnahme von über 20 %. Die Testkonzentration von 60 nM Antigen führt in jeder nicht verdünnten Probe zu einer Abnahme von mehr als 20 %. Eine Konzentration von 120 nM Vorläuferprotein resultiert in Signalabnahmen von mehr als 50 %. Die Ausnahme bilden auch hier die beiden Proben mit den Analytkonzentrationen oberhalb des Arbeitsbereichs der Messmethode. Eine Inkubation mit 30 nM Vorläuferprotein führte lediglich zu einer Abnahme innerhalb von $\pm 20\%$, die gemessene Konzentration liegt somit im Bereich der tolerierbaren Schwankungen der Messung. Nach Inkubation mit 60 nM bzw. 120 nM Vorläuferprotein ist die Abweichung in den verdünnten Proben etwas größer als -20 %.

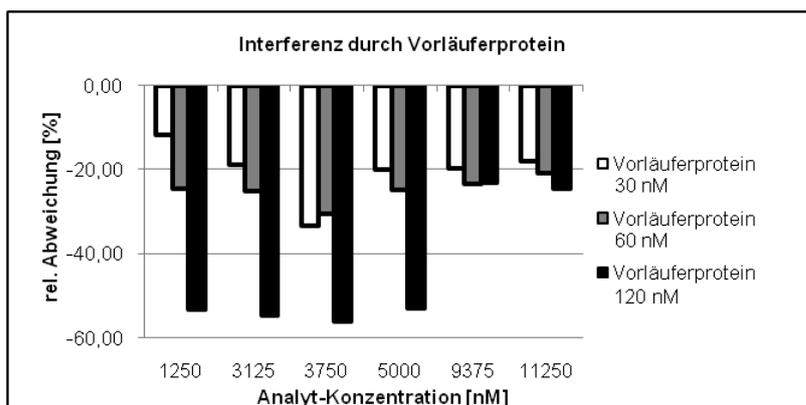


Abbildung 16: Überprüfung des Vorläuferproteins auf eine Interferenz im ELISA.

Proben wurden über Nacht bei 4°C mit Vorläuferprotein inkubiert und anschließend im ELISA vermessen. Dargestellt ist die relative Abweichung der Analyt-Konzentration, in Abhängigkeit von der Vorläuferprotein-Konzentration. Die Abweichung ist bezogen auf die Kalibrierproben, welche kein zusätzliches Vorläuferprotein enthalten.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Antigen-Konzentration von 120 nM sowie eine Vorläuferprotein-Konzentration von über 60 nM zu einer Abnahme der gemessenen

Signale in den getesteten Analytkonzentrationen führt. Ein interferierender Effekt, ausgelöst durch diese Proteine ist also denkbar.

4.1.5.1 Gemisch aus identifizierten Proteinen

Die vorangegangenen Versuche zielten darauf ab einzelne Proteine zu identifizieren, welche in der Lage sind den interferierenden Effekt auszulösen. Da es auch möglich wäre, dass der Effekt durch mehrere Proteine ausgelöst werden könnte, sollten die zuvor identifizierten Proteine zusätzlich als Gemische getestet werden. Abbildung 17 zeigt, dass die getesteten Proteine sowie Proteingemische in den eingesetzten Konzentrationen nicht zu einer Signalabnahme von mehr als 20 % führen. Es gibt in den getesteten Protein-Kombinationen keine Anzeichen für eine Interferenz durch diese Proteine. In der Testung mit CFHR5 und Ficolin-2 wurden Konzentrationen der Proteine eingesetzt, die der 10-fachen physiologischen Konzentration entsprechen. Diese wurden, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, bei einer Analytkonzentration im mittleren Arbeitsbereich der Methode verwendet. Um nun einen höheren molaren Überschuss gegenüber dem Analyten zu gewährleisten, wurden die Proteine im unteren Bereich der Messmethode eingesetzt.

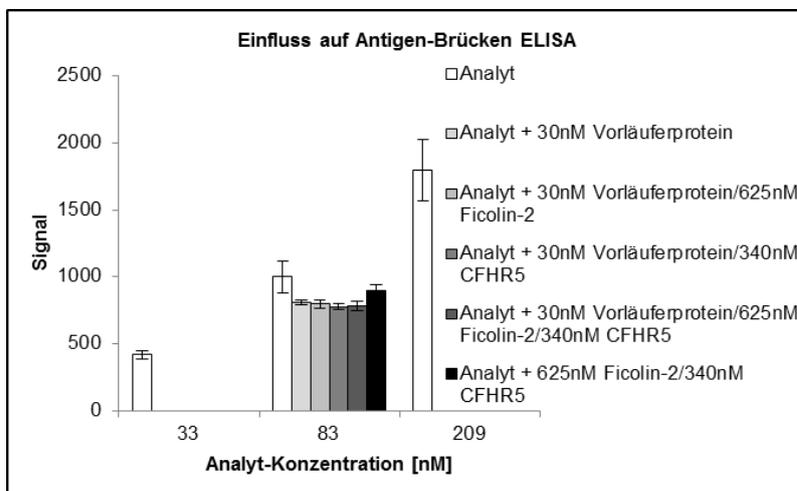


Abbildung 17: Einfluss von Protein-Gemischen auf den Antigen-Brücken ELISA.

Sammelplasma wurde mit Analyt oder Analyt und Protein/Gemisch versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Aufgetragen ist die Analyt-Konzentration in Abhängigkeit zum gemessenen Signal. In weiß dargestellt ist das Signal in Abhängigkeit der Analyt-Konzentration für Proben ohne zusätzliches Protein. In grau bis schwarz ist das Signal für die Proben dargestellt, die zusätzliches Protein/Gemisch enthalten.

4.1.5.2 Detektion der Proteine in den Proben im Vergleich zum Sammel-Plasma

Der interferierende Effekt kommt lediglich in Proben behandelter Tiere vor, nicht aber in Proben, die aus Sammelplasma hergestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die störenden Proteine in den Proben vermehrt vorhanden sein müssen, um den Effekt auszulösen. Um zu überprüfen, ob die mittels LC-MS/MS identifizierten und im ELISA auf ihre Interferenz getesteten Proteine, in den Proben, im Vergleich zum

Sammelplasma, vermehrt vorhanden sind, wurden diese mittels Western-Blot analysiert. Abbildung 18 - Abbildung 20 zeigen die Ergebnisse der Western-Blots. Abbildung 18 zeigt den Western-Blot für CFHR5 sowie die Analyse des Sammelplasmas und der Proben (24 h, 168 h). Für den Vergleich des CFHR5-Proteins in Sammelplasma mit Proben wurde festgestellt, dass das Signal in den Proben nicht erhöht ist. In der 168 h-Probe ist keinerlei Signal erkennbar. Es wurde Protein in Puffer in drei verschiedenen Konzentrationen als positiv-Kontrolle eingesetzt. Sammelplasma und Proben mussten 1:50 verdünnt werden, da das Gel ansonsten überladen und nicht analysierbar ist (Daten nicht gezeigt).

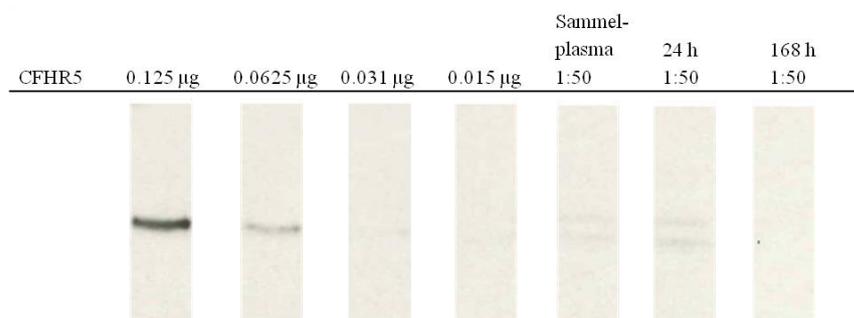


Abbildung 18: Detektion von CFHR5 in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.

Nach Verdünnung von CFHR5 in Laemmlipuffer, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Proteins zusammen mit 1:50 verdünntem Sammelplasma und ausgewählten Proben mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot. Zur Detektion des Analyten wurden als primärer Antikörper ein polyklonaler anti-CFHR5 Antikörper aus der Ziege sowie ein entsprechender sekundärer HRP-gekoppelter anti-Spezies Antikörper verwendet.

Abbildung 19 zeigt den Western-Blot für Ficolin-2 sowie die Analyse des Sammelplasmas und der Proben (24 h, 168 h). Für den Vergleich des Ficolin-2-Proteins in Sammelplasma mit Proben kann festgestellt werden, dass das Signal in den Proben nicht erhöht ist. Für der 168 h-Probe ist lediglich ein sehr schwaches Signal erkennbar.

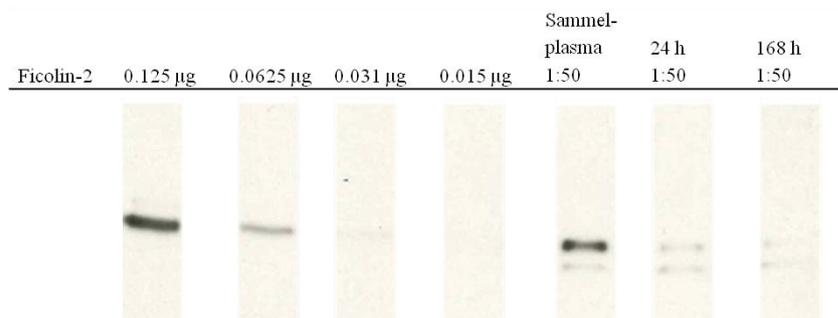


Abbildung 19: Detektion von Ficolin-2 in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.

Nach Verdünnung von Ficolin-2 in Laemmlipuffer, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Proteins zusammen mit 1:50 verdünntem Sammelplasma und ausgewählten Proben mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot. Zur Detektion des Analyten wurden als primärer Antikörper ein polyklonaler anti-Ficolin-2 Antikörper aus der Ziege sowie ein entsprechender sekundärer HRP-gekoppelter anti-Spezies Antikörper verwendet.

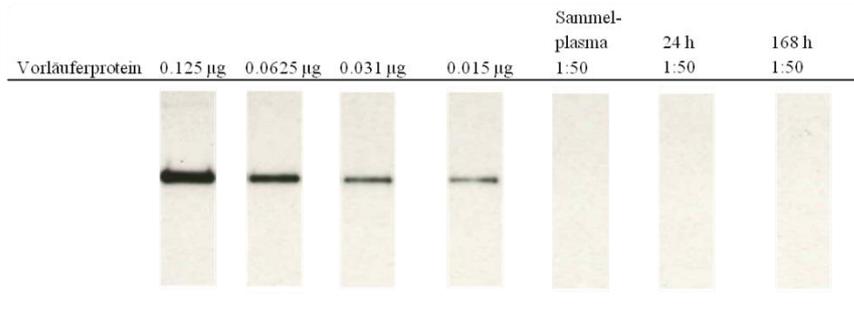


Abbildung 20: Detektion von Vorläuferprotein in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.

Nach Verdünnung von CFHR5 in Laemmli-puffer, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Proteins zusammen mit 1:50 verdünntem Sammelplasma und ausgewählten Proben mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot. Zur Detektion des Analyten wurden als primärer Antikörper ein polyklonaler anti-Vorläuferprotein Antikörper aus der Ziege sowie ein entsprechender sekundärer HRP-gekoppelter anti-Spezies Antikörper verwendet.

Abbildung 20 zeigt die Positivkontrollen für das Vorläuferprotein sowie die Analyse des Sammelplasmas und der Proben (24 h, 168 h). Im Sammelplasma sowie in Proben konnte kein Signal gemessen werden.

Für die Proteine CFHR5 und Ficolin-2 konnte im Antigen-Brücken ELISA keine Interferenz festgestellt werden. Weder die einzelnen Proteine, noch die Kombination dieser, führte in den gezeigten Experimenten zu einer Signalabnahme die maßgeblich außerhalb der Messschwankungen liegt. Zusätzlich lassen auch die Ergebnisse der Western-Blots darauf schließen, dass die Proteine in den Proben nicht vermehrt vorhanden sind.

Da der Western-Blot für das Vorläuferprotein keinen Vergleich zwischen Sammelplasma und Proben ermöglicht, sollte die Konzentration des Vorläuferproteins in den Proben mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits analysiert werden. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Messung für die Proben. Die Konzentration des Vorläuferproteins in den Proben ist im Vergleich zum Sammelplasma reduziert. Für die Konzentration der 0.5 h-Probe wurde eine Abweichung von -30 % ermittelt. Die Konzentration der 24 h-Probe weicht um -10 % ab und für die 168 h-Probe wurde ebenfalls eine Abweichung von -30 % im Vergleich zum Sammelplasma festgestellt. Es konnte keine erhöhte Vorläuferprotein-Konzentration in den Proben festgestellt werden. Das Vorläuferprotein konnte zwar im ELISA eine Interferenz auslösen, wie in Abbildung 16 dargestellt, allerdings konnte durch die in diesem Projekt verwendeten Methoden kein Hinweis auf eine erhöhte Menge an Vorläuferprotein festgestellt werden. Der Effekt, welcher durch das Antigen ausgelöst wurde, ist wie in Abbildung 15 dargestellt sehr gering. Selbst bei der eingesetzten Konzentration von 120 nM, was

einer mehr als 20000-fach physiologischen Konzentration entspricht, beträgt die Abweichung nur ca. 30 %.

Tabelle 4: Konzentration des Vorläuferproteins in den Proben.

Probe	Vorläuferprotein-Konzentration [nM]
Sammelplasma	18.5 (1.1)
0.5h	12.5 (0.9) [-30%]
24h	16.1 (1.4) [-10%]
168h	12.5 (0.2) [-30%]

Dargestellt ist die Vorläuferprotein-Konzentration für Sammelplasma und ausgewählte Proben, ermittelt durch ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit. In Klammern ist die Abweichung der Vorläuferprotein-Konzentration in den Proben im Vergleich zum Sammelplasma aufgetragen.

4.1.5.3 Überprüfung von weiteren Proteinen auf eine Interferenz im ELISA

Zusätzlich zu der Co-Immunpräzipitation und der anschließenden Identifizierung der Proteine mittels LC-MS/MS wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die eine Interferenz auslösen könnten. Proteine mit hoher Sequenzhomologie zum Antigen könnten aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu einer Interferenz in der Messung führen, indem sie mit dem zu quantifizierenden Analyten interagieren. Darüber hinaus wurde die Literatur nach Proteinen durchsucht, die bekanntermaßen mit dem Antigen interagieren. Da das Antigen als Fänger- und als Detektionsmolekül in der Messung verwendet wird, könnte ein solches Protein ebenfalls zu Störungen in der Messung führen. Es wurde ein Protein identifiziert (Kallikrein), welches eine hohe Sequenzhomologie zum Antigen aufweist. Dieses Protein sowie sein Vorläuferprotein (Prekallikrein) wurden ebenfalls auf eine Interferenz in der Messmethode untersucht. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Messung. In weiß dargestellt sind die Signale für steigende Analytkonzentrationen (niedrig, mittel, hoch) und in schwarz ist das Signal für die Probe dargestellt, die Analyt und zusätzliches Protein enthält. Die Testung auf Interferenz erfolgt bei der Konzentration von 667 nM Analyten. Dies ist ein dynamischer Abschnitt im Arbeitsbereich der Messmethode, bei dem eine kleine Konzentrationsänderung eine große Abweichung im gemessenen Signal zur Folge hat. Damit eignet sich diese Analyt-Konzentration für die Testung auf Interferenz-Effekte. Es konnte keine Signalabnahme in Proben gemessen werden, die mit zusätzlichem Protein versetzt und inkubiert wurden.

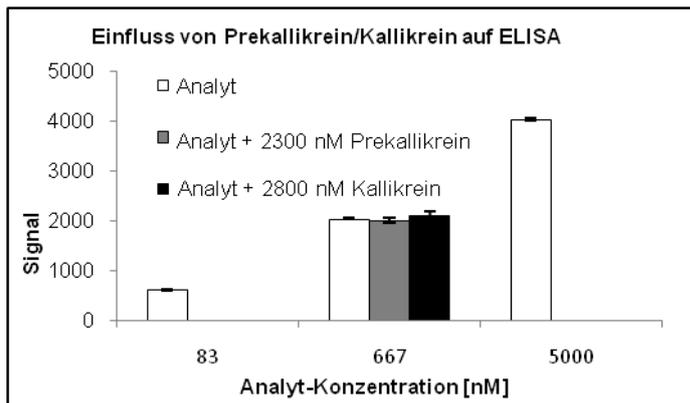


Abbildung 21: Einfluss von Prekallikrein/Kallikrein auf den Antigen-Brücken ELISA.

Sammelplasma wurde mit Analyt oder Analyt und Protein versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Aufgetragen ist die Analyt-Konzentration in Abhängigkeit zum gemessenen Signal. In weiß dargestellt ist das Signal in Abhängigkeit der Analyt-Konzentration, für Proben ohne zusätzliches Protein. In grau bis schwarz ist das Signal für die Proben dargestellt, die zusätzliches Protein enthalten.

Weiterhin wurden Proteine getestet, für die eine Interaktion mit dem Antigen postuliert wird. Abbildung 22 zeigt den Einfluss der getesteten Proteine auf die Messung. Um einen Überschuss der eingesetzten Proteine gegenüber dem Analyten zu gewährleisten, wurden die Proteine in die für die Messmethode notwendige Probenverdünnung hineingegeben. Unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen ist kein Störeffekt auf die Messung, ausgelöst durch eines der Proteine zu erkennen.

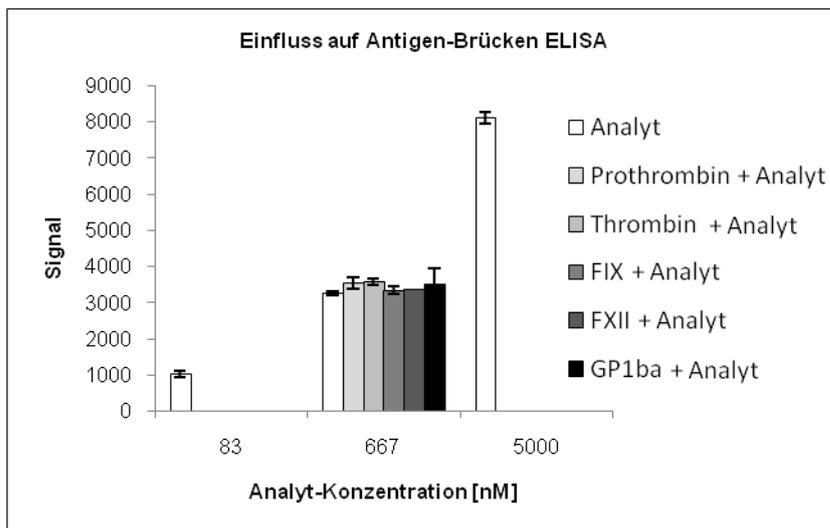


Abbildung 22: Einfluss von Antigen-Protein interagierenden Proteinen auf den Antigen-Brücken ELISA.

Sammelplasma wurde mit Analyt oder Analyt und Protein versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Aufgetragen ist die Analyt-Konzentration in Abhängigkeit zum gemessenen Signal. In weiß dargestellt ist das Signal in Abhängigkeit der Analyt-Konzentration, für Proben ohne zusätzliches Protein. Farbiger dargestellt sind die Signale für die Proben, die zusätzliches Protein enthalten.

4.1.5.4 Direkte Bindung von Proteinen an das Antigen

Als zusätzliches Vorgehen, um eine Bindung diverser Proteine an das Antigen abzuklären, sollte mittels Octet die direkte Bindung der identifizierten Proteine an das Antigen gemessen werden. Dazu wurde das biotinylierte-Antigen an Streptavidinnadeln gebunden und in Lösungen inkubiert, welche die Proteine oder ein Gemisch der

Proteine enthalten. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse. Es sind im Zeitverlauf keinerlei Bindung der Proteine an das Antigen zu erkennen.

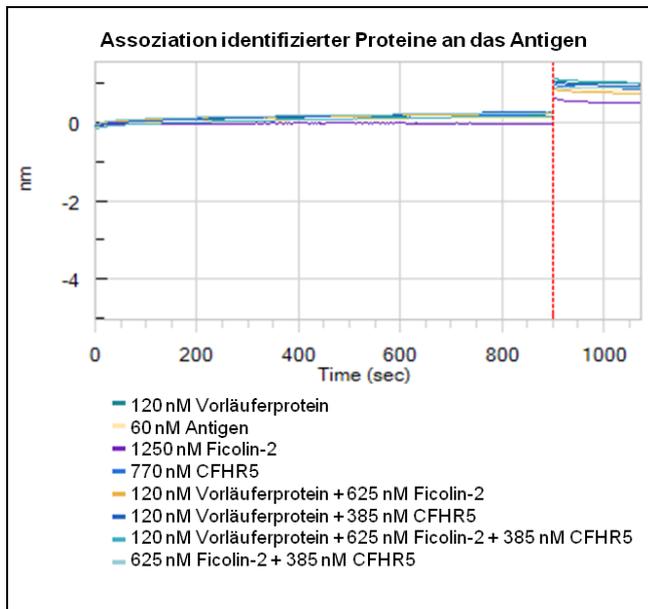


Abbildung 23: Assoziation der getesteten Proteine/Proteingemische an Antigen-beschichtete Glasnadeln im OctetRed96.

Dargestellt sind die Assoziationskurven der Proteine oder Proteingemische an Antigen.

Im Zeitverlauf sind unter den getesteten Bedingungen keine Bindungen an das Antigen, welches im ELISA verwendet wird, messbar. Sowohl für das Vorläuferprotein als auch für das Antigen, welche im ELISA einen Störeffekt auslösen konnten, wurden keine Bindungen gemessen.

4.2 Entwicklung einer Methode zur Messung eines Biomarkers in klinischen Proben

In einem internen Projekt wird an einem Antikörper gearbeitet, der gegen ein lösliches Protein im Plasma gerichtet ist. Um die Effektivität dieses therapeutischen Antikörpers zu überprüfen, ist es sinnvoll die Konzentration des im Plasma vorhandenen löslichen Proteins zu bestimmen. Dieses Protein wird im Folgenden als „Antigen“ bezeichnet. (Der Bayer-Code des gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers lautet: BAY-12). Zu diesem Zweck sollte ein Biomarker-Assay zur Messung von klinischen Proben entwickelt werden. Die besondere Schwierigkeit der Messung liegt darin, dass die Konzentrationen des therapeutischen Antikörpers in den zu messenden Proben sehr hoch sind und Patientenplasma inter-individuelle Unterschiede in der Konzentration des Antigens- sowie seines entsprechenden Vorläuferproteins aufweist. Zusätzlich wird die Messung dadurch erschwert, dass das strukturell ähnliche Vorläuferprotein in einer

vielfach höheren Konzentration im Vergleich zum Antigen ebenfalls in der Probe enthalten ist.

4.2.1 Zur Verfügung stehende Reagenzien und Methoden-Formate

Je nach Anforderungen an die Messmethode, kann durch Auswahl des Formates Einfluss auf die Besonderheiten der Messung genommen werden. Eine spezielle Herausforderung liegt in der relativ zum Antigen sehr hohen Vorläuferprotein-Konzentration. Das zu messende Antigen besitzt im Gegensatz zu seinem Vorläuferprotein eine Aktivität. Um Spezifität gegenüber dem zu messenden Antigen zu erreichen, wurden die Unterschiede zwischen Antigen und Vorläuferprotein ausgenutzt. Mittels eines Inhibitors sollte zwischen Antigen und Vorläuferprotein differenziert werden. Für die Entwicklung der hier beschriebenen ELISA-Methode wurde ein biotinylierter Inhibitor verwendet, um zwischen den beiden Proteinen zu unterscheiden.

Zu Beginn der Assay-Entwicklung wurden potentiell nützliche Reagenzien zusammengetragen, um anschließende Überlegungen zu möglichen Assay-Formaten anstellen zu können. Ausgewählt wurden interne Antikörper, die das Antigen und das Vorläuferprotein binden, oder Antikörper, die nur das Antigen binden. Da das zu messende Protein eine Aktivität besitzt, wurde darüber hinaus ein fluorogenes Substrat in Betracht gezogen, um das Antigen über dessen Aktivität zu quantifizieren. Des Weiteren wurde ein biotinylierter Inhibitor ausgewählt, der das Antigen aufgrund dessen Aktivität bindet. Abbildung 24 zeigt die Auswahl der zur Verfügung stehenden Reagenzien in übersichtlicher Form. BAY-18 und BAY-12 sind interne Antikörper, dessen Funktion in eckigen Klammern dargestellt ist.

Reagenz	Bezeichnung [Funktion]
	BAY-18-IgG [bindet Vorläuferprotein/Antigen]
	BAY-18-Fab [bindet Vorläuferprotein/Antigen]
	BAY-12-IgG [bindet Antigen]
	BAY-12-Fab [bindet Antigen]
	Substrat [wird umgesetzt durch Antigen]
	Inhibitor; biotinyliert [bindet Antigen]

Abbildung 24: Potentiell nützliche Reagenzien für die Biomarker-Assay Entwicklung.

Bereits intern vorhandene Antikörper oder deren Fab-Fragmente wurden in Betracht gezogen, wenn diese das Antigen oder sowohl das Antigen als auch das Vorläuferprotein binden können. Auch kommerziell erhältliche Reagenzien wurden in Betracht gezogen, wenn eine Bindung an Antigen denkbar ist. Weiterhin wurde ein kommerziell erhältliches fluorogenes Substrat ausgewählt, welches durch das Antigen umgesetzt wird.

Mögliche, daraus resultierende Assay-Formate, die in dieser Arbeit ausgetestet wurden, sind im Folgenden dargestellt. Abbildung 25 zeigt ein Format, in dem biotinylierter Inhibitor als Fänger-Reagenz (Kopplung von Biotin an IgG-Antikörper; siehe 3.1.1) und ein interner sulfo-gelabelter Antikörper (Kopplung von Sulfo-Tag NHS-Ester; siehe 3.1.2), oder dessen sulfo-gelabeltes Fab-Fragment als Detektionsmolekül verwendet wurde.

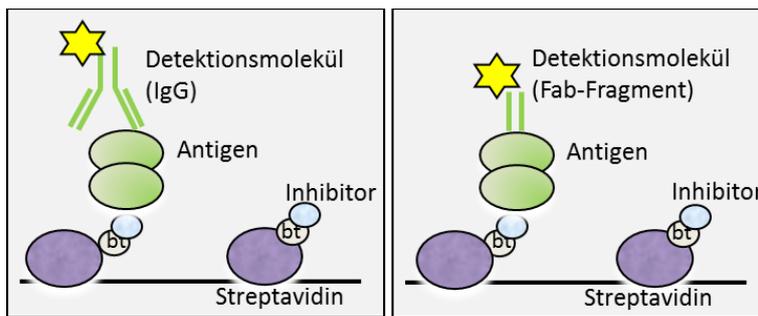


Abbildung 25: Assayformat mit Inhibitor als Fängerprotein und sulfo-gelabeltem BAY-18 (IgG und Fab-Fragment) als Detektionsmolekül.

Eine 96-well Streptavidin Platte wird mit biotinyliertem Inhibitor beschichtet. Nach einem Waschschrift wird verdünnte Probe in jedes well gegeben. Nach erneutem Waschen folgt die Inkubation mit sulfo-beschichtetem BAY-18 als Detektionsmolekül.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Messung. Es herrscht zwischen den Signal zu Hintergrund-Verhältnissen in Sammelplasma und depletiertem Plasma keine Vergleichbarkeit. Die Verhältnisse der Messung in depletiertem Plasma liegen in fast jeder Probe um den Faktor 2 hinter dem in Sammelplasma zurück. Da depletiertes Plasma frei von Antigen- und Vorläuferprotein ist, sollten hier keinerlei Interferenzen auftreten. Erwartet wurde, dass zwischen den Matrizes Vergleichbarkeit herrscht. Da dies weder mit dem IgG als Detektionsmolekül, noch mit dem Fab-Fragment der Fall war, wurde dieses Format nicht weiterentwickelt.

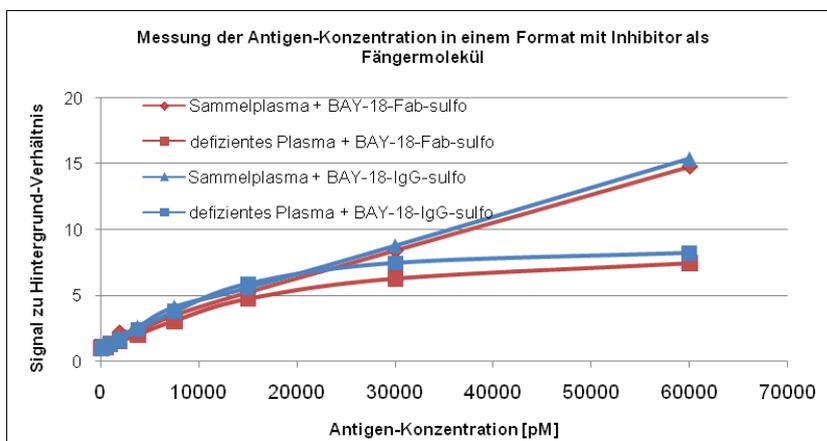


Abbildung 26: Messung von Antigen in einem Format mit Inhibitor als Fängermolekül.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma sowie depletiertem Plasma vorbereitet. Anschließend erfolgte die Messung in einem Format mit Inhibitor als Fängermolekül. Die Detektion erfolgte mittels sulfo-beschichtetem BAY-18-IgG oder BAY-18-Fab. Dargestellt sind die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse in Abhängigkeit von Antigen-Konzentration und verwendeter Matrix sowie Detektionsmolekül.

Um eine Abgrenzung gegenüber weiteren Proteinen zu erreichen, die eine ähnliche Aktivität wie das Antigen aufweisen, wurde ein ELISA-Format getestet, in welchem BAY-12-IgG und BAY-12-Fab als Antigen verwendet wurden (Abbildung 27). Es sollte zuerst das zu messende Antigen aus der Probe gebunden werden und danach die Inkubation mit Inhibitor folgen. So ist gewährleistet, dass der Inhibitor nicht an andere Proteine mit ähnlicher Aktivität bindet.

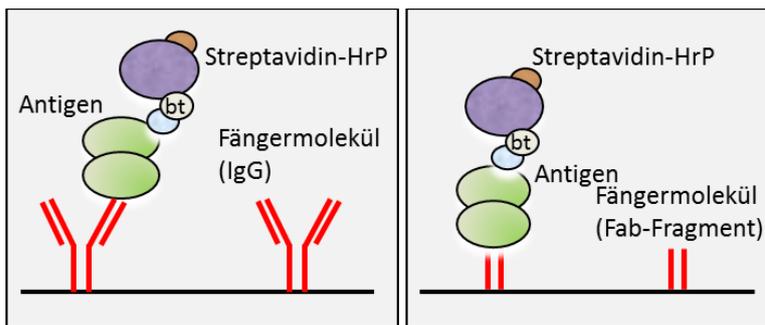


Abbildung 27: Assayformat mit BAY-12 (IgG und Fab-Fragment) als Fängerprotein und Inhibitor in Kombination mit Streptavidin-HRP als Detektionsmoleküle.

Eine 96-well Streptavidin Platte wird mit BAY-12-IgG und BAY-12-Fab beschichtet. Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma sowie depletiertem Plasma vorbereitet. Nach einem Waschschritt wird verdünnte Probe in jedes well gegeben. Nach erneutem Waschen folgt die Inkubation mit Inhibitor und daraufhin die Inkubation mit Streptavidin-HRP.

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der Messung der Antigen-Konzentration in dem Format mit BAY-12-IgG oder BAY-12-Fab als Fängermolekül. In diesem Format waren keine konzentrationsabhängigen Signale messbar. Womöglich, weil der interne Antikörper sowie sein Fab-Fragment am aktiven Zentrum des zu messenden Proteins binden. Dieses aktive Zentrum muss für die Bindung an den Inhibitor allerdings frei zugänglich sein.

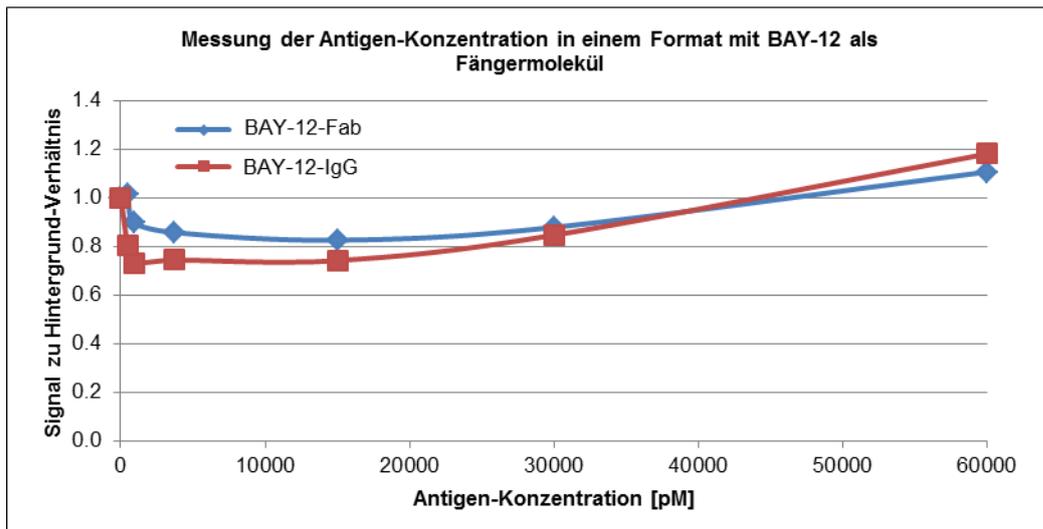


Abbildung 28: Messung von Antigen in einem Format mit BAY-12-Fab und BAY-12-IgG als Fängermolekül. Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma sowie depletiertem Plasma vorbereitet. Anschließend erfolgte die Messung in einem Format mit BAY-12-IgG oder BAY-12-Fab als Fängermolekül. Die Detektion erfolgte mittels Bindung durch den Inhibitor und Streptavidin-HRP. Dargestellt sind die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse in Abhängigkeit von Antigen-Konzentration und verwendetem Fängermolekül.

Ein weiteres Format ist in Abbildung 29 dargestellt. BAY-18-IgG wurde als Fängerprotein verwendet, um Antigen und Vorläuferprotein zu binden. Anschließend folgte die Inkubation mit einem fluorogenen Substrat (I-1575), welches durch das aktive Antigen umgesetzt wird.

In den zu messenden Proben werden sehr hohe Konzentrationen an therapeutischem Antikörper gegen das Antigen erwartet. Der Antikörper bindet am aktiven Zentrum des Proteins und verhindert dadurch dessen Aktivität. Damit eine Aktivitätsmessung gelingen kann, muss das aktive Antigen frei von therapeutischem Antikörper sein. Ein Standardverfahren zur Trennung von Antigen und Antikörper ist das Ansäuern der Probe. Durch ein saures Milieu in der Pufferlösung, die auch das Substrat enthält, kann eine Dissoziation des Antikörpers vom aktiven Protein erreicht werden. Damit ist das aktive Zentrum des Antigens frei, wodurch die Umsetzung des fluorogenen Substrates ermöglicht wird.

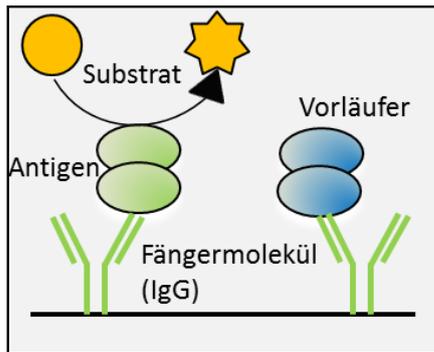


Abbildung 29: Assayformat mit BAY-18-IgG als Fängerprotein und Substratumsetzung.

Eine 96-well Streptavidin Platte wird mit BAY-18-IgG beschichtet. Nach einem Waschschrift wird verdünnte Probe in jedes well gegeben. Nach erneutem Waschen folgt die Inkubation mit fluorogenem Substrat.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Messung der Antigen-Konzentration in humanem Sammelplasma, mittels Substratumsetzung durch das Antigen. Eine sehr geringe Ansäuerung führte bereits zu einem großen Verlust an Aktivität. Aus diesem Grund wurde das Format nicht weiterentwickelt.

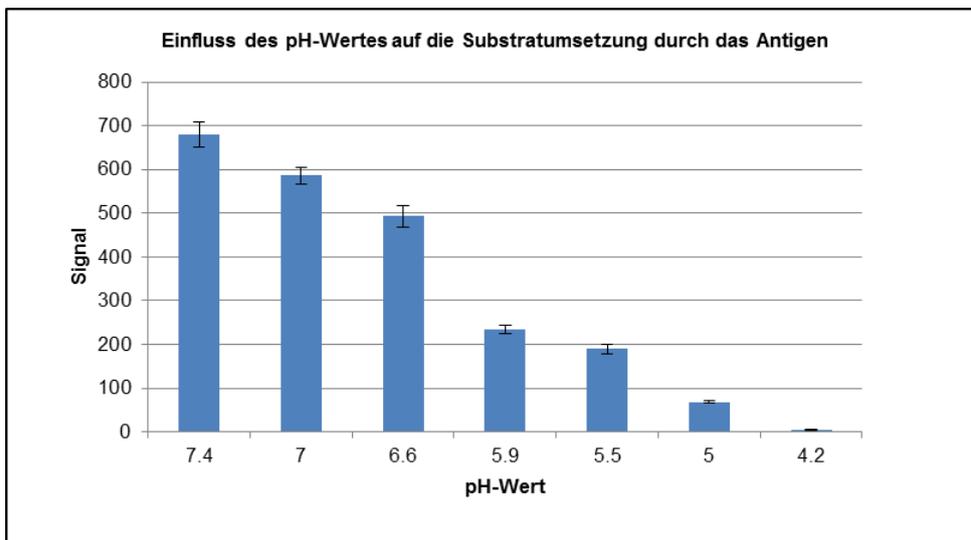


Abbildung 30: Messung von Antigen-Konzentration indirekt über Umsetzung eines fluorogenen Substrates.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma vorbereitet. Anschließend erfolgte die Messung in einem Format mit BAY-18-IgG oder BAY-18-Fab als Fängerprotein. Die Detektion erfolgte mittels Umsetzung eines fluorogenen Substrates. Dargestellt sind die Signale in Abhängigkeit von Antigen-Konzentration und pH-Wert.

Die Abweichungen im Signal für die höchste Antigen-Konzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Tabelle 5 dargestellt. Dabei ist das Signal für die Messung bei einem pH-Wert von 7.4, als Bezugswert herangezogen worden.

Tabelle 5: Einfluss des pH-Wertes auf die gemessenen Signale in der Aktivitätsmessung.

pH-Wert	Signal	Abweichung
7.4	679 (29)	0%
7.0	586 (18)	-14%
6.6	493 (25)	-27%
5.9	235 (10)	-65%
5.5	189 (12)	-72%
5.0	69 (3)	-90%
4.2	5 (2)	-99%

Dargestellt ist die sind die gemessenen Signale (Standardabweichung in Klammern) nach Substratumsetzung durch Antigen in einer Konzentration von 30 nM. Zusätzlich ist die Abweichung in Prozent in Vergleich zum Signal bei einem pH-Wert von 7.4 angegeben.

Das vierte Format, welches getestet wurde, ist in Abbildung 31 dargestellt. Als Fängerprotein wurde entweder BAY-18-Fab oder BAY-18-IgG verwendet. Es sollte zuerst das zu messende Antigen aus der Probe gebunden werden und danach sollte die Inkubation mit Inhibitor folgen.

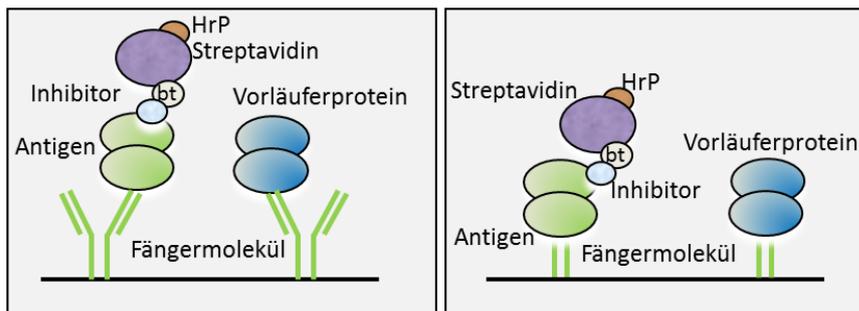


Abbildung 31: Assayformat mit BAY-18 (IgG und Fab-Fragment) als Fängerprotein und Inhibitor in Kombination mit Streptavidin-HRP als Detektionsmoleküle.

Eine 96-well Platte wird mit Fab-Fragment eines internen Antikörpers gegen Antigen und Vorläuferprotein beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Platte mit biotinyliertem Inhibitor inkubiert. Nach erneutem Waschen wird der biotinylierte Inhibitor durch Streptavidin-HRP gebunden und die Substratumsetzung gemessen.

Die Messung mit BAY-18 als Fängerprotein führte zu konzentrationsabhängigen Signaländerungen. Abbildung 32 zeigt die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse für die Messung der Antigen-Konzentration in einem Format mit BAY-18 als Fängerprotein. Dieses Format sollte aufgrund der konzentrationsabhängigen Signale weiterentwickelt werden.

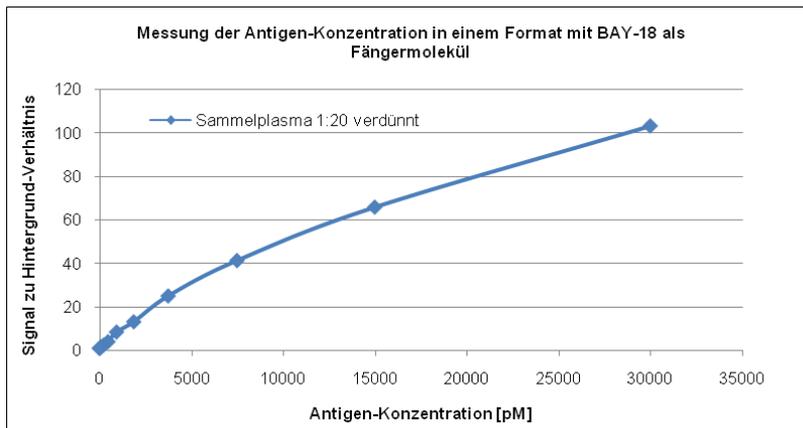


Abbildung 32: Messung von Antigen in einem Format mit BAY-18 als Fänger-molekül.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma vorbereitet. Anschließend erfolgte die Messung in einem Format mit BAY-18-IgG als Fänger-molekül. Die Detektion erfolgte mittels Bindung durch den Inhibitor und Streptavidin-HRP. Dargestellt sind die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse in Abhängigkeit von Antigen-Konzentration und verwendetem Fänger-molekül.

4.2.2 Zu optimierende Bedingungen

Um eine möglichst gute Sensitivität zu erreichen, ist es wichtig eine geeignete Konzentration an Fängerprotein zu verwenden. Diese muss im Laufe der Entwicklung ausgetestet werden. Ist die Konzentration an Fängerprotein zu hoch, können hohe Hintergrundsignale die eigentlichen Messsignale überlagern und so zu einer verminderten Sensitivität führen. Ist die Konzentration zu niedrig, kann ein eingeschränkter Arbeitsbereich der Messmethode die Folge sein. Außerdem muss eine geeignete Probenverdünnung gewährleistet sein. Diese darf nicht zu niedrig sein, da sonst Messinterferenzen aufgrund von Matrixeffekten entstehen könnten. Diese äußern sich in einer hohen Variabilität der Messwerte in Individualplasma. Ist die Probenverdünnung allerdings zu hoch, nimmt die Sensitivität in der Regel ab. Die Konzentration des Detektionsmoleküls muss ebenfalls ausgetestet werden. Diese muss ausreichend sein, um alle gebundenen Antigene zu binden. Allerdings könnte eine zu hohe Konzentration zu hohen Hintergrundsignalen in der Messung führen. Bei Messmethoden, in denen die Quantifizierung über Substratumsetzung erfolgt, ist es zudem wichtig, dass das Substrat im Überschuss dazugegeben wird, um nicht zum limitierenden Faktor bei der Aktivitätsmessung zu werden.

4.2.2.1 Ermitteln einer geeigneten ELISA-Prozedur

Das Format aus Abbildung 31 hat sich grundsätzlich als am geeignetsten für die Entwicklung der Messmethode herausgestellt. Nun sollte eine geeignete ELISA-Prozedur festgelegt werden. Dazu sollten zwei unterschiedliche Abläufe getestet werden. Zum einen sollte das ELISA-Format sequenziell mit entsprechenden Waschschrritten durchgeführt werden. Zum anderen wurde ein semi-homogener Ansatz

getestet, in welchem die 96-well Platte über Nacht mit Fängerprotein beschichtet wurde, und anschließend die restlichen Reagenzien in einer homogenen Lösung auf die gewaschene Platte gegeben wird. Abbildung 33 zeigt, dass für die Messung in Sammelplasma ein sog. „hook-Effekt“ auftritt. Das bedeutet, dass konzentrationsabhängig die Signale bis zu einem gewissen Punkt steigen, darüber hinaus aber wieder sinken. Dieser Effekt kommt in homogenen Ansätzen vor, wenn die Analyt-Konzentration so hoch ist, dass die Menge an Detektionsmolekül nicht ausreicht, um jedes Analytmolekül zu binden. Je höher die Konzentration des Analyten im Verhältnis zur Detektionsmolekül-Konzentration, desto höher die Menge an Analyt, der nicht an Detektionsmolekül gebunden ist. Gibt man den Reaktionsansatz dann auf eine mit Fängerprotein beschichtete Platte, dann besetzen viele der ungebundenen Analytmoleküle Bindestellen am Fängerprotein. Je mehr Fängerproteine auf diese Weise besetzt sind, desto geringer das gemessene Signal im Assay. Dies ist in dem hier gezeigten Versuch bei einer Antigen-Konzentration von ca. 15000 pM der Fall. Eine Konzentration darüber führt zu Signalabnahmen und infolgedessen zu einem sinkenden Signal zu Hintergrund-Verhältnis. Für die Messung in depletiertem Plasma ist kein „hook-Effekt“ zu erkennen. Allerdings konnten für die Proben ohne zusätzliches Antigen in depletiertem Plasma nur ca. 50 % des Signals im Vergleich zum Sammelplasma gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde durch stärkeres Verdünnen der Proben noch weiter verstärkt. Außerdem war der Effekt unabhängig von IgG oder Fab-Fragment als Fängerprotein und unabhängig von der Streptavidin-HRP Konzentration. Außerdem konnte keinerlei Vergleichbarkeit zwischen den gemessenen Signalen in depletiertem Plasma und denen in PBS-Puffer festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Diskrepanz in den gemessenen Signalen, zusammen mit dem auftretenden „hook-Effekt“ führte dazu, dass die Messmethode in der vorliegenden Arbeit im sequenziellen Format entwickelt wurde und nicht im homogenen Format.

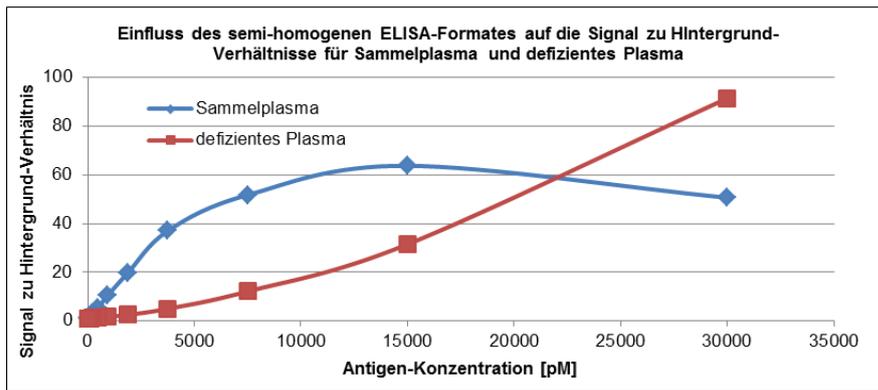


Abbildung 33: Einfluss des semi-homogenen ELISA-Formates auf die Messung.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration wurden in humanem Sammelplasma sowie depletiertem Plasma vorbereitet. Anschließend erfolgte die Messung mit dem semi-homogenen Format des ELISAs mit BAY18-IgG als Fänger-molekül. Dargestellt sind die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse in Abhängigkeit von Antigen-Konzentration und verwendeter Matrix.

4.2.2.2 Identifikation eines geeigneten Fängerproteins

Der interne IgG-Antikörper (BAY-18-IgG) sowie sein entsprechendes Fab-Fragment (BAY-18-Fab), sollten in ihrer Eignung als Fänger-molekül verglichen werden. Dazu wurden Proben mit unterschiedlichen Antigen-Konzentrationen in humanem Sammelplasma oder depletiertem Plasma vorbereitet. Die Proben wurden in einem Versuchsaufbau mit dem IgG-Antikörper als Fängerprotein und in einem zweiten Versuchsaufbau mit dem Fab-Fragment als Fängerprotein gemessen. Abbildung 34 (blau) zeigt das Ergebnis der Messung mit IgG-Antikörper als Fängerprotein. Mit steigenden Antigen-Konzentrationen steigt das Signal zu Hintergrund-Verhältnis an bis zu einem Maximum von ca. 43 bei einer Konzentration von 30000 pM Antigen in Sammelplasma. In depletiertem Plasma hingegen, steigen die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse mit steigender Antigen-Konzentration langsamer an, bis zu einem Maximum von ca. 18 bei einer Konzentration von 30000 pM.

Das Ergebnis der Messung mit Fab-Fragment als Fängerprotein ist in Abbildung 34 (rot) gezeigt. Mit steigenden Antigen-Konzentrationen steigt das Signal zu Hintergrund-Verhältnis an, bis zu einem Maximum von 24 bei einer Konzentration von 30000 pM Antigen in Sammelplasma. In depletiertem Plasma steigen die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse mit steigender Antigen-Konzentration vergleichbar an, bis zu einem Maximum von 28 bei einer Konzentration von 30000 pM.

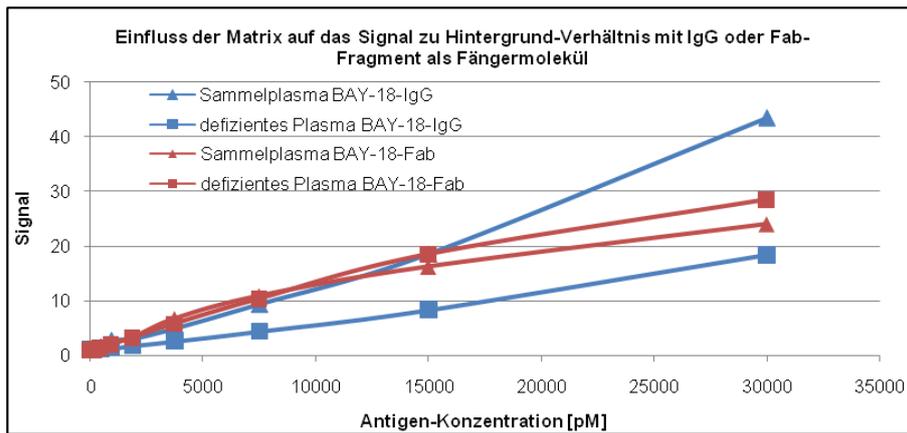


Abbildung 34: Einfluss des Fänger-moleküls auf die Messung in unterschiedlichen Matrizes.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentrationen in humanem Sammelplasma und depletiertem Plasma wurden gemessen. Als Fängerprotein wurde das entweder der IgG-Antikörper oder dessen Fab-Fragment verwendet.

Dargestellt ist das Signal zu Hintergrund-Verhältnis für unterschiedliche Antigen-Konzentrationen, in Abhängigkeit von Matrix.

Ähnlich wie in einem bereits getesteten Format (Abbildung 26) herrscht zwischen den Signal zu Hintergrund-Verhältnissen in Sammelplasma und depletiertem Plasma keine Vergleichbarkeit. Da depletiertes Plasma frei von Antigen- und Vorläuferprotein ist, sollten hier keinerlei Interferenzen auftreten. Erwartet wurde, dass zwischen den Matrizes Vergleichbarkeit herrscht. Da dies mit dem IgG als Fängerprotein nicht beobachtet wurde, wurde das Fab-Fragment des Antikörpers als Fängerprotein verwendet.

4.2.2.3 Ermitteln einer geeigneten Konzentration für Fängerprotein sowie Inhibitor

Nachdem das Fängerprotein feststeht, sollten unterschiedliche Konzentrationen des Fängerproteins in Kombination mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen ausgetestet werden. Um eine geeignete Konzentration des Fängerproteins zu ermitteln, wurde eine 96-well Platte mit hoher Protein-Bindekapazität mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fängerprotein beschichtet. Nach Inkubation mit Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentration in humanem Plasma erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Inhibitor. Die eingesetzte Menge an Inhibitor sollte ausreichend sein, um Antigen sättigend binden zu können. Zusätzlich wurde noch eine zweite etwas geringere Konzentration ausgetestet, um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Inhibitor-Konzentration in Folgeversuchen eher weiter erhöht oder reduziert werden sollte. Abbildung 35 zeigt, dass eine Konzentration von 10 µg/ml Fängerprotein zum besten Signal zu Hintergrund-Verhältnis führt. Dabei ist auch festzustellen, dass es zwischen den getesteten Inhibitor-Konzentrationen keine erheblichen Unterschiede gibt.

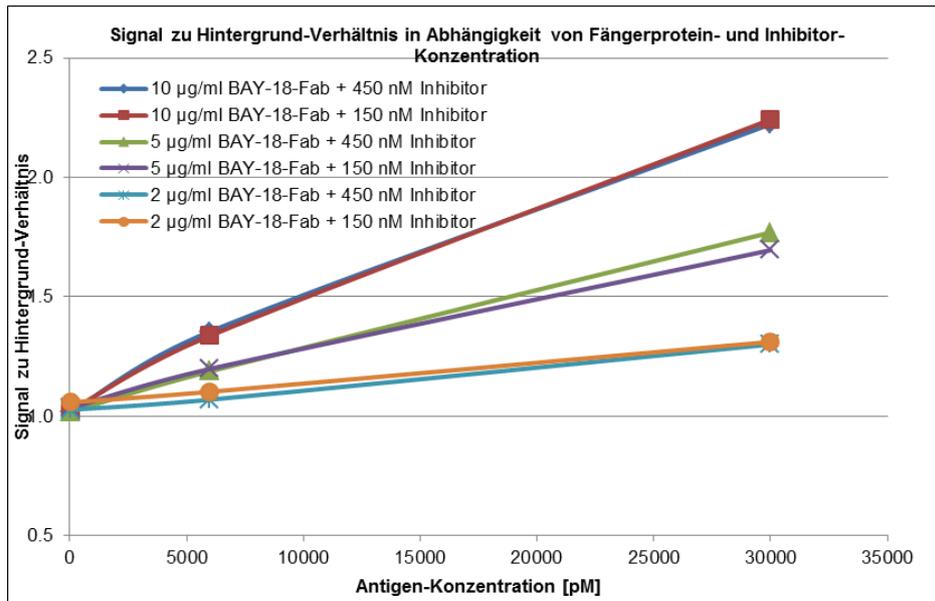


Abbildung 35: Einfluss von Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis getestet auf einer Platte mit hoher Bindekapazität.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentrationen wurden gemessen. Dabei wurde die Konzentration des Fängerproteins variiert (10 µg/ml, 5 µg/ml und 2 µg/ml). Außerdem wurde zusätzlich Inhibitor in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet (450 nM und 150 nM). Dargestellt ist das Signal zu Hintergrund-Verhältnis für ausgewählte Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentrationen. Gemessen wurde auf einer 96-well Platte mit hoher Bindekapazität.

Der Versuch wurde auf einer Platte mit mittlerer Protein-Bindekapazität wiederholt, um herauszufinden, ob es Unterschiede zwischen den Plattengibt. Abbildung 36 zeigt, dass auch hier die beste Kombination aus 10 µg/ml Fängerprotein und 450 nM Inhibitor besteht. Vergleicht man die Signal zu Hintergrund-Verhältnisse, mit denen auf der Platte mit hoher Bindekapazität, wird deutlich, dass die Platte mit mittlerer Bindekapazität zu schlechteren Verhältnissen führt.

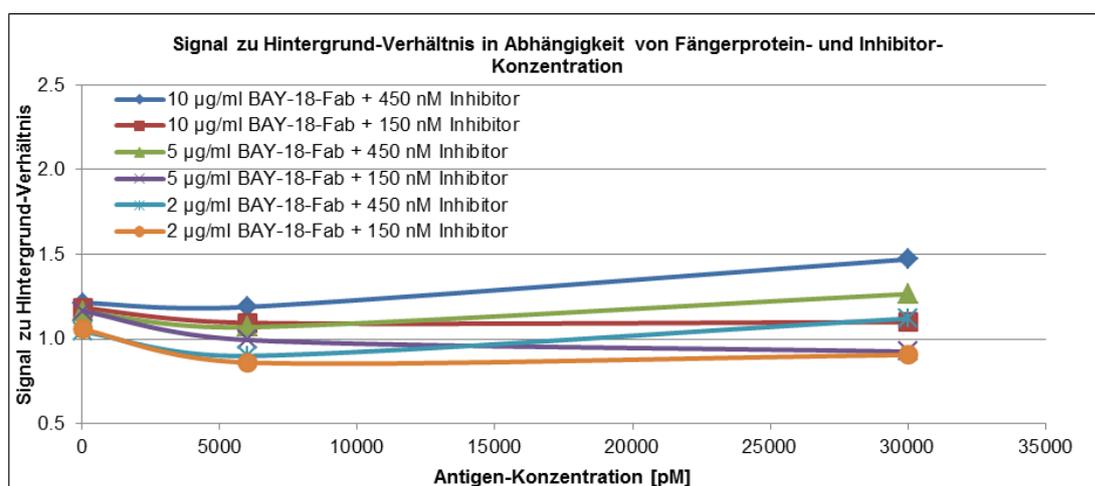


Abbildung 36: Einfluss von Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis getestet auf einer Platte mit mittlerer Bindekapazität.

Proben unterschiedlicher Antigen-Konzentrationen wurden gemessen. Dabei wurde die Konzentration des Fängerproteins variiert (10 µg/ml, 5 µg/ml und 2 µg/ml). Außerdem wurde zusätzlich Inhibitor in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet (450 nM und 150 nM). Dargestellt ist das Signal zu Hintergrund-Verhältnis für ausgewählte Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentrationen. Gemessen wurde auf einer 96-well Platte mit mittlerer Bindekapazität.

4.2.2.4 Testung einer geeigneten Probenverdünnung

Nachdem eine geeignete Konzentration des Fängerproteins ermittelt wurde, sollten verschiedene Probenverdünnungen auf ihren Einfluss auf das Signal zu Hintergrund-Verhältnis getestet werden. Da eine Verringerung der Konzentration von Inhibitor wie bereits in Kapitel 4.2.2.3 gezeigt, keinerlei Vorteile hatte, sollte zusätzlich eine erhöhte Konzentration von Inhibitor untersucht werden. Abbildung 37 zeigt, dass eine Inhibitor-Konzentration von 1350 nM, unabhängig von der Probenverdünnung immer zu einem niedrigeren Signal zu Hintergrund-Verhältnis führte. Die Konzentration von 450 nM Inhibitor in Kombination mit den getesteten Probenverdünnungen hat sich als geeignet herausgestellt. Eine Probenverdünnung von 1:50 und von 1:100 führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Es wurde für die höchste getestete Fängerprotein-Konzentration ein Signal zu Hintergrundverhältnis von ca. 25 ermittelt.

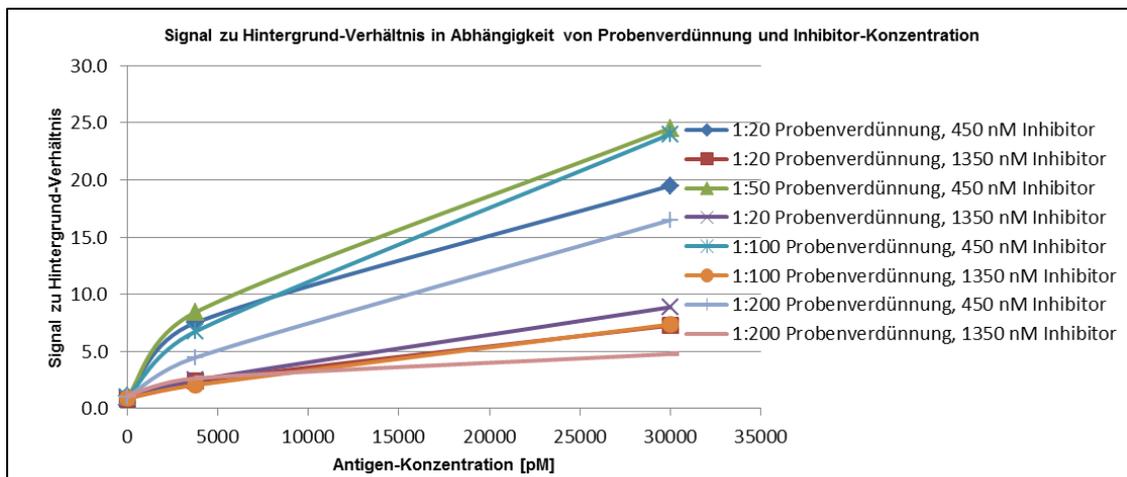


Abbildung 37: Einfluss von Probenverdünnung sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis.

Proben unterschiedlicher Fängerprotein-Konzentrationen wurden 1:20, 1:50, 1:100 oder 1:200 verdünnt und gemessen. Es wurde in jeder Verdünnungsgruppe 450 nM Inhibitor sowie 1350 nM Inhibitor für die Messung verwendet. Dargestellt ist das Signal zu Hintergrund-Verhältnis für ausgewählte Probenverdünnungen sowie unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen.

4.2.3 Arbeitsbereich und Sensitivität

Unter den Bedingungen, die sich als am geeignetsten herausgestellt haben, wurden Kalibrierproben gemessen, um den vorläufigen Arbeitsbereich und die Sensitivität der Messmethode abzuleiten. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis der Messung.

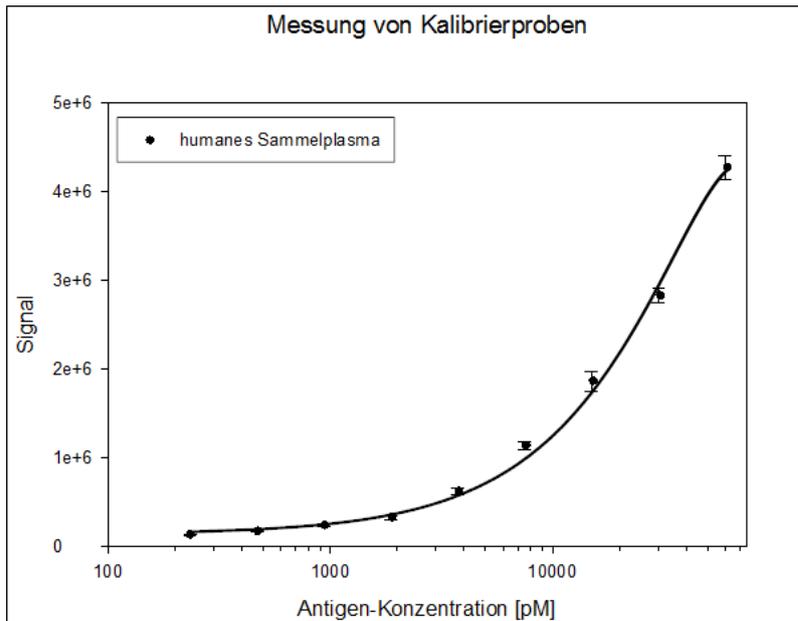


Abbildung 38: Messung von Kalibrierproben um Sensitivität sowie Arbeitsbereich abzuleiten.

Humanes Sammelplasma wurde mit Antigen in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Dargestellt sind die gemessenen Signale für steigende Antigen-Konzentrationen.

4.2.4 Potentielle Störeffekte

Nachdem das Format grundsätzlich feststand und geeignete Bedingungen gefunden wurden, sollten mögliche Störeffekte auf die Messmethode abgeklärt werden. Da der Biomarker Assay für die Messung klinischer Proben entwickelt werden sollte, muss er bestimmte Anforderungen erfüllen. Es werden hohe Konzentrationen an therapeutischem Antikörper gegen das Antigen erwartet, also muss die Messmethode diese tolerieren können. Außerdem findet sich in humanem Plasma ein mehr als tausendfacher Überschuss an Vorläuferprotein, welcher die Messung aufgrund der Ähnlichkeit zum Antigen stören könnte. Abbildung 39 zeigt den Einfluss von unterschiedlichen therapeutischen Antikörper-Konzentrationen (BAY) auf die gemessenen Signale. Es ist zu erkennen, dass in den drei niedrigsten getesteten Antigen-Konzentrationen (468.75 pM, 937.5 pM und 3750 pM), die eingesetzten BAY-Konzentrationen von 1 µg/ml sowie 10 µg/ml keinen Einfluss auf die Messung hat. Die Abweichungen relativ zu Proben, welche kein BAY enthalten liegen innerhalb $\pm 20\%$. 1 µg/ml BAY hat in der 7500 pM Probe eine Abweichung von über -20% zur Folge, allerdings ist dieser Effekt in der 30000 pM Probe nicht mehr zu erkennen. 10 µg/ml BAY führen in der 7500 pM Probe zu einer Abweichung oberhalb von 20% . Dieser Effekt ist in der 30000 pM Probe mit fast 40% noch deutlicher zu erkennen. Eine BAY-Konzentration von 100 µg/ml hat in den beiden niedrigsten Antigen-Konzentrationen keinen Einfluss, wohingegen in der 937.5 pM Probe eine Abweichung von 30% gemessen wurde. In den Proben mit Antigen-Konzentrationen von 3750 pM, 7500 pM

und 30000 pM führen 100 µg/ml BAY zu einer Signalzunahme von 70 %, 90 % bzw. 110 % im Vergleich zur Kontrolle. Hohe BAY-Konzentrationen können also zu einer Überschätzung der Antigen-Konzentration führen.

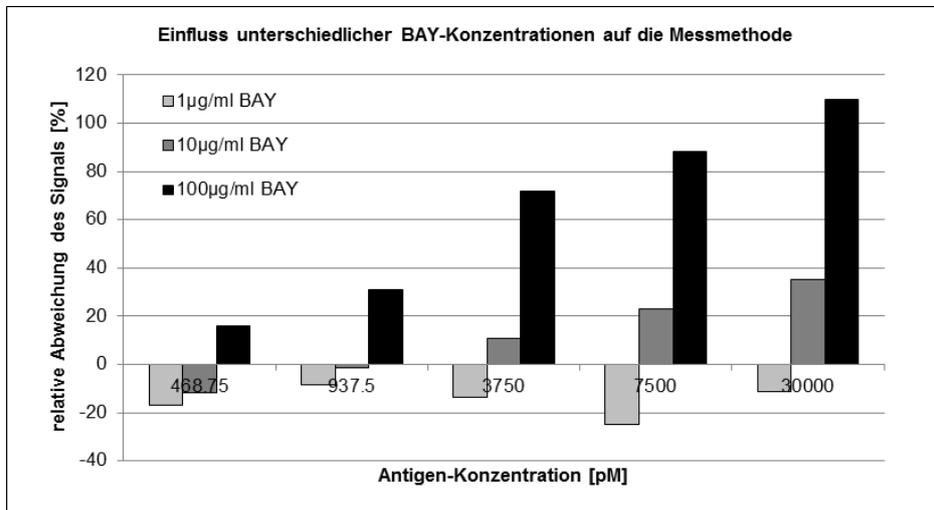


Abbildung 39: Einfluss unterschiedlicher BAY-Konzentrationen auf die Messmethode.

Humanes Plasma wurde über Nacht bei 4°C mit Antigenen oder Antigenen zusammen mit BAY inkubiert und anschließend vermessen. Dargestellt ist die relative Abweichung der Antigen-Konzentration, in Abhängigkeit von der BAY-Konzentration. Die Abweichung ist bezogen auf die Kalibrierproben, welche kein zusätzliches Antigen enthalten.

Weiterhin wurde der Einfluss des Vorläuferproteins auf die Messung untersucht. Dabei ist festzustellen, dass die gemessenen Signale für Kalibrierproben, welche zusätzlich 60 nM Vorläuferprotein enthalten, um ca. 28 % reduziert sind. Dieser Effekt ist in Abbildung 40 grafisch dargestellt.

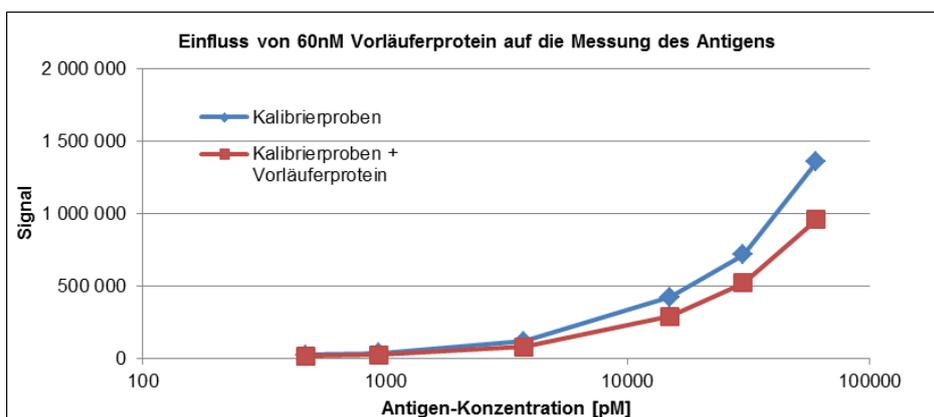


Abbildung 40: Einfluss von Vorläuferprotein auf die Messmethode.

Humanes Plasma wurde über Nacht bei 4°C mit Vorläuferprotein inkubiert und anschließend vermessen. Dargestellt sind die Signale für Kalibrierproben (blau) sowie Kalibrierproben, die mit Vorläuferprotein versetzt wurden (rot).

Für die rückberechnete Konzentration wird der Effekt geringer sein, da dieser im dynamischen Bereich der Messmethode aufgetreten ist. Eine relativ hohe Signaländerung geht in diesem Bereich mit einer relativ geringen Konzentrationsänderung einher. Je höher die Konzentration des Vorläuferproteins, desto mehr Fänger-moleküle werden durch das Vorläuferprotein gebunden. Diese stehen in der

Folge nicht mehr für die Bindung an das Antigen zur Verfügung, wodurch die gemessene Konzentration unterschätzt werden kann.

4.3 Methodenentwicklung für eine Methode zur Messung von freiem monoklonalem Antikörper

Bei therapeutischen Antikörpern, welche gegen ein lösliches Protein im Blut gerichtet sind, herrscht ein Gleichgewicht zwischen freiem ungebundenen Antikörper, dem löslichen Protein und dem Komplex aus Antikörper und dem löslichen Protein (Kuang et al., 2010). Abbildung 41 zeigt schematisch das Bindungsgleichgewicht in einer zu messenden Probe.

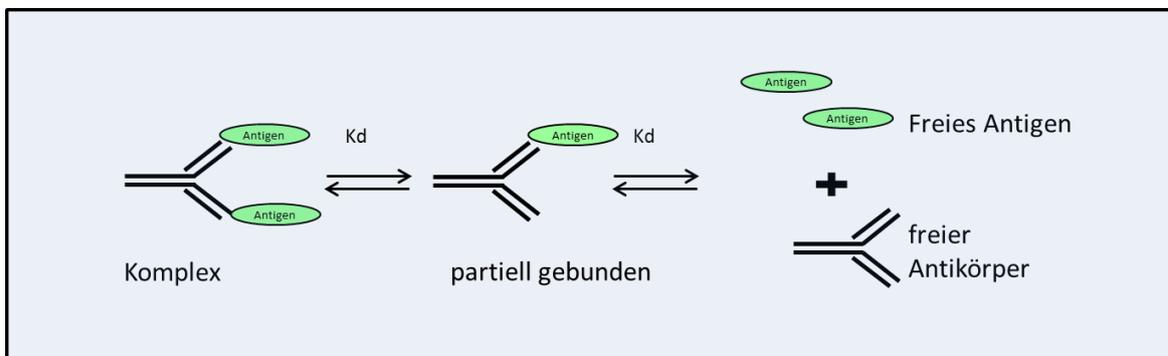


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Bindungsgleichgewichtes in einer zu messenden Probe.

In der Probe liegt der zu quantifizierende Antikörper gebunden an Antigen, teilweise gebunden und frei vor. Eine Methode zur Messung der freien Fraktion des Antikörpers in Plasma wird typischerweise im ELISA-Format entwickelt.

Der zu quantifizierende monoklonale Antikörper ist gegen ein im Blutplasma vorhandenes, lösliches Protein gerichtet. Der freie, noch ungebundene Antikörper, kann pharmakologische Wirkungen entfalten und ist daher häufig Ziel von pharmakokinetischen Messungen (Lee et al., 2011). Des Weiteren kann die Quantifizierung des ungebundenen Antikörpers zum Verständnis des Bindungsgleichgewichtes sowie für die Berechnung des Anteils an Komplex aus Antikörper und Antigen beitragen. Typischerweise wird eine Methode für die Messung von freiem, ungebundenen Antikörper im ELISA-Format entwickelt (Yang and Quarmby, 2011). Dabei ist es wichtig, dass die Quantifizierung mittels Rückberechnung gegen eine Kalibrationskurve aus antigenfreier Matrix stattfindet. Erhöhte Antigenkonzentrationen sollten zu mehr gebundenen Antikörper-Molekülen in der Probe führen und dementsprechend zu einer verringerten Konzentration von freiem Antikörper in der Messung. Eine Kalibrationskurve in Matrix, muss also frei von Antigen sein, damit die eingesetzten Antikörper-Konzentrationen auch den freien Antikörper-Konzentrationen entsprechen. Nur so kann mittels Rückberechnung die freie Antikörper-Konzentration in unbekanntem Proben bestimmt werden. Würden die Proben

für die Kalibrationskurve das Antigen enthalten, würden die eingesetzten Antikörper-Konzentrationen nicht den freien Antikörper-Konzentrationen entsprechen (vgl. Abbildung 9). Die freie Konzentration des Antikörpers würde nach Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes unterhalb der eingesetzten Konzentration liegen. Bei Messung unbekannter Proben und Rückberechnung gegen eine solche Kalibrationskurve, würde ein gemessenes Signal fälschlicherweise einer Analyt-Konzentration zugeordnet werden, die über der freien Konzentration des Antikörpers liegt. Daraus würde eine Überquantifizierung der freien Fraktion des Antikörpers folgen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine solche, bereits entwickelte ELISA-Methode für die Messung eines freien Antikörpers auf weitere Messplattformen zu übertragen. Dabei sollten die Plattformen miteinander verglichen werden, um herauszufinden ob der Transfer einen Vorteil bietet. Der Vergleich sollte Hinweise darauf geben, auf welche Plattform man sich bei der zukünftigen Methodenentwicklung, zur Messung von freiem Antikörper, fokussieren sollte. Verglichen werden sollten unter anderem die Sensitivität, der Arbeitsbereich, die notwendige Probenverdünnung, das benötigte Probenvolumen sowie die Interferenz mit Antigen.

4.3.1 ELISA zur Messung von freiem Antikörper

Der ELISA zur Messung von freiem Antikörper, welcher auf die anderen Plattformen übertragen werden sollte, ist ein bereits entwickelter Antigen-Brücken ELISA. Der zu messende Antikörper wird durch biotinyliertes Antigen, mit welchem eine Streptavidin-Platte beschichtet wird, gebunden. Anschließend erfolgt die Detektion mittels sulfogelabelten Antigens. Die Proben werden vor der Messung 1:50 mit Assaypuffer verdünnt. Die Berechnung der Konzentrationen an freiem Analyten erfolgt mittels Rückberechnung gegen eine Kalibrationskurve in Matrix, die kein Antigen enthält. Abbildung 42 zeigt schematisch den Aufbau des ELISA-Formates.

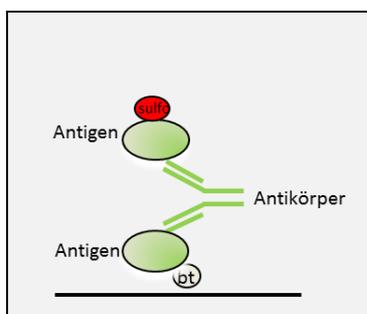


Abbildung 42: Aufbau des ELISA-Formates.

Eine 96-well Streptavidin-Platte wird nach erfolgter Blockierung und anschließendem Waschschrift mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach erneutem Waschschrift wird die Platte mit sulfogelabeltem Antigen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird MSD-Lesepuffer in die Kavitäten gegeben. Die Messung erfolgt sofort.

Aufgrund des Formates ist eine Quantifizierung des Antikörpers nur dann möglich, wenn beide Antigen-Bindestellen des Antikörpers ungebunden vorliegen oder das in Abbildung 41 dargestellte Bindungsgleichgewicht durch die Methoden-Prozedur in Richtung Dissoziation verschoben wird. Nur dann kann der Analyt von dem biotinylierten Antigen und anschließend von dem sulfo-gelabelten Antigen gebunden werden, um anschließend zu einem Signal zu führen. Dabei ist eine Beeinflussung des Bindungsgleichgewichtes, durch die Methode, nicht erwünscht und zu vermeiden. Enthält die Probe zusätzlich zum Antikörper auch das Antigen, ist es möglich, dass einige Analyt-Moleküle an Antigen gebunden vorliegen. Wenn eine Bindestelle oder beide Bindestellen des Antikörpers mit Antigen besetzt sind, sollte eine Quantifizierung in diesem Format nicht mehr möglich sein. Folglich ist zu erwarten, dass in Anwesenheit von Antigen ein geringeres Signal für den freien Analyten gemessen wird. Abbildung 43 zeigt die Messung steigender Analytkonzentrationen in antigenfreier Matrix (blau). Im Vergleich dazu ist die Messung der entsprechenden Proben dargestellt, die zusätzlich physiologische Antigen-Konzentration enthalten (rot). Für diese Proben ist, wie erwartet, das Signal für die Analytkonzentrationen teilweise reduziert. Die rückberechnete Konzentration der Proben, die nur Antikörper enthalten (Kalibrierproben) und die Konzentrationen der Proben, die zusätzlich Antigen enthalten sind in der Tabelle 6 dargestellt. Die Abweichungen der beiden Probengruppen sind ebenfalls dargestellt. Für die unteren Konzentrationen des freien Antikörpers ist eine Abweichung von 100 % festgestellt worden. Die rückberechneten Konzentrationen lagen hier unter der Quantifizierungsgrenze. Für die nominalen Konzentrationen von 625 µg/L und 1250 µg/L, ist eine Abweichung der Proben-Konzentration, die Antigen enthalten, von 50 % und 30 % festgestellt worden. Zwischen Proben mit höherer Antikörper-Konzentration herrscht Vergleichbarkeit. Die ELISA-Methode reagiert also bereits auf physiologische Antigen-Konzentrationen, wie erwartet mit einer verminderten freien Antikörper-Konzentration. In der Auswertung wurde der Wert des Signals einer Probe ohne Antikörper (Leerwert) von den Werten der Signale der gemessenen Proben abgezogen. So wurde auch für die folgenden Messungen auf den weiteren Plattformen verfahren.

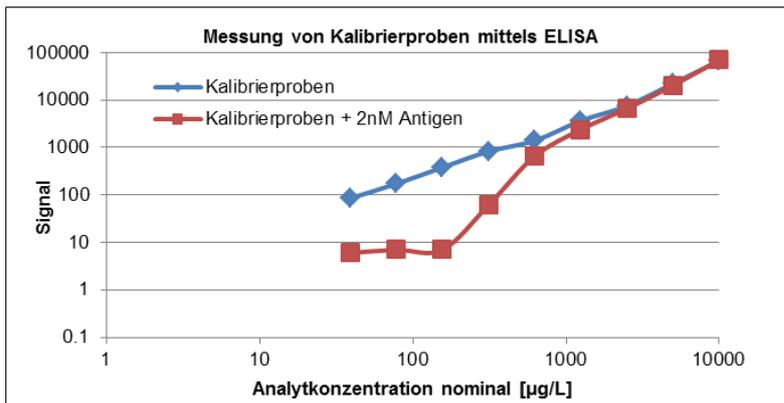


Abbildung 43: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Signale auf der ELISA-Plattform. Proben unterschiedlicher Analytkonzentrationen, in antigenfreier Matrix, wurden gemessen (blau). Im Vergleich dazu wurden Proben unterschiedlicher Analyt-Konzentration in antigenfreier Matrix zusätzlich mit physiologischer Antigenkonzentration versetzt, bei 4°C über Nacht inkubiert und ebenfalls gemessen (rot). Dargestellt sind die Signale für die Proben, welche nur Antikörper enthalten (blau) und Proben die zusätzlich Antigen enthalten (rot).

Tabelle 6: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der ELISA-Plattform.

Analytkonzentration final [µg/L]			
Kalibrierproben	+ 2 nM Antigen	Abweichung [%]	
36	0	100	
75	0	100	
164	0	100	
348	0	100	
563	279	50	
1308	912	30	
2326	2104	10	
5039	4735	6	
10034	10321	0	

Dargestellt sind die rückberechneten Konzentrationen der Proben, die nur Antikörper enthalten (Kalibrierproben) und die Konzentrationen der Proben, die zusätzlich Antigen enthalten. Die Abweichung der Konzentrationen ist in Prozent dargestellt.

Um herauszufinden, ob die Methode tatsächlich die freie Antikörperfraktion misst und nicht die Gesamtkonzentration des Antikörpers, wird von Lee und Kollegen (Lee et al., 2011) eine Interferenz-Testung vorgeschlagen. Dabei werden unterschiedliche molare Verhältnisse von Antigen zu Antikörper hergestellt und inkubiert, sodass sich ein Gleichgewicht einstellen kann. Anschließend wird das molare Verhältnis gegen die Inhibition in Prozent aufgetragen. Nach Lee und Kollegen würde für eine Messmethode zur Messung der freien Antikörperfraktion die IC_{50} bei einem Verhältnis von annäherungsweise 1 (Antigen zu monoklonalem Antikörper) erreicht sein. Dies ist abhängig vom Wert der Dissoziationskonstante. Bei einer Messmethode zur Messung der Gesamt-Analytkonzentration hingegen, liegt das Verhältnis, im Beispiel der Arbeit von Lee und Kollegen, bei einem 300-fachen Überschuss an Antigen für eine Inhibition der Konzentration um 50 %, wohingegen bei einer Messmethode zur Messung der freien Antikörperfraktion die IC_{50} bei einem molaren Verhältnis von Ligand zu

Antikörper von 0.7 erreicht wurde Abbildung 44 zeigt das Ergebnis der Messung. Die gestrichelte Linie stellt den Erwartungswert dar, welcher mittels Bindungssimulation für die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien mit entsprechendem Wert für die Dissoziationskonstante ermittelt wurde. Die IC_{50} wird in dieser Arbeit bei einem molaren Verhältnis von Antigen zu Antikörper von 0.4 erreicht. Dies bedeutet, dass bei einem Verhältnis von Antigen zu Analyt von 0.4 die ermittelte Konzentration des freien Analyten um 50 % reduziert ist. Die ermittelte Inhibition in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse von Antigen zu Antikörper entspricht dem Erwartungswert.

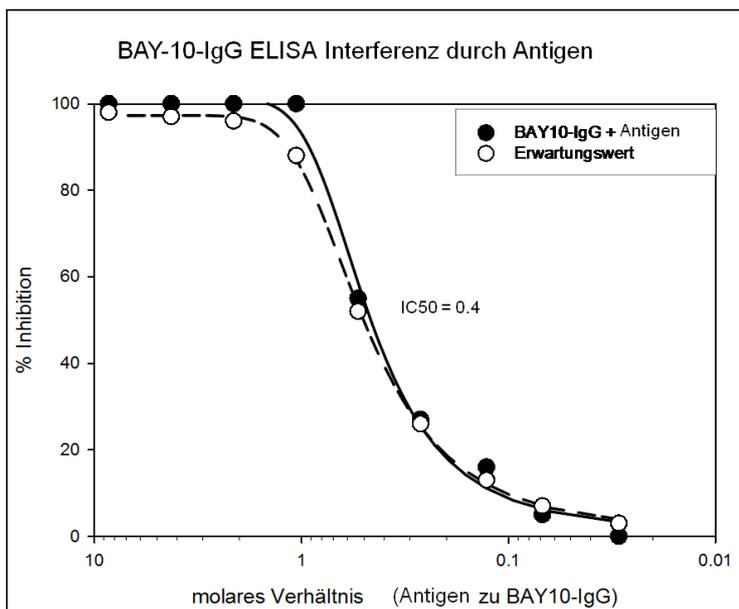


Abbildung 44: Interferenz-Testung des BAY-10-IgG ELISAs durch das Antigen.

Proben unterschiedlicher molarer Verhältnisse von Antigen zu BAY-10-IgG wurden inkubiert und anschließend im ELISA vermessen. Dargestellt ist die Inhibition der ermittelten BAY-10-IgG Konzentration in Prozent in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse (schwarze durchgezogene Linie). Zusätzlich ist der mittels Bindungssimulation ermittelte Erwartungswert aufgetragen (gestrichelte Linie).

4.3.2 Gyrolab zur Messung von freiem Antikörper

Der beschriebene ELISA sollte zunächst auf die Gyrolab-Plattform übertragen werden. Der zu messende Antikörper wird hier durch biotinyliertes Antigen, mit welchem Streptavidin-Kügelchen in der Gyrolab-CD beschichtet werden, gebunden. Anschließend erfolgt die Detektion mittels Alexa-Fluor 647 gelabeltem Antigen. Die Proben werden vor der Messung 1:5 mit Assaypuffer verdünnt. Die Berechnung der Konzentrationen an freiem Analyten erfolgt mittels Rückberechnung gegen eine Kalibrationskurve in Matrix, die frei von Antigen ist. Abbildung 45 zeigt schematisch den Aufbau des Gyrolab-Formates.

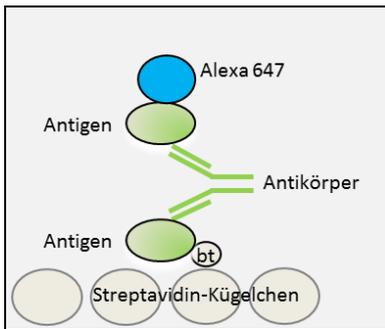


Abbildung 45: Aufbau des Gyrolab-Formates.

Streptavidin-Kügelchen in der Bioaffy CD werden mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach einem weiteren Waschschrift wird die CD mit Alexa-gelabeltem Antigen behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgt die Messung.

Aufgrund des Formates ist eine Quantifizierung des Antikörpers, ähnlich wie im ELISA, nur dann möglich, wenn beide Antigen-Bindestellen des Antikörpers ungebunden vorliegen oder das Bindungsgleichgewicht in Richtung Dissoziation verschoben wird. Es ist zu erwarten, dass in Anwesenheit von Antigen, ein geringeres Signal für den Analyten gemessen wird. Abbildung 46 zeigt die Messung steigender Analytkonzentrationen in antigenfreier Matrix (blau). Im Vergleich dazu ist die Messung der entsprechenden Proben dargestellt, die zusätzlich physiologische Antigen-Konzentration enthalten (rot). Für diese Proben ist das Signal für die Analytkonzentration teilweise reduziert. Auch die Gyrolab-Methode reagiert also bereits auf physiologische Antigen-Konzentrationen. Antigen in Proben mit einer nominalen Konzentration von 156 $\mu\text{g/L}$ bzw. 313 $\mu\text{g/L}$ führte zu einer rückberechneten Konzentration unterhalb der Quantifizierungsgrenze (Tabelle 7). Für die folgenden Konzentrationen ist eine Abweichung von 41 % und 22 % festgestellt worden. Wie der ELISA reagiert auch die Gyrolab-Methode auf physiologische Antigen-Konzentrationen mit verminderten Antikörper-Konzentrationen, wie für eine Methode zur Messung des freien Antikörpers zu erwarten.

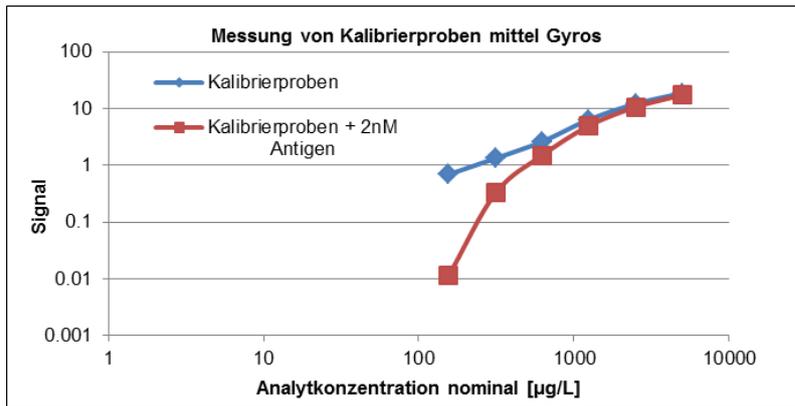


Abbildung 46: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Messung von ungebundenem Antikörper auf der Gyrolab-Plattform.

Proben unterschiedlicher Analytkonzentrationen, in antigenfreier Matrix, wurden gemessen. Im Vergleich dazu wurden Proben unterschiedlicher Analyt-Konzentration in antigenfreier Matrix zusätzlich mit physiologischer Antigen-Konzentration versetzt, bei 4°C über Nacht inkubiert und ebenfalls gemessen. Dargestellt sind die Signale für die Proben, welche nur Antikörper enthalten (blau) und Proben die zusätzlich Antigen enthalten (rot).

Tabelle 7: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Gyrolab-Plattform.

Analytkonzentration final [µg/L]		
Kalibrierproben	+ 2 nM Antigen	Abweichung [%]
162	0	100
300	0	100
564	335	41
1335	1039	22
2658	2269	15
4653	4157	0

Dargestellt sind die rückberechneten Konzentrationen der Proben, die nur Antikörper enthalten (Kalibrierproben) und die Konzentrationen der Proben, die zusätzlich Antigen enthalten. Die Abweichung der Konzentrationen ist in Prozent dargestellt.

Abbildung 47 zeigt das Ergebnis der Messung. Die gestrichelte Linie stellt den Erwartungswert dar, welcher mittels Bindungssimulation ermittelt wurde. Die IC_{50} wird hier bei einem molaren Verhältnis von Antigen zu Antikörper von 0.6 erreicht. Dies bedeutet, dass bei einem Verhältnis von Antigen zu Analyt von 0.6 die ermittelte Konzentration des freien Analyten um 50 % reduziert ist. Die ermittelte Inhibition in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse von Antigen zu Antikörper entspricht dem Erwartungswert.

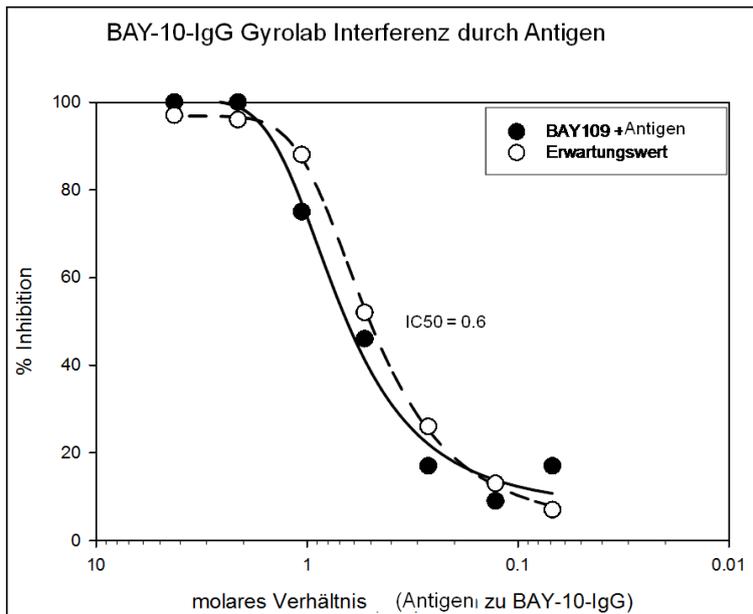


Abbildung 47: Interferenz-Testung der BAY-10-IgG Messung durch das Antigen auf der Gyrolab-Plattform. Proben unterschiedlicher molarer Verhältnisse von Antigen zu BAY-10-IgG wurden inkubiert und anschließend auf der Gyrolab Plattform vermessen. Dargestellt ist die Inhibition der ermittelten BAY-10-IgG Konzentration in Prozent in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse (schwarze durchgezogene Linie). Zusätzlich ist der mittels Bindungssimulation ermittelte Erwartungswert aufgetragen (gestrichelte Linie).

4.3.3 Octet zur Messung von freiem Antikörper

Der beschriebene ELISA sollte zusätzlich auf die Octet-Plattform übertragen werden. Auf der Octet-Plattform wurde biotinyliertes Antigen an Streptavidin-Nadeln gebunden. Danach erfolgte die Inkubation mit 1:2 verdünnter Probe, welche den zu quantifizierenden Antikörper enthält. In einem nächsten Schritt sollte die Inkubation mit Antigen erfolgen. Dieses Antigen-Brücken Format funktionierte auf dieser Plattform nicht. Da aber schon bei der Assoziation des Fänger-Antigens mit Analyten aus der Probe konzentrationsabhängige Assoziationskinetiken gemessen wurden, sollte dieses Antigen-Fänger Format näher untersucht werden. Dieses Format ist schematisch in Abbildung 48 dargestellt.

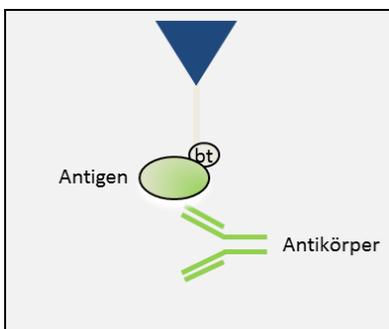


Abbildung 48: Aufbau des Octet Antigen-Fänger Formates.

Streptavidin-beschichtete Glasnadeln werden nach erfolgter Blockierung und anschließendem Waschschrift mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation der Proben. Die Messung mittels Bio-Layer-Interferometrie erfolgt in Echtzeit.

Abbildung 49 zeigt die Messung steigender Analytkonzentrationen in antigenfreier Matrix (blau). Im Vergleich dazu ist die Messung der entsprechenden Proben dargestellt, die zusätzlich physiologische Antigen-Konzentration enthalten (rot). In Tabelle 8 sind die Analytkonzentrationen dargestellt. Für die am niedrigsten konzentrierte Probe liegt das Signal für die Analytkonzentrationen unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Außerdem wurde in der höchsten Konzentration, die zusätzlich Antigen enthält eine Konzentrations-Abweichung von über 30 % im Vergleich zur Kalibrierprobe, festgestellt. Auch in der Probe, die nominal 5000 $\mu\text{g/L}$ Antikörper enthält, weicht die entsprechende Probe, die zusätzlich Antigen enthält, um 26 % im Vergleich zur Kalibrierprobe ab. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Kalibrierproben in dieser Octet-Messung nicht in derselben Platte befanden, wie die Proben, welche zusätzlich 2 nM Antigen enthielten. Die Signale der Messungen in den beiden hohen Konzentrationen waren ca. 12 % geringer als die Signale der Kalibrierproben (Daten nicht gezeigt). Für die Rückberechnung der Konzentration ist dieser Effektentsprechend größer. Da aber für die Nominal-Konzentrationen von 1250 $\mu\text{g/L}$ und 2500 $\mu\text{g/L}$ Vergleichbarkeit zwischen den Kalibrierproben und den Proben, die Antigen enthalten, herrscht, sollten die Daten dennoch für den Vergleich herangezogen werden. Diese Octet-Methode reagiert also auf physiologische Antigen-Konzentrationen. In diesem Format muss der zu quantifizierende Antikörper nicht komplett ungebunden vorliegen, um zu einem Signal zu führen. Es muss nur eine der beiden Bindestellen des Antikörpers frei sein, damit eine Bindung an das biotinylierte Fänger-Antigen stattfinden kann. Somit ist es möglich, dass nicht nur die freie Fraktion des Antikörpers gemessen wird, sondern auch die partiell freie/ partiell gebundene Fraktion. Dadurch könnte eine geringe Menge des Antigens in der Messung toleriert werden.

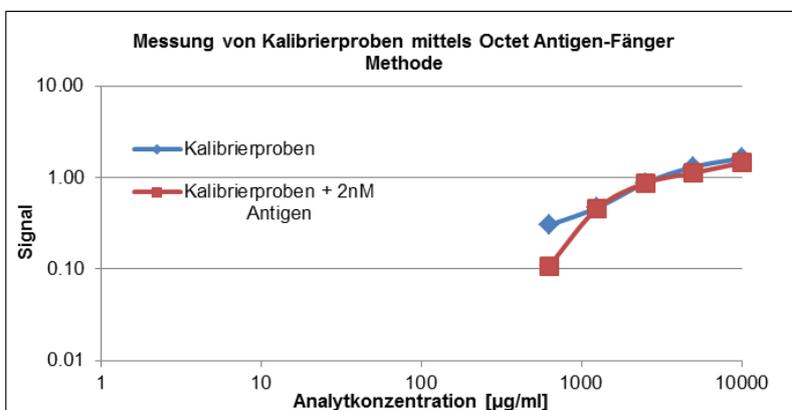


Abbildung 49: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf den Octet Antigen-Fänger Format. Proben unterschiedlicher Analytkonzentrationen, in antigenfreier Matrix, wurden gemessen. Im Vergleich dazu wurden Proben unterschiedlicher Analyt-Konzentration in antigenfreier Matrix zusätzlich mit physiologischer

Antigenkonzentration versetzt, bei 4°C über Nacht inkubiert und ebenfalls gemessen. Dargestellt sind die Signale für die Proben, welche nur Antikörper enthalten (blau) und Proben die zusätzlich Antigen enthalten (rot).

Tabelle 8: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Octet-Plattform.

Analytkonzentration final [$\mu\text{g/L}$]		
Kalibrierproben	+ 2 nM Antigen	Abweichung [%]
697	0	100
1128	1096	3
2549	2533	1
5198	3871	26
9532	6610	31

Dargestellt sind die rückberechneten Konzentrationen der Proben, die nur Antikörper enthalten (Kalibrierproben) und die Konzentrationen der Proben, die zusätzlich Antigen enthalten. Die Abweichung der Konzentrationen ist in Prozent dargestellt.

Ein zusätzlicher Detektions-Schritt mit Antigen führte in diesem Format zu keinerlei konzentrationsabhängigen Signalen (Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, dass der zu messende Antikörper mit beiden Bindestellen an die Fänger-moleküle bindet und kein Paratop für die Bindung an ein Detektionsmolekül zur Verfügung steht. Um dies zu verhindern wird bei Messmethoden zur Quantifizierung von freiem Antikörper, die Konzentration des Fänger-moleküls sehr gering gewählt (0.1 $\mu\text{g/ml}$ im vorgestellten ELISA). Eine solch geringe Konzentration hatte auf der Octet-Plattform allerdings keine konzentrationsabhängigen Signale zur Folge (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Octet Antigen-Fänger Format mit anti-human IgG Detektion

Das Octet Antigen-Fänger Format sollte um einen zusätzlichen Schritt erweitert werden. Es sollte überprüft werden, ob die Inkubation mit anti-human IgG, in einem Detektions-Schritt, einen positiven Effekt auf die Messung hat. Abbildung 50 zeigt schematisch den Aufbau des Octet Antigen-Fänger-Formates mit anti-human IgG Detektion.

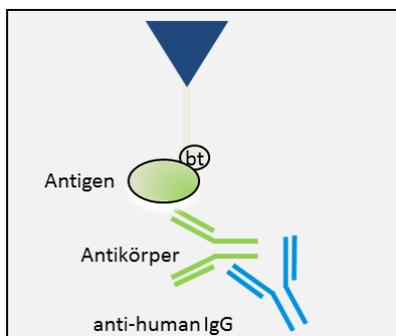


Abbildung 50: Aufbau des Octet Antigen-Fänger Formates mit anti-human IgG Detektion.

Streptavidin-beschichtete Glasnadeln werden nach erfolgter Blockierung und anschließendem Waschschrift mit biotinyliertem Antigen beschichtet. Anschließend erfolgt nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation der Proben. Nach einem weiteren Waschschrift folgt die Inkubation mit anti-human IgG. Die Messung mittels Bio-Layer-Interferometrie erfolgt in Echtzeit.

Abbildung 51 zeigt die Messung steigender Analytkonzentrationen in antigenfreier Matrix (blau). Im Vergleich dazu ist die Messung der entsprechenden Proben dargestellt, die zusätzlich physiologische Antigen-Konzentration enthalten (rot). Für diese Proben ist das Signal für die Analytkonzentrationen teilweise reduziert. Zusätzlich wurde auch eine Abweichung der rückberechneten Konzentrationen zwischen Kalibrierproben und Proben, die zusätzlich Antigen enthalten, festgestellt (Tabelle 9). So liegen die nominal Konzentrationen von 156 $\mu\text{g/L}$ und 313 $\mu\text{g/L}$, die zusätzlich Antigen enthalten unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Für die Konzentration von 625 $\mu\text{g/L}$ wurde eine Abweichung von 25 % für die Proben, die Antigen enthalten, ermittelt. Die Octet Antigen-Fänger Methode reagiert also auf physiologische Antigen-Konzentrationen mit einer verminderten Antikörper-Konzentration, was für die Messung der freien Fraktion des Antikörpers zu erwarten ist.

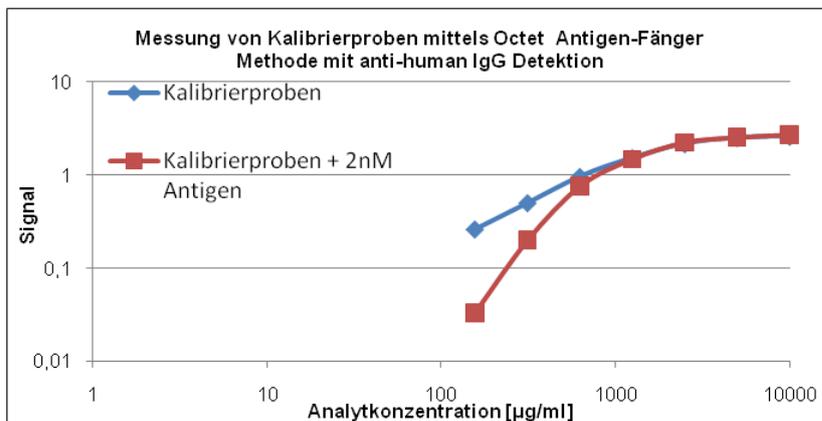


Abbildung 51: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Messung von ungebundenem Antikörper auf den Octet Antigen-Fänger Methode mit anti-human IgG Detektion.

Proben unterschiedlicher Analytkonzentrationen, in antigenfreier Matrix, wurden gemessen. Im Vergleich dazu wurden Proben unterschiedlicher Analyt-Konzentration in antigenfreier Matrix zusätzlich mit physiologischer Antigenkonzentration versetzt, bei 4°C über Nacht inkubiert und ebenfalls gemessen. Dargestellt sind die Signale für die Proben, welche nur Antikörper enthalten (blau) und Proben die zusätzlich Antigen enthalten (rot).

Tabelle 9: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Gyrolab-Plattform.

Analytkonzentration final [$\mu\text{g/L}$]		
Kalibrierproben	+ 2 nM Antigen	Abweichung [%]
153	0	100
305	0	100
645	484	25
1230	1164	5
2513	2773	0
5033	5157	0
9543	> Quantifizierungslimit	-

Dargestellt sind die rückberechneten Konzentrationen der Proben, die nur Antikörper enthalten (Kalibrierproben) und die Konzentrationen der Proben, die zusätzlich Antigen enthalten. Die Abweichung der Konzentrationen ist in Prozent dargestellt.

Abbildung 52 zeigt das Ergebnis der Messung. Die gestrichelte Linie stellt den Erwartungswert dar, welcher mittels Bindungssimulation ermittelt wurde. Die IC_{50} wird

bei einem molaren Verhältnis von Antigen zu Antikörper von 0.7 erreicht. Dies bedeutet, dass bei einem Verhältnis von Antigen zu Analyt von 0.7 die ermittelte Konzentration des freien Analyten um 50 % reduziert ist. Die ermittelte Inhibition in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse von Antigen zu Antikörper entspricht nicht dem Erwartungswert. Besonders im Bereich der Verhältnisse von ca. 0.07 bis 0.5 ist die erwartete Inhibition höher als die tatsächlich gemessene Inhibition. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Methodenformat nicht nur die freie Antikörperfraktion, sondern auch die partiell freie Fraktion gemessen wird.

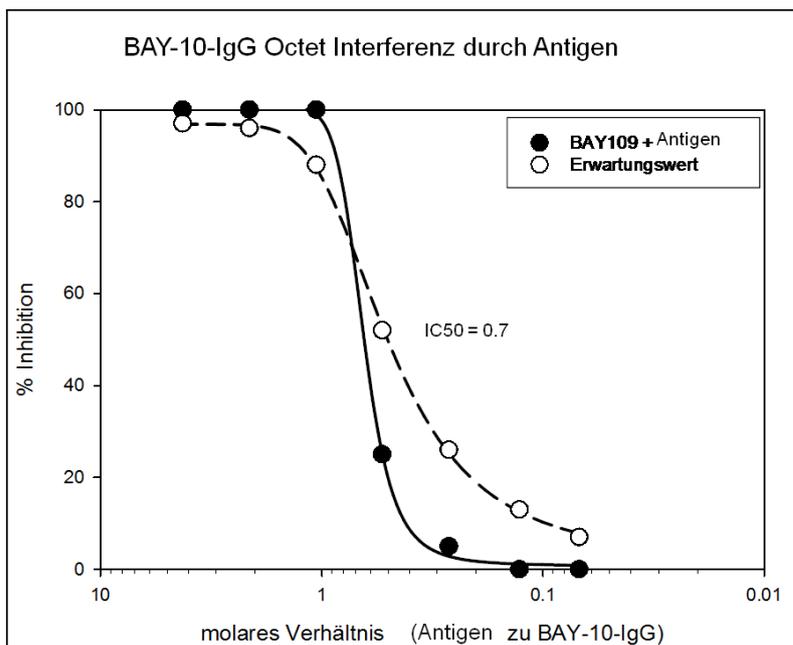


Abbildung 52: Interferenz-Testung der BAY-10-IgG Messung durch das Antigen mittels Octet.

Proben unterschiedlicher molarer Verhältnisse von Antigen zu BAY-10-IgG wurden inkubiert und anschließend auf der Octet Plattform vermessen. Dargestellt ist die Inhibition der ermittelten BAY-10-IgG Konzentration in Prozent in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse (schwarze durchgezogene Linie). Zusätzlich ist der mittels Bindungssimulation ermittelte Erwartungswert aufgetragen (gestrichelte Linie).

4.3.5 Bestimmung der Parameter für den Plattform-Vergleich, gezeigt anhand der ELISA-Methode

Im Folgenden ist anhand der Daten der ELISA-Plattform dargestellt, wie Sensitivität und Arbeitsbereich abgeleitet wurden. Zusätzlich wird aufgezeigt, wie der Effekt physiologischer Antigen-Konzentrationen auf den Arbeitsbereich bestimmt wurde.

Über einen Bereich von 10-10000 µg/L Antikörper wurden Proben, in antigenfreier Matrix in einer 1:2 Verdünnungsreihe, hergestellt. Daraufhin folgte die Messung der Proben in Doppelbestimmung. Aus den Werten der Doppelbestimmung wurden Mittelwerte gebildet, sowie Standardabweichung und CV berechnet. Für die unterschiedlichen Analytkonzentrationen und den entsprechenden Mittelwerten der Messsignale, wurde ein geeignetes Regressionsmodell ausgesucht. Dabei wurde

entweder eine quadratische Regression oder eine 5 Parameter logistische Regression verwendet. Im Falle des ELISAs wurde eine quadratische Regression, wie in Abbildung 53 gezeigt, verwendet. Da hier die Rückberechnung der Konzentrationen für alle Messpunkte erfolgreich war. Tabelle 10 zeigt die Daten der Messung und die rückberechneten Konzentrationen nach der Regression.

Tabelle 10: Daten der Messung mittels ELISA. Das Signal der Leerwerte wurde herausgerechnet.

Konzentration	Signal	rückberechnete Konzentration	Genauigkeit	Präzision
$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	[%]	[%]
10	25	10	95	3,7
20	54	22	112	2,8
39	85	36	94	3,7
78	172	75	96	3,9
156	380	164	105	1,9
313	830	348	111	3,1
625	1395	562	90	5,7
1250	3669	1307	105	5,0
2500	7576	2325	93	1,4
5000	22488	5038	101	1,3
10000	67084	10035	100	2,3

Ausgehend von diesen Daten, sollten Sensitivität und Arbeitsbereich bestimmt werden. Es sollten ein Ankerpunkt sowie ein unteres Quantifizierungslimit abgeleitet werden. Ein Ankerpunkt ist eine Analyt-Konzentration, die nicht im festgelegten Arbeitsbereich der Methode liegt, sondern darunter. Der Ankerpunkt kann dazu beitragen, die Regression zu beeinflussen und sich dadurch positiv auf den LLOQ auszuwirken. In diesem Projekt wurde als Ankerpunkt die kleinste Konzentration aus der Verdünnungsreihe ausgewählt, bei der das gemessene Signal um mindestens den Faktor 2 größer ist, als das Signal der nächst kleineren Konzentration. Anhand der in Tabelle 10gezeigten Daten, würde der Ankerpunkt bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/L}$ liegen, da es die kleinste Konzentration ist, bei der das gemessene Signal um den Faktor 2 größer ist als das Signal der Konzentration bei 10 $\mu\text{g/L}$. Das untere Quantifizierungslimit wurde auf die Konzentration von 39 $\mu\text{g/L}$ festgelegt. Von 39 $\mu\text{g/ml}$ bis zu einer Konzentration von 10000 $\mu\text{g/L}$ ist eine Rückberechnung der Konzentrationen mit einer Genauigkeit und Präzision innerhalb der Grenze von $\pm 20\%$ möglich, daher wird der Arbeitsbereich des ELISAs auf diesen Bereich festgelegt. Eine Rückberechnung der Konzentration erscheint auch für geringere Konzentrationen möglich, jedoch wurde die Selektivität mittels Proben verschiedener Individuen nicht getestet. Daher wurde als unteres Quantifizierungslimit sicherheitshalber eine Konzentration mit größerem Abstand zum Signalhintergrund gewählt. Für den Fall, dass

eine Rückberechnung der Konzentrationen nicht möglich wäre, würden die entsprechenden Konzentrationen aus der Regression gestrichen werden und eine neue Regression durchgeführt.

4.3.6 Plattform-Vergleich

Die Plattformen sollten miteinander verglichen werden, um herauszufinden ob der Transfer einen Vorteil bietet. Verglichen werden sollten unter anderem die Sensitivität, der Arbeitsbereich, die notwendige Probenverdünnung, das benötigte Probenvolumen sowie die Interferenz mit Antigen.

Abbildung 53 zeigt die Gegenüberstellung verschiedenen Parameter der einzelnen Plattformen.

	ELISA	Gyros	Octet Antigen-Fänger	Octet Antigen-Fänger human IgG
Fit:	Quadratisch	5 Parameter logistische Regression	5 Parameter logistische Regression	5 Parameter logistische Regression
Funktion:	$y=(ax^2)+(bx)+c$	$y=d+/a-d)/((1+(x/c)^b)^e)$	$y=d+/a-d)/((1+(x/c)^b)^e)$	$y=d+/a-d)/((1+(x/c)^b)^e)$
Gewichtung:	$1/(x*x)$	$1/(x*x)$	$1/x$	x/x
r ² :	0.99	1	0.99	0.99
mre%	6.05	5.29	6.05	3.57
Probenverdünnung	1:50	1:5	1:2	1:2
Probenvolumen [µL]	25	10	200	200
Arbeitsbereich [µg/L]	39-10000	156-5000	625-10000	156-10000
LLOQ für die freie Antikörperkonzentration bei physiologischer Antigenkonzentration[µg/L]	1250	625	1250	625

Abbildung 53: Vergleich der Plattformen für die Messung von freiem Antikörper in Plasma.

Dargestellt ist der Vergleich der verwendeten Plattformen. Dargestellt ist auch der LLOQ für die freie Antikörperkonzentration bei physiologischer Antigenkonzentration in der Probe. Bis zu dieser Konzentration kann der Anteil des freien Antikörpers noch von der Gesamt-Antikörperkonzentration differenziert werden.

Vergleicht man die Parameter der einzelnen Plattformen wird ersichtlich, dass im Vergleich zur ELISA-Methode keine Plattform einen klaren Vorteil bietet. So ist auf der Gyrolab-Plattform ein geringeres Probenvolumen nötig. Zusätzlich müssen die Proben um den Faktor 10 weniger verdünnt werden, was für die Messung der freien Fraktion des Antikörpers von Vorteil sein kann, da zu hohe Verdünnungen das Bindungsgleichgewicht beeinträchtigen könnten. Diese Vorteile in einzelnen Parametern stehen allerdings Nachteilen in anderen Parametern gegenüber. Beispielsweise ist der Arbeitsbereich der Gyrolab-Methode im Vergleich zur ELISA-Methode eingeschränkt. In Bezug auf die Interferenz mit Antigen ist zu sagen, dass eine physiologische Antigen-Konzentration in der ELISA- sowie in der Octet Antigen-Fänger-Methode die Quantifizierungsgrenze auf 625 µg/L erhöht. Die Gyrolab Methode ist in Bezug auf den getesteten Parameter vergleichbar mit der Octet Antigen-Fänger

human IgG-Methode. Vorteilhaft könnte die noch etwas geringere Probenverdünnung von 1:2 für die Messung von freiem Antikörper sein.

Abschließend ist festzuhalten, dass der zu quantifizierende Antikörper eine sehr hohe Affinität (pMol-Bereich) zum Antigen hat. Damit sollten kleinere Unterschiede zwischen den Plattformen wie Inkubationstemperatur z.B. zwischen ELISA (Raumtemperatur) und Octet (30°C) das Bindungsgleichgewicht nicht beeinflussen. Somit eignet sich das verwendete Paar aus Antigen und Antikörper, um zu überprüfen ob ein Transfer der Methode auf die unterschiedlichen Plattformen grundsätzlich möglich ist.

Bei Verwendung von Reagenzien, deren Affinitäten niedriger sind, könnten Parameter wie Inkubationstemperaturen sowie Inkubationszeiten einen zunehmenden Einfluss auf die Messung haben. Auch könnten höhere Probenverdünnungen, wie im ELISA (1:50), das Bindungsgleichgewicht in Richtung Dissoziation verschieben. Eine solche Veränderung der Bindungsgleichgewichte in der Probe würde dazu führen, dass die Methode nicht die wahre freie Antikörperfraktion misst, die in der Probe vorhanden ist.

5 Diskussion

5.1 Aufklären von Messinterferenzen während der Antikörper-Quantifizierung

Um eine Interferenz beim Nachweis eines neuen therapeutischen Antikörpers aus der pharmazeutischen Entwicklung aufzuklären, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Proteine im ELISA auf eine Interferenz getestet. Proteine, die für die Testung in Frage kamen, waren einerseits Proteine, die aus den Proben aufgereinigt und identifiziert wurden und andererseits Proteine, die eine Homologie zu dem im ELISA verwendeten Fängerprotein aufwiesen. Auch Proteine, die bekanntermaßen mit dem Fängerprotein interagieren können, wurden getestet. In dieser Arbeit konnte das interferierende Protein letztendlich nicht eindeutig identifiziert werden. Im Folgenden werden Lösungsansätze diskutiert und vorgeschlagen, die in Zukunft für die Aufklärung des Effektes hilfreich sein könnten. Interferenzen sind Effekte einer Substanz in der Probe, die den korrekten Messwert für einen Analyten, ausgedrückt in Konzentration oder Aktivität, verändern (Kroll and Elin, 1994). Je nach Aufbau des ELISA-Formates können während der Messung, unterschiedliche Interferenzen auftreten, die zu nicht erkläraren pharmakokinetischen Kurvenverläufen führen. Dies könnte in der Präklinik zu einer falschen Vorhersage für die erste Dosis führen und in der Klinik zu einer falschen Festlegung der therapeutischen Dosis. Anhand einer internen Messmethode, in der eine Interferenz aufgetreten ist, sollten Lösungsansätze entwickelt werden, um die Ursachen für den Effekt aufzuklären und zu verstehen.

Für die Identifikation interferierender Proteine ist es zunächst sinnvoll sich einen Überblick über mögliche Interferenzen in dem verwendeten ELISA-Format zu verschaffen. Der in dieser Arbeit aufgetretene Effekt führt zur Abnahme des Signals. Diese kann, in dem verwendeten Antigen-Brücken Format, auf Bindung eines Proteins an den Analyten, Bindung eines Proteins an das Antigen oder Degradation von Analyt oder Reagenzien zurückzuführen sein (Schwickart et al., 2014). Der ELISA funktioniert wie erwartet, wenn Proben analysiert werden, die aus Sammelplasma hergestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Degradation von Reagenzien während der ELISA Prozedur keine Rolle spielt. Auch ein Abbau des Analyten im Tier, ist als Interferenz unwahrscheinlich, da der Effekt schon ab 0.5 h nach Injektion auftritt, monoklonale Antikörper aber eine Halbwertszeit von über 6 Tagen aufweisen (Carter and Lazar, 2018; Deng et al., 2011; Hotzel et al., 2012). Auch Halbwertszeiten von 28 Tagen werden berichtet (Leveque et al., 2005). Zusätzlich tritt der Effekt in drei

weiteren ELISA-Formaten nicht auf, was ebenfalls gegen eine Degradation spricht (Kiesgen et al., 2016). Es sollte daher überprüft werden, ob die Interferenz aufgrund von Proteinbindung an den Antikörper oder an das Antigen zustande kommt. Dabei wurde eine Interferenz durch Bindung an den Antikörper, aufgrund des hohen Überschusses im Plasma im Vergleich zum Antigen, als eher unwahrscheinlich erachtet. Die Stoffmenge der Fängerprotein-Lösung beträgt 1,25 nmol, die des Antikörpers in der Probe, in der Mitte des Arbeitsbereiches der Methode, liegt bei über 3000 nmol. Es besteht also ein mehr als 2000-facher Überschuss an Antikörper gegenüber der in der Methode verwendeten Menge an Fängerprotein, unter der Bedingung, dass die Effizienz der Beschichtung der ELISA-Platte 100 % beträgt. Da dies eher unwahrscheinlich ist, wird der Überschuss vermutlich noch größer sein. Ein interferierender Effekt ausgelöst durch Bindung eines Proteins an das Antigen, welches als Fängerprotein im ELISA verwendet wird, ist als wahrscheinlicher einzustufen.

Um das im ELISA interferierende Protein zu identifizieren, wurden eine Aufreinigung und anschließend eine Detektion mittels SDS-PAGE durchgeführt. Zur Aufreinigung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Co-Immunpräzipitation mit magnetischen Kügelchen durchgeführt. Durch anschließende Analyse mittels LC-MS/MS konnten einige im ELISA potentiell interferierende Proteine identifiziert werden. Zur Überprüfung des Effektes der einzelnen Proteine auf die ELISA-Messung, wurde eine Verdünnungsreihe des Antikörpers zusätzlich mit den identifizierten, potentiell interferierenden Proteinen versetzt und gemessen, ähnlich wie in der Literatur beschrieben (Wang et al., 2016). Das Antigen führte zu einer maximalen Signal-Abnahme von ca. 30 %, allerdings musste es dafür in einer mehr als 20000-fach physiologischen Konzentration eingesetzt werden. Daher wurde das Antigen als interferierendes Protein in den Proben als nicht wahrscheinlich eingestuft. Das Vorläuferprotein des Antigens hingegen führte zu einer Signal-Abnahme von 50 % in einer 4-fach physiologischen Konzentration. Da der interferierende Effekt ausschließlich in Proben behandelte Tiere vorkommt, nicht aber in Proben, die aus Sammelplasma hergestellt werden, kann davon ausgegangen werden, dass das Vorläuferprotein des Antigens in den Proben vermehrt vorhanden sein müsste, um den Effekt auszulösen. Eine erhöhte Konzentration des Vorläuferproteins konnte in den Proben allerdings nicht festgestellt werden. Somit konnte das Vorläuferprotein als interferierendes Protein in den Proben letztendlich nicht bestätigt werden. Über den Ansatz des Aufreinigens und Identifizierens interferierender Proteine hinausgehend,

wurden weitere Proteine getestet. So wurden ein Protein, welches eine Sequenzhomologie zum Antigen aufweist sowie ein entsprechendes Vorläuferprotein ebenfalls im ELISA auf eine Interferenz getestet. Zusätzlich wurden Proteine, die bekanntermaßen mit dem Antigen interagieren können, getestet. Keines der Proteine war in der Lage in den Experimenten eine Interferenz im ELISA auszulösen. Auch eine direkte Bindung der identifizierten Proteine, einzeln oder in Kombination an das Antigen, konnte nicht festgestellt werden. Zukünftige Experimente sollten darauf abzielen weitere identifizierte Proteine im ELISA auf eine Interferenz zu testen. Darüber hinaus könnte es sinnvoll sein, hochmolekulares Kininogen zu testen, da dies in relativ hohen Plasmakonzentrationen vorkommt und an das Vorläuferprotein des Antigens bindet. Obwohl ein Komplementprotein identifiziert wurde, wurde bislang der Effekt unterschiedlicher Komplementproteine in dieser Arbeit nicht auf eine Interferenz im ELISA getestet. Für sie wird eine Bindung an den Fc-Teil von Antikörpern angenommen (Börner, 1989), wodurch die Bindungsfähigkeit des Analyten an das Fängerprotein im ELISA nicht beeinträchtigt werden sollte. Dies ist dadurch zu erklären, dass in dem hier verwendeten ELISA die Bindung des zu analysierenden Antikörpers durch Bindung an die freien Paratope erfolgt. Die zukünftige Testung von Komplementproteinen könnte dennoch sinnvoll sein, denn Bumbaca und Kollegen berichten von einer Interaktion von Komplementproteinen mit variablen Domänen eines anti-FGFR4 Antikörpers, die zur Signalreduktion in einem Antigen-Fänger ELISA von ca. 30 % führte, in welchem ebenfalls die Bindung des Antikörpers über ein freies Paratop erfolgt (Bumbaca et al., 2011). Kiesgen und Kollegen konnten in einem Antigen-Fänger ELISA keine Interferenz feststellen (Kiesgen et al., 2016). Dennoch wäre eine Interferenz durch Komplementproteine im untersuchten Antigen-Brücken ELISA denkbar, da hier lediglich eine Verdünnung der Proben von 1:50 durchgeführt wird, im Gegensatz zu einer Verdünnung von 1:2000 im Antigen-Fänger Format. Durch diese höhere Verdünnung der Proben könnte das Auftreten von Interferenzen reduziert sein (Spriggs et al., 2014).

Da der in dieser Arbeit verwendete Ansatz des Aufreinigens nicht quantitativ war, folgt für die Beurteilung der Ergebnisse, dass in einer Probe zusätzlich zu den identifizierten Proteinen, weitere Proteine vorhanden sein könnten, welche hier nicht identifiziert wurden. Daher könnte es sinnvoll sein, weitere Methoden zur Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen als Ergänzung zu verwenden.

5.1.1 Alternative Optionen zur Identifizierung interferierender Proteine

Bumbaca und Kollegen verwendeten Immunpräzipitation, indem iodierter Antikörper mit Probenplasma inkubiert wurden. Anschließend wurden die enthaltenen Proteine mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Alternativ könnte zur Aufreinigung auch eine Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Diese hätte aber gegenüber der Aufreinigung mit Kügelchen keinen Vorteil und womöglich würde ein höheres Probenvolumen benötigt werden. Große Peaks wurden nach Auftrennung mittels MS/MS analysiert (Bumbaca et al., 2011). Die Größenausschlusschromatographie als Auftrennungsmethode hat gegenüber der in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE den Vorteil, dass die Proteine nicht denaturiert werden. Dies kann sinnvoll sein, wenn die Proteine für weitergehende Versuche, wie Bioassays ihre Funktionalität erhalten müssen oder sie durch Proteinbindung nachgewiesen werden sollen. Allerdings ist es für die Aufklärung des interferierenden Effektes in dieser Arbeit nicht notwendig, dass die Proteine nativ vorliegen, da sie nach der SDS-PAGE für die LC-MS Analyse verdaut wurden. Den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zu iodieren (Bindung von Iod-125 an Tyrosylreste) und mit Probenplasma zu inkubieren ist nicht ohne weiteres möglich, da der Antikörper wie bereits in Kapitel 5.1 besprochen in hoher Menge in den Proben vorhanden ist. Der iodierter Antikörper würde dann mit den bereits vorhandenen Antikörpern um Bindung an das interferierende Protein konkurrieren. Den iodierten Antikörper mit Plasma nicht behandelte Tiere zu inkubieren wäre ebenfalls nicht sinnvoll, da der interferierende Effekt lediglich in Plasma behandelte Tiere auftritt. Für das Antigen wäre ein solches Vorgehen denkbar, da dieses in der Probe nur zu ca. 5 pmol vorhanden ist. Bei dem Prozess des Iodierens muss allerdings sichergestellt sein, dass die Struktur und die Funktion des Proteins nicht verändert werden (Espuna et al., 2006). Espuna und Kollegen konnten mit ihrem Vorgehen die Integrität der getesteten Proteine gewährleisten.

Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Vorgehen, den gesamten Elutionsansatz zu analysieren, könnte es sinnvoll sein die Proteinbanden nach Auftrennung im Gel auszuschneiden und diese mittels LC-MS/MS zu identifizieren (Wang et al., 2016). Dies hätte den Vorteil, dass die Anzahl der identifizierten Proteine dann vermutlich eingeschränkter ist, da nur Proteine identifiziert werden, die in der SDS-Page als Bande zu sehen sind. Dadurch würden Proteine ausgeschlossen werden, die unter der Detektionsgrenze in der SDS-PAGE liegen. Für diese Proteine, die in relativ geringen Mengen in den Proben vorhanden sind, kann ohnehin vermutet werden, dass sie als

interferierende Proteine eher unwahrscheinlich sind. Allerdings könnte ein zu spezifisches Vorgehen dazu führen, dass das interferierende Protein nicht identifiziert wird. Beide Vorgehen haben also sowohl Vor- als auch Nachteile. Eine Kombination beider experimenteller Ansätze könnte vorteilhaft sein.

Es könnte zudem sinnvoll sein, die Proben mittels Proteingel unter nativen Bedingungen aufzutrennen und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran zu übertragen. Um festzustellen, ob Proteine in den Proben mit ELISA-Reagenzien interagieren, könnten an Biotin gekoppelte ELISA-Reagenzien mit der Membran inkubiert werden. Anschließend könnten Interaktionen durch Inkubation mit Strep-HRP und Substrat sichtbar gemacht werden. Dabei ist es wichtig, die Proteine in nicht-denaturierenden Bedingungen aufzutrennen, damit sie nicht in ihre Untereinheiten aufgetrennt werden. Ob dieses Vorgehen gegenüber der Co-Immunpräzipitation von Vorteil ist, ist fraglich da hier keine Anreicherung der potentiell interferierenden Proteine stattfindet und zusätzlich eine hohe Verdünnung der Plasmaproben nötig wäre um eine ordentliche Auftrennung im Gel zu gewährleisten (Phizicky and Fields, 1995). Eine Kombination aus Immunpräzipitation um die bindenden Proteine aus der Probe anzureichern und anschließende Auftrennung der Proteine im Gel unter nativen Bedingungen sollte dem Übertragen auf eine Nitrocellulose-Membran vorausgehen. Anschließend könnten an Biotin gekoppelte ELISA-Reagenzien auf eine Interaktion mit Probenproteinen getestet werden. Es ist jedoch fraglich, ob dieses Vorgehen, gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten, einen Vorteil bieten würde. Die Banden müssten eindeutig einem Protein zugeordnet werden und es wäre denkbar, dass die Trennleistung des Gels nicht ausreicht. Ein 2-dimensionales Gel könnte hier sinnvoll sein, um eine bessere Auftrennung der Proteine und somit eine eindeutigere Zuordnung zu ermöglichen.

Feyen und Kollegen verwendeten einen Protein-Mikrochip, um unspezifische Bindung monoklonaler Antikörper abzuklären. Dabei wurden 384 zufällig ausgewählte rekombinante humane Proteine auf einen Mikrochip gedruckt und mit Antikörper inkubiert. Zur Signalerzeugung wurden fluoreszenz-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet (Feyen et al., 2008). Bei diesem Vorgehen ist die Anzahl der unterschiedlichen Proteine beschränkt, was dazu führen kann, dass das potentiell interferierende Protein auf dem Chip nicht vorhanden ist und somit nicht identifiziert werden kann. Ein grundsätzliches Problem bei einem solchen Ansatz ist außerdem, dass

die Funktion mancher Proteine durch den Aufreinigungsprozess beeinträchtigt wird und die Versuche aufgrund von Variationen zwischen den Mikrochips schlecht zu reproduzieren sind (Ramachandran et al., 2008). Ramachandran und Kollegen konnten einen Protein-Array entwickeln, in welchem sie 647 unterschiedliche Proteine in Duplikaten in situ auf einem Chip synthetisierten. Sie konnten zeigen, dass ihr Vorgehen gut zu reproduzieren ist, allerdings bleibt auch hier die Anzahl der Proteine beschränkt. Darüber hinaus könnte aufgrund der möglicherweise fehlenden oder fehlerhaften post-translationalen Modifikationen, die Faltung oder die Funktion der in situ produzierten Proteine nicht korrekt sein. Außerdem ist die Testung auf dem Chip artifiziell und spiegelt nicht die Situation in der Plasmaprobe eines behandelten Tieres wider. Eine hier identifizierte Interaktion müsste für die Probe erst einmal bestätigt werden.

5.1.2 Reduzieren von Messinterferenzen während der Antikörper-Quantifizierung

In der Praxis werden Interferenzen für gewöhnlich nicht immer aufgeklärt. Häufig wird versucht die Interferenzen möglichst frühzeitig zu entdecken, um genügend Zeit zu haben diese zu minimieren oder zu umgehen. Das Auftreten von Interferenzen in einer Messmethode kann bereits vor der Durchführung einer Studie abgeklärt werden. Wie in Kapitel 1.6 (Verdünnungslinearität) beschrieben, werden dazu Proben mit bekannten Analytkonzentrationen hergestellt und seriell mit Matrix verdünnt (Stevenson and Purushothama, 2014). Nach Messung und Herausrechnen der Verdünnungen, sollten die ursprünglichen Konzentrationen ermittelt werden. Werden abhängig von der Verdünnung die ursprünglichen Konzentrationen nicht korrekt errechnet, ist dies ein Hinweis auf eine Interferenz (Kiesgen et al., 2016). Dabei ist es wichtig zu beachten, dass kein Hinweis auf Interferenz nicht gleichbedeutend mit einer Abwesenheit von Interferenzen in den Studienproben ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich einige Faktoren erst nach Behandlung mit dem therapeutischen Antikörper als Interferenz in der Messung manifestieren. Ein Beispiel hierfür sind endogene Proteine, die eine Interferenz auslösen können (International Council for harmonisation, 2019).

In Kapitel 1.7.1 sind einige Beispiele für Interferenzen aufgeführt. Für den in dieser Arbeit zu untersuchenden Effekt, sollten lediglich Interferenzen in Frage kommen, die nach Behandlung mit dem therapeutischen Antikörper auftreten. Denn der Effekt tritt in Proben behandelte Tiere auf, nicht aber in Plasma, welches mit Antikörper versetzt wird. Ursächlich für Interferenzen, die nach der Behandlung auftreten können sind unter

anderem ADAs (Anti-Drug Antibodies) und Nabs (Neutralizing Antibodies) sowie die Akkumulation von löslichem Antigen (Fischer et al., 2012; Wolbink et al., 2005).

Es kann auch vorkommen, dass Interferenzen auftreten, wenn die ELISA-Methode für die pharmakokinetische Charakterisierung des Entwicklungskandidaten im Verlauf des Projektes durch eine andere ELISA-Methode ersetzt wird. In der frühen Entwicklung eines therapeutischen Antikörpers stehen spezifische Reagenzien zur Methodenentwicklung häufig noch nicht zur Verfügung (Lee and Kelley, 2011). Zu diesem Zeitpunkt kann es daher sehr sinnvoll sein, einen generischen ELISA mit anti-Spezies Antikörpern und hoher Probenverdünnung zu entwickeln (Lee et al., 2011). Ein solcher ELISA kann weniger anfällig für Interferenzen sein als ein Antigen-Brücken ELISA (Kiesgen et al., 2016), wodurch er sich gut dafür eignet, humane therapeutische Antikörper in Plasma verschiedener Tierspezies zuverlässig zu quantifizieren und so eine erste Dosis für Humanstudien abzuleiten. Zur Messung von klinischen Humanproben ist solch ein ELISA allerdings nicht geeignet, da eine Vielzahl von endogenen human-Antikörpern in den Proben den generischen ELISA stören würde (Lee et al., 2011). Im Hinblick auf die Messung von klinischen Proben kann es dann notwendig sein, ein weiteres ELISA-Format zu entwickeln und zu validieren. Die Herausforderung liegt dabei darin, die Methode möglichst zu einem frühen Projektzeitpunkt zu entwickeln, an dem die Wahl der Reagenzien allerdings noch sehr begrenzt sein kann. Falls in diesem ELISA dann Interferenzen auftreten, müssen diese entweder minimiert werden, oder ein neuer ELISA entwickelt werden, sobald spezifische Reagenzien verfügbar werden. So könnten Interferenzen zu Verzögerungen von Projekten führen.

Ein ELISA für die Messung in klinischen Studien sollte daher so früh wie möglich vor der klinischen Studie entwickelt werden, sobald spezifische Reagenzien verfügbar sind. Sind dann Studienproben vorhanden, sollte ein Test auf Parallelismus in einem für die Klinik relevanten ELISA durchgeführt werden, wie in Kapitel 1.6 beschrieben. Kiesgen und Kollegen konnten durch die frühe Entwicklung eines für die Klinik relevanten ELISAs mit spezifischen Reagenzien eine zuvor aufgetretene Interferenz umgehen (Kiesgen et al., 2016).

Treten Interferenzen auf, gibt es die beschriebene Möglichkeit eine weitere Methode zu entwickeln, um die Interferenz zu umgehen. Darüber hinaus ist es möglich bereits aufgetretene Interferenzen zu beseitigen, indem das interferierende Protein aus der

Probe entfernt wird. Spriggs und Kollegen berichten von einer Interferenz, welche durch Proteinextraktion mittels anti-Antigen Antikörper-gekoppelten Kügelchen behoben werden konnte (Spriggs et al., 2014). Für dieses Vorgehen muss das Protein allerdings bekannt sein, was nicht immer der Fall ist. Außerdem muss sichergestellt sein, dass die Probe in Bezug auf die Analytkonzentration nicht verändert wird. Entfernt man ein Protein aus der Probe welches mit einem zu quantifizierenden Antikörper interagiert, könnte auch der Antikörper aus der Probe entfernt werden, was zu einer Unterschätzung der Antikörper-Konzentration führen würde. In einem ELISA werden die Proben für gewöhnlich nicht vorbehandelt. Da die Matrixzusammensetzung sehr komplex ist werden sie vor der Analyse allerdings verdünnt, um das Auftreten unspezifischer Hintergrundsignale zu minimieren (Kelley and DeSilva, 2007). Eine weitere Möglichkeit Interferenzen zu reduzieren ist die Probenverdünnung des ELISAs zu erhöhen. Allerdings verringert sich dadurch die Sensitivität, weshalb dies nicht nach Belieben möglich ist (Crisino et al., 2014). Auch eine Veränderung der Pufferzusammensetzung kann bei der Beseitigung von nicht-spezifischen Interferenzen hilfreich sein (Spriggs et al., 2014). So kann durch Zugabe von Natriumchlorid und Polysorbat, die Löslichkeit der Proteine erhöht werden (Bondos and Bicknell, 2003). Erhöhte Salzkonzentrationen im Puffer können die Ladung der Proteine maskieren und dadurch Interaktionen, die aufgrund von Ladung zustande kommen reduzieren. Doucet und Kollegen konnten Matrixinterferenzen in einem ELISA zur Quantifizierung eines monoklonalen Antikörpers in Human- und in Affenplasma durch chaotrope Salze in Kombination mit DMSO reduzieren (Doucet et al., 2009). Chaotrope Salze haben einen Effekt auf Wasserstoffbrückenbindungen und beeinflussen die Struktur sowie die Interaktion von Proteinen (Sawyer and Puckridge, 1973). Organische Lösungsmittel können die Konformation von Proteinen beeinflussen und dadurch die Affinität gegenüber dem Antigen erhöhen (Melnikova et al., 2000; Rehan and Younus, 2006). Detergenzien wie Tween 20 vermindern unspezifische Bindungen, indem sie hydrophobe Wechselwirkungen unterdrücken. Dadurch kann die unspezifische Bindung von Proteinen an Labormaterialien reduziert werden (Kenny and Dunsmoor, 1987). Blocker wie BSA, Milchpulver und Serum werden verwendet, um unbesetzte Proteinbindstellen in der ELISA-Platte abzusättigen (Xiao and Isaacs, 2012). Zudem stabilisieren sie an die Platte gebundene Biomoleküle und reduzieren nicht-spezifische Interaktionen (Gibbs and Kennebunk, 2011). Auch andere Proteine wie Maus IgGs, BGG (bovine Gamma Globulin) und humanes Serum hemmen nicht-spezifische anti-

IgG Bindungen (Schietecatte et al., 2012). Um Interaktionen aufgrund von Ladungen des Proteins zu verhindern, kann auch ein Puffer mit einem pH-Wert im Bereich des isoelektrischen Punktes des Proteins verwendet werden. Die Anzahl der negativen und positiven Ladungen eines Moleküls sollten hier gleich sein, sodass das Molekül insgesamt neutral geladen ist. Goyon und Kollegen bestimmten den isoelektrischen Punkt von 23 von der FDA oder EMA zugelassenen therapeutischen Antikörpern (Goyon et al., 2017). Dabei bestimmten Sie Werte zwischen pH 6.1 und pH 9.4. Grundvoraussetzung für die korrekte Einstellung des pH-Wertes des Puffers sind korrekte Daten in Bezug auf den isoelektrischen Punkt des Antikörpers. Eine weitere Möglichkeit Interferenzen zu reduzieren ist die Testung unterschiedlicher Reagenzien. Dazu kann es sinnvoll sein, mittels Biolayer-Interferometrie die Assoziation von Matrixkomponenten an die Reagenzien zu messen, wie von Shih vorgeschlagen (Shih et al., 2014). Chilewski und Kollegen konnten durch Optimieren der Pufferzusammensetzung, Testung weiterer Reagenzien für die Messmethode sowie die Gyrolab-Plattform als alternative Messplattform, Interferenzen minimieren (Chilewski et al., 2014).

Die Gyrolab-Plattform kann einen höheren Durchsatz sowie eine höhere Matrixtoleranzaufweisen, als herkömmliche Plattformen wie ELISA (Leary et al., 2013; Mora et al., 2010; Roman et al., 2011; Shih et al., 2012). Die Kontaktzeit zwischen Fängerprotein und Proben beträgt im Gegensatz zum ELISA, je nach Einstellung, Sekunden oder wenige Minuten. Dadurch ist das Auftreten unspezifischer Bindungen sehr wahrscheinlich reduziert (Chilewski et al., 2014). Auch Yang und Kollegen konnten durch den Transfer eines ELISAs auf die Gyrolab-Plattform Interferenzen minimieren, nachdem die Veränderung von Puffern, Reagenz-Konzentrationen und weiteren Faktoren das Problem nicht beseitigte (Yang et al., 2014). Für den in dieser Arbeit beschriebenen ELISA, in dem eine Interferenz aufgetreten ist, könnte die Gyrolab-Plattform womöglich einen Vorteil bieten.

Nachdem eine Interferenz im ELISA festgestellt wurde, hätte man alternativ zu dem Vorgehen von Kiesgen und Kollegen, eine ELISA Methode mit alternativen Reagenzien zu entwickeln (Kiesgen et al., 2016), auch versuchen können die Methode auf die Gyrolab-Plattform zu übertragen. Ob die kurzen Kontaktzeiten zwischen Fängermolekül und Probe ausreichen, um die Interferenz zu beseitigen, muss allerdings für den Einzelfall ausgetestet werden.

Ist eine Interferenz bereits aufgetreten, hat die Übertragung der Methode auf die Gyrolab-Plattform womöglich Vorteile gegenüber der Entwicklung einer neuen ELISA-Methode. Aufgrund der kürzeren Assay-Laufzeit ist die Dauer für die Methodenentwicklung auf der Gyrolab-Plattform gegenüber ELISA-Methoden verkürzt (Fraley et al., 2013; Mora et al., 2010). Auch der Durchsatz ist aufgrund der Assay-Laufzeit erhöht (Dudal et al., 2014). Einen weiteren Vorteil könnte die Plattform bieten, wenn eine Messmethode bereits zu Beginn des Projektes auf der Plattform entwickelt wird, um von Anfang an das Auftreten von Interferenzen präventiv zu reduzieren. Für das regulierte Umfeld in der Bioanalytik findet die Plattform bereits Anwendung (Given et al., 2012; Liu et al., 2013; Liu et al., 2012; Mikulskis et al., 2011). Die Sensitivität kann gegenüber einer ECL-Methode allerdings etwas geringer ausfallen (Mora et al., 2010).

Auch LC-MS spielt bei der Quantifizierung von Proteinen eine zunehmend wichtige Rolle (Dubois et al., 2008; Heudi et al., 2008; Ji et al., 2007; Ji et al., 2003; Rauh, 2012; Yang et al., 2007). Im Gegensatz zu ELISA Methoden, in denen endogene Komponenten eine Interferenz auslösen können (Ezan and Bitsch, 2009; Hoofnagle and Wener, 2009), werden in LC-MS Methoden weniger Interferenzen durch endogene Komponenten erwartet, da die zu quantifizierenden Proteine verdaut und anschließend Peptide gemessen werden, welche spezifisch für das verdaute Protein sind (Palandra et al., 2013; Zheng et al., 2014). Außerdem wird ein hoher Aufwand für die Probenvorbereitung betrieben, um die therapeutischen Antikörper aufzureinigen. Dies ist allerdings ein Grund für den in LC-MS Methoden für gewöhnlich vorkommenden geringeren Probendurchsatz (Lee and Kelley, 2011). Spezifische monoklonale Antikörper für den ELISA müssen erst einmal generiert werden, dieser Aufwand muss für LC-MS hingegen nicht betrieben werden. In der Routineanalytik von monoklonalen Antikörpern wird wie in Kapitel 1.5 beschrieben die ELISA-Methode verwendet. LC-MS Methoden könnten womöglich in der präklinischen Phase sinnvoll sein, wenn spezifische Reagenzien für die ELISA-Methodenentwicklung noch nicht verfügbar sind (Dubois et al., 2008). Allerdings wird wie von Kiesgen und Kollegen beschrieben, zu dieser Zeit des Projektes häufig ein generischer ELISA entwickelt, der tendenziell wenig anfällig für Interferenzen ist (Kiesgen et al., 2016). Eine LC-MS Methode zu entwickeln, um Messinterferenzen zu reduzieren, könnte jedoch hilfreich sein.

5.2 Korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion

Die freie, also ungebundene Antikörper-Fraktion in der Probe übt pharmakologische Wirkung aus. Für die Verknüpfung von Verteilung und Verstoffwechslung eines Arzneistoffes im Körper (Pharmakokinetik) und der Wirkung des Arzneistoffes (Pharmakodynamik) kann die Messung der freien Antikörper-Fraktion notwendig sein (Mayer and Hottenstein, 2016). Die Schwierigkeit der korrekten Messung der freien Antikörperfraktion liegt darin, ein in der Probe vorherrschendes dynamisches Gleichgewicht möglichst nicht zu beeinflussen und daraufhin lediglich artifizielle, freie Analytkonzentrationen zu messen. Mittels Bindungssimulation mit bestimmten Annahmen bezüglich Affinität sowie Antigen- und Antikörper-Konzentrationen konnten Staack und Kollegen den Einfluss einer Probenverdünnung auf die freie Antikörper-Fraktion für unterschiedliche Affinitäten darstellen (Staack et al., 2012). Typische Dissoziationskonstanten sind 1×10^{-10} M bzw. 1×10^{-9} M. Aus der Simulation wird ersichtlich, dass die Probenverdünnung bei kleinerer Affinität (1×10^{-8} M) einen zunehmenden Einfluss auf das Bindungsgleichgewicht hat. Bei dem Test auf Eignung einer Methode zur Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion sollte dies berücksichtigt werden. Es könnte also möglich sein, dass bei Antikörper- Antigenpaaren mit niedriger Affinität die Messung der freien Fraktion auf der ELISA-Plattform durch die Methodenprozedur beeinträchtigt wird, auf einer Plattform, auf der geringere Probenverdünnungen notwendig sind, hingegen nicht. Die Messplattform hat einen Einfluss darauf, welche Fraktion des Analyten gemessen wird (Mayer and Hottenstein, 2016). Daher ist ein Vergleich von unterschiedlichen Messplattformen sinnvoll.

Plattformen, auf denen geringere Verdünnungen der Proben notwendig sind und geringere Inkubationszeiten ausreichen, könnten für die Entwicklung einer Messmethode zur Quantifizierung der freien Fraktion von Vorteil sein (Staack et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden dafür die Gyrolab-Plattform sowie die Octet-Plattform gewählt. Ein großer Vorteil der Gyrolab-Plattform, für die korrekte Messung der freien Antikörperfraktion, könnte sich durch die geringen Kontakt-/Inkubationszeiten zwischen Probe, Fänger- und Detektionsmolekül in den Mikrostrukturen der Gyrolab-CD ergeben (Talbot et al., 2015). Weiterhin mussten die Proben vor der Analyse in dieser Arbeit lediglich 1:5 verdünnt werden und nicht wie im ELISA 1:50. Als weitere Plattform wurde die Octet-Plattform verwendet. Vorteile für die korrekte Messung der freien Fraktion könnten sich durch die variabel einstellbaren

Kontakt-/Inkubationszeiten ergeben. Auch die Verdünnung der Proben von 1:2 in dieser Arbeit ist deutlich geringer als im ELISA.

5.2.1 Eignung des ELISA-Formates für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion

Die ELISA-Methode zur Messung der freien Antikörperfraktion, welcher auf die weiteren Plattformen übertragen werden sollte, ist ein Antigen-Brücken ELISA. Wie von Lee und Kollegen vorgeschlagen ist dies ein ELISA-Format, welches sich grundsätzlich für die Messung der freien Fraktion eignet (Lee et al., 2011). Ein Vorteil dieses Formates ist es, dass das Antigen als Fängerprotein und als Detektionsprotein verwendet wird. Dadurch ist eine vergleichbare Affinität der Reagenzien zum Antikörper, im Vergleich zu den Affinitäten zwischen löslichem Antigen und Antikörper, zu erwarten. Würden Fänger- und Detektionsmoleküle eine größere Affinität zum Antikörper aufweisen, wäre eine Veränderung des dynamischen Bindungsgleichgewichtes alleine aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten in der Probe nicht auszuschließen (Talbot et al., 2015). Zur Kalibrierung werden Proben mit bekannter Antikörper-Konzentration in antigen-depletierter Matrix verwendet, wie von Schick und Kollegen empfohlen (Schick et al., 2016). Die Proben werden vor der Analyse 1:50 verdünnt und die Inkubationszeiten betragen eine Stunde. Es wurde erwartet, dass in Anwesenheit von Antigen ein geringeres Signal für den freien Analyten gemessen wird. Dies konnte durch die Messung steigender Analytkonzentrationen in antigenfreier Matrix im Vergleich zur Messung der entsprechenden Proben, die zusätzlich physiologische Antigen-Konzentration enthalten, bestätigt werden.

Um zu testen, wie sensibel eine Methode auf Antigen-Konzentrationen reagiert und als Bestätigung, dass die freie Fraktion gemessen wird, schlugen Lee und Kollegen eine Interferenztestung vor. Dafür werden Proben hergestellt, die unterschiedliche molare Verhältnisse von Antigen und Antikörper enthalten. Anschließend werden diese Proben zur Einstellung des Gleichgewichtes inkubiert. Nach Messung im ELISA wird die Inhibition der Konzentration gegen die molaren Verhältnisse aus Antigen und Antikörper aufgetragen und anschließend die IC_{50} bestimmt. Nach Lee und Kollegen würde die IC_{50} für einen ELISA zur Messung der freien Fraktion bei einem molaren Verhältnis von Ligand/Antikörper bei ca. 1 liegen, im Gegensatz zu einem ELISA zur Messung der Gesamtkonzentration des Antikörpers, für den die IC_{50} bei einem 300-fachen molaren Überschuss von Ligand ermittelt wurde (Lee et al., 2011). Eine

Methode zur Messung der freien Konzentration reagiert also sehr sensibel auf Antigen-Konzentrationen, wohingegen eine Methode zur Messung der Gesamtkonzentration erst auf sehr hohe Antigenkonzentrationen reagiert (Kuang et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Bindungssimulation ermittelt, wie groß die freie Antikörperfraktion in Proben unterschiedlicher Verhältnisse aus Antigen und Antikörper sein müsste. So konnten Erwartungswerte sowie plausible molare Verhältnisse für die Interferenztestung abgeleitet werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA wurde die IC_{50} bei einem molaren Verhältnis von Antigen zu Antikörper von ca. 0.4 erreicht. Ein Wert von ca. 0.5 wurde aus der Simulation abgeleitet. Bei diesem Wert würden doppelt so viele Antikörper-Moleküle in der Probe wie Antigen-Moleküle vorhanden sein und zu einer Inhibition der gemessenen Antikörper-Konzentration von 50 % führen. Ein einzelnes Antigen-Molekül könnte durch Bindung an eine Antikörperbindestelle den Nachweis dieses Antikörper-Moleküls im verwendeten Antigen-Brücken ELISA verhindern, da für die Detektion beide Bindestellen ungebunden vorliegen müssen. Folglich könnte lediglich das zweite Antikörper-Molekül nachgewiesen werden, womit es zu einer Inhibition der Konzentration von 50 % kommen würde. Der Erwartungswert von 0.5 scheint demnach plausibel. Der tatsächlich ermittelte Wert von ca. 0.4 liegt innerhalb einer Schwankung von 20 % um den Erwartungswert, was für einen ELISA in einem akzeptablen Bereich der Genauigkeit liegt (DeSilva et al., 2003). Darüber hinaus bestätigt ein Wert von annäherungsweise 1 laut LEE und Kollegen, dass der ELISA die freie Fraktion misst (Lee et al., 2011). Auch Talbot und Kollegen schlagen eine Interferenztestung vor, um herauszufinden, welche Fraktion im ELISA tatsächlich gemessen wird. Dabei weist eine IC_{50} bei einem molaren Verhältnis von $< 2:1$ (Antigen zu Antikörper) darauf hin, dass im ELISA die freie Fraktion gemessen wird (Talbot et al., 2015). Der in dieser Arbeit verwendete ELISA reagiert also sehr sensibel auf Antigen-Konzentrationen mit einer verminderten gemessenen freien Antikörperfraktion. Die gemessenen Werte entsprechen grundsätzlich den Erwartungswerten, daher kann davon ausgegangen werden, dass die freie Antikörperfraktion korrekt gemessen wird. Verdünnung der Proben, Inkubationszeiten und weitere Schritte scheinen das Gleichgewicht nicht merklich zu beeinflussen. Die sehr hohe Affinität des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers zum löslichen Antigen (K_d im zweistelligen picomolaren Bereich) trägt sehr wahrscheinlich dazu bei, dass die Auswirkung unterschiedlicher Faktoren auf das Bindungsgleichgewicht in der Probe minimal ist. Mit diesem ELISA-Format ist die

korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion möglich. Somit eignet es sich, um zu überprüfen ob ein Transfer auf weitere Plattformen prinzipiell möglich ist.

5.2.2 **Eignung der Gyrolab-Plattform für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion**

Der beschriebene ELISA sollte zunächst auf die Gyrolab-Plattform übertragen werden. Der zu messende Antikörper wird hier durch biotinyliertes Antigen, mit welchem Streptavidin-Kügelchen in der Gyrolab-CD beschichtet werden, gebunden. Anschließend erfolgt die Detektion mittels Alexa-Fluor 647 gelabeltem Antigen. Die Proben werden vor der Messung 1:5 mit Assaypuffer verdünnt. Auch hier wurde eine Interferenztestung durchgeführt. Der ermittelte IC_{50} bei einem molaren Verhältnis von 0.6 (Antigen zu Antikörper) lässt darauf schließen, dass auch auf der Gyrolab-Plattform die freie Antikörperfraktion korrekt gemessen wird.

5.2.3 **Eignung der Octet-Plattform für die korrekte Quantifizierung der freien Antikörper-Fraktion**

Der beschriebene ELISA sollte zusätzlich auf die Octet-Plattform übertragen werden. Auf der Octet-Plattform wurde biotinyliertes Antigen an Streptavidin-Nadeln gebunden. Danach erfolgte die Inkubation mit 1:2 verdünnter Probe, welche den zu quantifizierenden Antikörper enthält. In einem nächsten Schritt sollte die Inkubation mit Antigen erfolgen. Dieses Antigen-Brücken Format funktionierte auf dieser Plattform nicht. Womöglich führte die gewählte Fängerprotein-Konzentration dazu, dass gebundene Antikörper mit beiden Bindestellen an die beschichtete Oberfläche der Nadel binden und somit die zweite Bindestelle nicht mehr zur Bindung des Detektions-Proteins zur Verfügung stand. Geringere Konzentrationen der Fänger-Proteine haben grundsätzlich nicht funktioniert.

Da aber schon bei der Assoziation des Fänger-Proteins mit Analyt aus der Probe konzentrationsabhängige Assoziationskinetiken gemessen wurden, sollte dieses Antigen-Fänger Format näher untersucht werden. Es konnte auf der Octet-Plattform ein Format mit Antigen-Fänger und anti-human IgG Detektion entwickelt werden. In einem solchen Format wird die freie und partiell freie Antikörperfraktion gemessen (Lee et al., 2011). Der ermittelte IC_{50} bei einem molaren Verhältnis von 0.7 lässt darauf schließen, dass die Methode die freie Fraktion des Antikörpers misst. Da aufgrund des Formates zusätzlich zur freien Fraktion auch die partiell freie Fraktion gemessen wird, ist zu erwarten, dass die Inhibition geringer ausfällt, als mittels Bindungssimulation vorhergesagt. Dies ist dadurch zu erklären, dass mittels Bindungssimulation zwar der

Anteil an komplexiertem Analyten errechnet werden kann, allerdings lässt sich keine Vorhersage darüber treffen, welcher Anteil des komplexierten Analyten an zwei Antigenen oder an ein einziges Antigen gebunden vorliegt. Für den Fall, dass jedes gebundene Analyt-Molekül an zwei Antigen-Moleküle gebunden vorliegt, würde die Inhibition auf der Octet-Plattform der Inhibition auf den beiden anderen Plattformen entsprechen. Für den Fall, dass jedes gebundene Analyt-Molekül nur an ein Antigen gebunden vorliegt, wäre die Inhibition bei 0 %, denn die partiell freien Analyt-Moleküle könnten detektiert werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Inhibition liegen innerhalb dieser Grenzen.

5.2.4 Alternativen zur Messung der freien Antikörper-Fraktion

Eine Alternative zur direkten Messung der freien Konzentration eines Antikörpers kann es sein, die Konzentration des löslichen Antigens zu messen. Aus den Daten der Gesamt-Analytkonzentration in Verbindung mit der Gesamt-Antigenkonzentration kann die freie Antikörper Fraktion errechnet werden (Hayashi et al., 2007). Voraussetzung dafür ist allerdings, dass möglichst genaue Werte für die Dissoziationskonstante vorliegen (Reverberi and Reverberi, 2007). Ein Problem dabei könnte sich aus der Notwendigkeit ergeben, zwei ELISA-Messungen durchzuführen. Eine Messung zur Quantifizierung der Gesamt-Analytkonzentration und eine weitere Messung zur Quantifizierung der Gesamt-Antigenkonzentration. Jede der beiden Messmethoden hat eine intrinsische Variabilität, wie im Kapitel 1.6 beschrieben. Die Berechnung der freien Fraktion aus den erhobenen Daten zweier Methoden wird daher vermutlich fehleranfällig sein. Eine Methode zur Messung der Antigenkonzentration könnte zudem nützlich sein, wenn das Antigen Aktivität aufweist. Daten in Bezug auf die Antigenkonzentration würden dann hilfreich sein, um die Wirkung des Antikörpers zu überprüfen. Um inter-individuelle physiologische Konzentrationsunterschiede des Antigens zu kompensieren und um das Antigen möglichst sättigend zu binden, wird dem Patienten der Antikörper für gewöhnlich in einem Überschuss zum Antigen injiziert. Die Messung der Gesamt-Antigenkonzentration gibt Aufschluss darüber, ob das Antigen in Folge der Behandlung mit monoklonalem Antikörper akkumuliert (Lobo et al., 2004). Außerdem muss gewährleistet sein, dass trotz der erhöhten Antigenkonzentration der Antikörper die Aktivität des Antigens noch immer unterdrücken kann. Dazu kann es sinnvoll sein, zusätzlich die freie Antikörperfraktion zu quantifizieren, um herauszufinden ob diese Fraktion in den Proben ausreichend ist oder ob aufgrund der erhöhten Antigen-Konzentration ein Großteil des Antikörpers

gebunden vorliegt. Wenn Letzteres der Fall sein sollte, könnten daraufhin Überlegungen zur Erhöhung der Dosis angebracht sein. Eine Messmethode zur Quantifizierung des Antigens würde also sowohl dabei helfen, die Wirkung des Antikörpers zu überprüfen, als auch dazu beitragen, die freie Fraktion zu errechnen.

Für ein internes Projekt sollte eine Methode zur Messung eines Antigens in klinischen Proben entwickelt werden. Die besondere Schwierigkeit der Messung liegt darin, dass die Konzentrationen des therapeutischen Antikörpers in den zu messenden Proben sehr hoch sind. Wenn der Antikörper das zu messende Antigen bindet, kann dies die Detektion beeinflussen (Lee et al., 2006). Darüber hinaus weist Patientenplasma interindividuelle Unterschiede in der Konzentration sowohl des Antigens als auch des Vorläuferproteins auf. Zusätzlich wird die Messung dadurch erschwert, dass das strukturell ähnliche Vorläuferprotein in einer vielfach höheren Konzentration im Vergleich zum Antigen ebenfalls in der Probe enthalten ist.

Kommerziell erhältliche Kits sind häufig lediglich zur Messung der Proteinkonzentration von Vorläuferprotein und Antigen in Kombination mittels polyklonaler Antikörper im ELISA geeignet. Auch die Messung der kombinierten Aktivität von Vorläuferprotein und Antigen, durch vorherige Aktivierung des Vorläuferproteins, ist möglich. Bei diesen Ansätzen ist eine Unterscheidung der beiden Proteine jedoch nicht möglich. Ebenfalls gibt es kommerziell erhältliche Kits für die Aktivitätsmessung, ohne die vorherige Aktivierung des Vorläuferproteins. Allerdings eignen sich diese nicht für die Messung in klinischen Proben, da hohe Analytkonzentrationen eine Aktivitätsmessung stören könnten, denn der Analyt bindet am aktiven Zentrum des Antigens und unterdrückt dadurch dessen Aktivität.

Der therapeutische Antikörper kann bei der Messung des Antigens eine große Herausforderung darstellen, da er die Bindung zwischen Antikörper und Antigen beeinflusst. Es ist daher ratsam einen möglichen Effekt des Antikörpers auf die Messung des Antigens abzuklären (Lee et al., 2006). Es wurde festgestellt, dass die Konzentrationen des Antigens in Anwesenheit von Antikörper überschätzt werden. Insbesondere Antikörper-Konzentrationen von 100 µg/ml führten in fast allen Konzentrationsbereichen zu einer Überschätzung der Antigenkonzentration. Es wäre denkbar, dass der Analyt mit dem Antigen in der Probe Komplexe bildet, was diesen Effekt erklären könnte (Lee et al., 2011). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, könnte wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, die Probenverdünnung erhöht werden, um Komplexe

in der Probe zu dissoziieren. Die Folge wäre in der Regel allerdings ein Verlust der Sensitivität (Crisino et al., 2014). Daher sollten weitere Methoden zur Dissoziation verwendet werden. Salimi-Moosavi und Kollegen ist es gelungen, einen therapeutischen Antikörper, der die Messung des löslichen Antigens gestört hat, selektiv und irreversibel zu denaturieren ohne jedoch das Antigen zu denaturieren. So konnte die Interferenz durch den Antikörper beseitigt werden (Salimi-Moosavi et al., 2010). Zukünftig sollten also verschiedene Probenbehandlungen ausgetestet werden, um den Effekt durch hohe Antikörperkonzentrationen zu beseitigen. Zusätzlich herrscht bezüglich der Sensitivität der Methode Optimierungsbedarf. Um physiologische Antigen-Konzentrationen in der Klinik messen zu können, sollte die Sensitivität der Methode im zweistelligen picomolaren Bereich liegen. Ist eine geeignete Prozedur gefunden, um störende Komplexe zu dissoziieren, könnte eine geringere Probenverdünnung für die Methode verwendet werden, um die Sensitivität zu erhöhen.

5.2.5 Zukünftige Experimente

Zukünftige Experimente sollten eine bessere Differenzierung der Plattformen hinsichtlich der Messung freier Fraktionen erlauben. Zu diesem Zweck sollten zu quantifizierende Antikörper gegen lösliche Antigene auf den Plattformen getestet werden, für die eine geringere Affinität besteht. Faktoren, die das Bindungsgleichgewicht beeinflussen werden für die Messung eines solchen Antikörpers voraussichtlich einen größeren Einfluss haben. Auch hier kann mittels Bindungssimulation ein Erwartungswert errechnet werden. Durch Überprüfung der Methode mit Hilfe von Interferenztestung kann dann empirisch bestimmt werden, ob die Methode tatsächlich die freie Fraktion misst. Für den Fall, dass die korrekte Quantifizierung der freien Fraktion im ELISA nicht möglich ist, könnte der Transfer auf eine weitere Plattform sinnvoll sein. Plattformen auf denen eine geringere Verdünnung der Probe notwendig und geringere Inkubationszeiten ausreichen, könnten hier von Vorteil sein (Staack et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden dafür die Gyrolab-Plattform sowie die Octet-Plattform gewählt. Die Testung weiterer Antikörper-Antigen Paare auf den unterschiedlichen Plattformen wird Hinweise dafür liefern, ob der Fokus zukünftiger Methodenentwicklung eventuell auf andere Plattformen gelegt werden sollte, um die freie Analyt-Konzentration korrekt zu quantifizieren.

5.2.6 Fazit

In dieser Arbeit konnte das interferierende Protein letztendlich nicht eindeutig identifiziert werden. Es wurden Lösungsansätze diskutiert und vorgeschlagen, die in

Zukunft für die Aufklärung des Effektes hilfreich sein könnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Messung des Antigens in Plasma behandelter Probanden in Anwesenheit von therapeutischem Antikörper grundsätzlich möglich ist. Dies kann hilfreich sein, um die Pharmakodynamik des Antikörpers in klinischen Studien noch besser zu verstehen. Darüber hinaus wurde ein ELISA-Format zur Messung der freien Antikörperfraktion erfolgreich auf weitere Messplattformen übertragen. Dazu wurden Bindungssimulationen und empirische Messungen herangezogen, um die Methode bezüglich der korrekten Messung der freien Fraktion zu charakterisieren. Zukünftig ist zu testen, ob der Transfer auf die getesteten Plattformen für Analyten mit niedrigerer Affinität einen Vorteil bieten kann.

6 Literaturverzeichnis

- BARRERA, P., L. A. JOOSTEN, A. A. DEN BROEDER, L. B. VAN DE PUTTE, P. L. VAN RIEL, and W. B. VAN DEN BERG. 2001. Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin 1 and TNFalpha in patients with rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, 60: 660-9.
- BEHRING, EMIL VON. 1890. Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität bei Thieren, *Sonderdruck aus Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 5.
- BONDOS, SARAH E., and ALICIA BICKNELL. 2003. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification, *Analytical Biochemistry*, 316: 223-31.
- BÖRMER, OLE P. 1989. Interference of complement with the binding of carcinoembryonic antigen to solid-phase monoclonal antibodies, *Journal of Immunological Methods*, 121: 85-93.
- BREEDVELD, F. C. 2000. Therapeutic monoclonal antibodies, *The Lancet*, 355: 735-40.
- BUMBACA, D., A. WONG, E. DRAKE, A. E. REYES, 2ND, B. C. LIN, J. P. STEPHAN, L. DESNOYERS, B. Q. SHEN, and M. S. DENNIS. 2011. Highly specific off-target binding identified and eliminated during the humanization of an antibody against FGF receptor 4, *mAbs*, 3: 376-86.
- CARTER, P. J., and G. A. LAZAR. 2018. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit', *Nat Rev Drug Discov*, 17: 197-223.
- CASALE, THOMAS B., I. LEONARD BERNSTEIN, WILLIAM W. BUSSE, CRAIG F. LAFORCE, DAVID G. TINKELMAN, RANDALL R. STOLTZ, ROBERT J. DOCKHORN, JAMES REIMANN, JOHN Q. SU, and ROBERT B. FICK JR. 1997. Use of an anti-IgE humanized monoclonal antibody in ragweed-induced allergic rhinitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100: 110-21.
- CÉZÉ, NICOLAS, DAVID TERNANT, FRIEDRICH PILLER, DANIELLE DEGENNE, NICOLAS AZZOPARDI, ETIENNE DORVAL, HERVÉ WATIER, THIERRY LECOMTE, and GILLES PAINAUD. 2009. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab, *Therapeutic Drug Monitoring*, 31: 597-601.
- CHADD, HELEN E., and STEVEN M. CHAMOW. 2001. Therapeutic antibody expression technology, *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 188-94.
- CHAN, A. C., and P. J. CARTER. 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation, *Nat Rev Immunol*, 10: 301-16.

- CHILEWSKI, S. D., J. R. MORA, C. GLEASON, and B. DESILVA. 2014. Addressing matrix effects in ligand-binding assays through the use of new reagents and technology, *Bioanalysis*, 6: 1059-67.
- CRISINO, R. M., L. LUO, B. GEIST, J. ZOGHBI, and F. SPRIGGS. 2014. Matrix effect in ligand-binding assay: the importance of evaluating emerging technologies, *Bioanalysis*, 6: 1033-6.
- CSINCSI, A. I., A. KOPP, M. ZOLDI, Z. BANLAKI, B. UZONYI, M. HEBECKER, J. J. CAESAR, et al. 2015. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation, *J Immunol*, 194: 4963-73.
- DEAVER, D. R. 1995. A new non-isotopic detection system for immunoassays, *Nature*, 377: 758-60.
- DENG, R., S. IYER, F. P. THEIL, D. L. MORTENSEN, P. J. FIELDER, and S. PRABHU. 2011. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: what have we learned?, *mAbs*, 3: 61-6.
- DESILVA, B., W. SMITH, R. WEINER, M. KELLEY, J. SMOLEC, B. LEE, M. KHAN, R. TACEY, H. HILL, and A. CELNIKER. 2003. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules, *Pharm Res*, 20: 1885-900.
- DOSTALEK, M., I. GARDNER, B. M. GURBAXANI, R. H. ROSE, and M. CHETTY. 2013. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies, *Clin Pharmacokinet*, 52: 83-124.
- DOUCET, J., J. CANADI, C. KALIS, M. A. VALENTIN, S. MARRONY, F. DECKERT-SALVA, F. LEGAY, and A. AVRAMEAS. 2009. Reduction of matrix interferences by the combination of chaotropic salt and DMSO in a broadly applicable target-based ELISA for pharmacokinetic studies of therapeutic monoclonal antibodies, *J Pharm Biomed Anal*, 50: 924-31.
- DUBOIS, M., F. FENAILLE, G. CLEMENT, M. LECHMANN, J. C. TABET, E. EZAN, and F. BECHER. 2008. Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum, *Anal Chem*, 80: 1737-45.
- DUDAL, S., D. BALTRUKONIS, R. CRISINO, M. J. GOYAL, A. JOYCE, K. OSTERLUND, J. SMERAGLIA, Y. TANIGUCHI, and J. YANG. 2014. Assay formats: Recommendation for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team, *AAPS J*, 16: 194-205.
- DYSINGER, M., and L. E. KING. 2012. Practical quantitative and kinetic applications of bio-layer interferometry for toxicokinetic analysis of a monoclonal antibody therapeutic, *J Immunol Methods*, 379: 30-41.

- EDELMAN, G. M. 1973. Antibody structure and molecular immunology, *Science*, 180: 830-40.
- ESPUNA, G., D. ANDREU, J. BARLUENGA, X. PEREZ, A. PLANAS, G. ARSEQUELL, and G. VALENCIA. 2006. Iodination of proteins by IPy2BF4, a new tool in protein chemistry, *Biochemistry*, 45: 5957-63.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2011. 'Guideline on bioanalytical method validation' Accessed February 25, 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- EZAN, E., and F. BITSCH. 2009. Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies, *Bioanalysis*, 1: 1375-88.
- FEYEN, O., A. LUEKING, A. KOWALD, C. STEPHAN, H. E. MEYER, U. GOBEL, and T. NIEHUES. 2008. Off-target activity of TNF-alpha inhibitors characterized by protein biochips, *Anal Bioanal Chem*, 391: 1713-20.
- FINDLAY, J. W. A., W. C. SMITH, J. W. LEE, G. D. NORDBLOM, I. DAS, B. S. DESILVA, M. N. KHAN, and R. R. BOWSER. 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21: 1249-73.
- FISCHER, S. K., J. YANG, B. ANAND, K. COWAN, R. HENDRICKS, J. LI, G. NAKAMURA, and A. SONG. 2012. The assay design used for measurement of therapeutic antibody concentrations can affect pharmacokinetic parameters: Case studies, *mAbs*, 4: 623-31.
- FRALEY, K. J., L. ABBERLEY, C. S. HOTTENSTEIN, J. J. ULICNE, D. R. CITERONE, and M. E. SZAPACS. 2013. The Gyrolab immunoassay system: a platform for automated bioanalysis and rapid sample turnaround, *Bioanalysis*, 5: 1765-74.
- GIBBS, JUDY, and M KENNEBUNK. 2011. Selecting the detection system—colorimetric, fluorescent, luminescent methods.
- GIJBELS, KOENRAAD, STEFAN BROCKE, JOHN S. ABRAMS, and LAWRENCE STEINMAN. 1995. Administration of Neutralizing Antibodies to Interleukin-6 (IL-6) Reduces Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Is Associated with Elevated Levels of IL-6 Bioactivity in Central Nervous System and Circulation, *Molecular Medicine*, 1: 795-805.
- GIVEN, A. M., P. M. WHALEN, P. J. O'BRIEN, and C. A. RAY. 2012. Development and validation of an alpha fetoprotein immunoassay using Gyrolab technology, *J Pharm Biomed Anal*, 64-65: 8-15.
- GORDON, M. S., K. MARGOLIN, M. TALPAZ, G. W. SLEDGE, JR., E. HOLMGREN, R. BENJAMIN, S. STALTER, S. SHAK, and D. ADELMAN. 2001. Phase I safety and

- pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer, *J Clin Oncol*, 19: 843-50.
- GOROVITS, B., J. MCNALLY, C. FIOROTTI, and S. LEUNG. 2014. Protein-based matrix interferences in ligand-binding assays, *Bioanalysis*, 6: 1131-40.
- GOYON, A., M. EXCOFFIER, M. C. JANIN-BUSSAT, B. BOBALY, S. FEKETE, D. GUILLARME, and A. BECK. 2017. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1065-1066: 119-28.
- GREENSPAN, N. S., and E. DI CERA. 1999. Defining epitopes: It's not as easy as it seems, *Nat Biotechnol*, 17: 936-7.
- HAMILTON, R. G., G. V. MARCOTTE, and S. S. SAINI. 2005. Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving omalizumab (Xolair) therapy, *J Immunol Methods*, 303: 81-91.
- HAYASHI, N., Y. TSUKAMOTO, W. M. SALLAS, and P. J. LOWE. 2007. A mechanism-based binding model for the population pharmacokinetics and pharmacodynamics of omalizumab, *Br J Clin Pharmacol*, 63: 548-61.
- HEUDI, O., S. BARTEAU, D. ZIMMER, J. SCHMIDT, K. BILL, N. LEHMANN, C. BAUER, and O. KRETZ. 2008. Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry, *Anal Chem*, 80: 4200-7.
- HOLLEVOET, K., E. MASON-OSANN, X. F. LIU, S. IMHOF-JUNG, G. NIEDERFELLNER, and I. PASTAN. 2014. In vitro and in vivo activity of the low-immunogenic antimesothelin immunotoxin RG7787 in pancreatic cancer, *Mol Cancer Ther*, 13: 2040-9.
- HOOFNAGLE, A. N., and M. H. WENER. 2009. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry, *J Immunol Methods*, 347: 3-11.
- HOTZEL, I., F. P. THEIL, L. J. BERNSTEIN, S. PRABHU, R. DENG, L. QUINTANA, J. LUTMAN, et al. 2012. A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance, *mAbs*, 4: 753-60.
- HULS, G. A., I. A. HEIJNEN, M. E. CUOMO, J. C. KONINGSBERGER, L. WIEGMAN, E. BOEL, A. R. VAN DER VUURST DE VRIES, et al. 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments, *Nat Biotechnol*, 17: 276-81.
- HWANG, W. Y., and J. FOOTE. 2005. Immunogenicity of engineered antibodies, *Methods*, 36: 3-10.

- INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. 2019. 'International Council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, Bioanalytical Method Validation M10,' Accessed February 23, 2020. https://database.ich.org/sites/default/files/M10_EWG_Draft_Guideline.pdf.
- JANEWAY, JR CHARLES A, JR PAUL TRAVERS, MARK WALPORT, and MARK J SHLOMCHIK. 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease., 5.
- JI, Q. C., R. RODILA, and T. A. EL-SHOUBAGY. 2007. A sample preparation process for LC-MS/MS analysis of total protein drug concentrations in monkey plasma samples with antibody, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 847: 133-41.
- JI, Q. C., R. RODILA, E. M. GAGE, and T. A. EL-SHOUBAGY. 2003. A strategy of plasma protein quantitation by selective reaction monitoring of an intact protein, *Anal Chem*, 75: 7008-14.
- JOHN, R., R. HENLEY, and N. BARRON. 1989. Antibody interference in a two-site immunometric assay for thyrotrophin, *Ann Clin Biochem*, 26 (Pt 4): 346-52.
- KELLEY, M., A. B. AHENE, B. GOROVITS, J. KAMERUD, L. E. KING, T. MCINTOSH, and J. YANG. 2013. Theoretical considerations and practical approaches to address the effect of anti-drug antibody (ADA) on quantification of biotherapeutics in circulation, *AAPS J*, 15: 646-58.
- KELLEY, M., and B. DESILVA. 2007. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules, *AAPS J*, 9: E156-63.
- KENNY, G. E., and C. L. DUNSMOOR. 1987. Effectiveness of detergents in blocking nonspecific binding of IgG in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) depends upon the type of polystyrene used, *Isr J Med Sci*, 23: 732-4.
- KIESGEN, S., A. SCHRODER, T. SCHWARZ, O. CZUPALLA, M. BRAUN, M. J. GNOTH, and J. GRUDZINSKA-GOEBEL. 2016. Bypassing nonparallelism of a monoclonal antibody ligand-binding assay by employment of alternative assay formats, *Bioanalysis*, 8: 2581-93.
- KILPATRICK, D. C., and J. D. CHALMERS. 2012. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance, *J Biomed Biotechnol*, 2012: 138797.
- KIPRIYANOV, SERGEY M., and MELVYN LITTLE. 1999. Generation of Recombinant Antibodies, *Molecular Biotechnology*, 12.
- KOHLER, G., and C. MILSTEIN. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256: 495-7.

- KRICKA, LARRY J. 1999. Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays, *Clinical Chemistry*, 45: 942-56.
- KROLL, M H, and R J ELIN. 1994. Interference with clinical laboratory analyses, *Clinical Chemistry*, 40: 1996-2005.
- KUANG, BING, LINDSAY KING, and HUIFEN FAYE WANG. 2010. Therapeutic monoclonal antibody concentration monitoring: free or total?, *Bioanalysis*: 1125-40.
- LACHMANN, H. J., P. LOWE, S. D. FELIX, C. RORDORF, K. LESLIE, S. MADHOO, H. WITTKOWSKI, et al. 2009. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes, *J Exp Med*, 206: 1029-36.
- LEARY, B. A., R. LAWRENCE-HENDERSON, C. MALLOZZI, M. FERNANDEZ OCANA, N. DURIGA, D. M. O'HARA, M. KAVOSI, Q. QU, and A. P. JOYCE. 2013. Bioanalytical platform comparison using a generic human IgG PK assay format, *J Immunol Methods*, 397: 28-36.
- LEE, J. W., and M. KELLEY. 2011. Quality assessment of bioanalytical quantification of monoclonal antibody drugs, *Ther Deliv*, 2: 383-96.
- LEE, J. W., M. KELLEY, L. E. KING, J. YANG, H. SALIMI-MOOSAVI, M. T. TANG, J. F. LU, et al. 2011. Bioanalytical approaches to quantify "total" and "free" therapeutic antibodies and their targets: technical challenges and PK/PD applications over the course of drug development, *AAPS J*, 13: 99-110.
- LEE, JEAN W., VISWANATH DEVANARAYAN, YU CHEN BARRETT, RUSSELL WEINER, JOHN ALLINSON, SCOTT FOUNTAIN, STEPHEN KELLER, et al. 2006. Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement, *Pharmaceutical Research*, 23: 312-28.
- LEVEQUE, D., S. WISNIESKI, and F. JEHL. 2005. Pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies used in oncology., *Anticancer Res.*, 25: 2327.
- LIU, L. 2018. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins, *Protein Cell*, 9: 15-32.
- LIU, R., R. PILLUTLA, B. DESILVA, and Y. J. ZHANG. 2013. Rapid development of multiple 'fit-for-purpose' assays on an automatic microfluidic system using a streamlined process in support of early biotherapeutics discovery programs, *Bioanalysis*, 5: 1751-63.
- LIU, X. F., X. WANG, R. J. WEAVER, L. CALLISTE, C. XIA, Y. J. HE, and L. CHEN. 2012. Validation of a Gyrolab assay for quantification of rituximab in human serum, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 65: 107-14.

- LOBO, E. D., R. J. HANSEN, and J. P. BALTHASAR. 2004. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics, *J Pharm Sci*, 93: 2645-68.
- LUZZI, V. I., M. G. SCOTT, and A. M. GRONOWSKI. 2003. Negative thyrotropin assay interference associated with an IgGkappa paraprotein, *Clin Chem*, 49: 709-10.
- MARCHESE, R. D., D. PUCHALSKI, P. MILLER, J. ANTONELLO, O. HAMMOND, T. GREEN, L. J. RUBINSTEIN, M. J. CAULFIELD, and D. SIKKEMA. 2009. Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum, *Clin Vaccine Immunol*, 16: 387-96.
- MARTIN, NH. 1969. The immunoglobulins: a review, *Journal of clinical pathology*, 22: 117.
- MAYER, A. P., and C. S. HOTTENSTEIN. 2016. Ligand-Binding Assay Development: What Do You Want to Measure Versus What You Are Measuring?, *AAPS J*, 18: 287-9.
- MELNIKOVA, Y. I., S. G. ODINTSOV, Z. I. KRAVCHUK, and S. P. MARTSEV. 2000. Antigen-binding activity of monoclonal antibodies after incubation with organic solvents, *Biochemistry. Biokhimiia*, 65: 1256-65.
- MIKULSKIS, A., D. YEUNG, M. SUBRAMANYAM, and L. AMARAVADI. 2011. Solution ELISA as a platform of choice for development of robust, drug tolerant immunogenicity assays in support of drug development, *J Immunol Methods*, 365: 38-49.
- MORA, J. R., L. OBENAUER-KUTNER, and V. VIMAL PATEL. 2010. Application of the Gyrolab platform to ligand-binding assays: a user's perspective, *Bioanalysis*, 2: 1711-5.
- PALANDRA, J., A. FINELLI, M. ZHU, J. MASFERRER, and H. NEUBERT. 2013. Highly specific and sensitive measurements of human and monkey interleukin 21 using sequential protein and tryptic peptide immunoaffinity LC-MS/MS, *Anal Chem*, 85: 5522-9.
- PARTRIDGE, M. A., J. PHAM, O. DZIADIV, O. LUONG, A. RAFIQUE, G. SUMNER, and A. TORRI. 2013. Minimizing target interference in PK immunoassays: new approaches for low-pH-sample treatment, *Bioanalysis*, 5: 1897-910.
- PHIZICKY, E M, and S FIELDS. 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, *Microbiological Reviews*, 59: 94-123.
- PORTER, R. R. 1973. Structural studies of immunoglobulins, *Science*, 180: 713-6.
- PRATT, K. P. 2018. Anti-Drug Antibodies: Emerging Approaches to Predict, Reduce or Reverse Biotherapeutic Immunogenicity, *Antibodies (Basel)*, 7.

- PRESTA, L G, S J LAHR, R L SHIELDS, J P PORTER, C M GORMAN, B M FENDLY, and P M JARDIEU. 1993. Humanization of an antibody directed against IgE, *The Journal of Immunology*, 151: 2623-32.
- RAMACHANDRAN, N., J. V. RAPHAEL, E. HAINSWORTH, G. DEMIRKAN, M. G. FUENTES, A. ROLFS, Y. HU, and J. LABAER. 2008. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays, *Nat Methods*, 5: 535-8.
- RAUH, M. 2012. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 883-884: 59-67.
- REHAN, M., and H. YOUNUS. 2006. Effect of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies, *Int J Biol Macromol*, 38: 289-95.
- REVERBERI, R., and L. REVERBERI. 2007. Factors affecting the antigen-antibody reaction, *Blood Transfus*, 5: 227-40.
- RICHARDS, JON, JULIE AUGER, DONNA PEACE, DANIELLE GALE, JUDY MICHEL, ANN KOONS, TOM HAVERTY, ROBERT ZIVIN, LINDA JOLLIFFE, and A. JEFFREY BLUESTONE. 1999. Phase 1 Evaluation of Humanized OKT3: Toxicity and Immunomodulatory Effects of hOKT3 γ 4, *Cancer Research*, 59: 2096-101.
- RICHARDS, S., L. AMARAVADI, R. PILLUTLA, H. BIRNBOECK, A. TORRI, K. J. COWAN, A. PAPADIMITRIOU, et al. 2016. 2016 White Paper on recent issues in bioanalysis: focus on biomarker assay validation (BAV): (Part 3 - LBA, biomarkers and immunogenicity), *Bioanalysis*, 8: 2475-96.
- RITTER, MARY A, and HEATHER M LADYMAN. 1995. Monoclonal Antibodies. Production, Engineering and Clinical Application.
- ROMAN, J., J. QIU, G. DORNADULA, L. HAMURO, R. BAKHTIAR, and T. VERCH. 2011. Application of miniaturized immunoassays to discovery pharmacokinetic bioanalysis, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 63: 227-35.
- ROQUE, A. C., C. R. LOWE, and M. A. TAIPA. 2004. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification, *Biotechnol Prog*, 20: 639-54.
- SALIMI-MOOSAVI, H., J. LEE, B. DESILVA, and G. DOELLGAST. 2010. Novel approaches using alkaline or acid/guanidine treatment to eliminate therapeutic antibody interference in the measurement of total target ligand, *J Pharm Biomed Anal*, 51: 1128-33.
- SAWYER, WILLIAM H., and JONATHAN PUCKRIDGE. 1973. The Dissociation of Proteins by Chaotropic Salts, *Journal of Biological Chemistry*, 248: 8429-33.
- SCHICK, E., R. F. STAACK, M. HAAK, G. JORDAN, U. DAHL, J. HEINRICH, H. BIRNBOECK, and A. PAPADIMITRIOU. 2016. Validation of a ligand-binding assay

- for active protein drug quantification following the 'free analyte QC concept', *Bioanalysis*, 8: 2537-49.
- SCHIETTECATTE, JOHAN, ELLEN ANCKAERT, and JOHAN SMITZ. 2012. Interferences in Immunoassays. in, *Advances in Immunoassay Technology*.
- SCHMITT, HANS-MARTIN, ANDREAS BRECHT, JACOB PIEHLER, and GÜNTER GAUGLITZ. 1997. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 12: 809-16.
- SCHWICKART, M., I. VAINSHTEIN, R. LEE, A. SCHNEIDER, and M. LIANG. 2014. Interference in immunoassays to support therapeutic antibody development in preclinical and clinical studies, *Bioanalysis*, 6: 1939-51.
- SELBY, C. 1999. Interference in Immunoassay, *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*, 36: 704-21.
- SHIH, J. Y., V. PATEL, and M. MA. 2014. Strategic approaches for assessment and minimization of matrix effect in ligand-binding assays, *Bioanalysis*, 6: 1103-12.
- SHIH, J. Y., V. PATEL, A. WATSON, T. HAGER, P. LUAN, H. SALIMI-MOOSAVI, and M. MA. 2012. Implementation of a universal analytical method in early-stage development of human antibody therapeutics: application to pharmacokinetic assessment for candidate selection, *Bioanalysis*, 4: 2357-65.
- SPRIGGS, F. P., N. DURIGA, A. RATHI, and Q. QU. 2014. Resolution of matrix interference: quantitative and quasi-quantitative ligand-binding assays case studies, *Bioanalysis*, 6: 1093-101.
- STAACK, R. F., G. JORDAN, U. DAHL, and J. HEINRICH. 2014. Free analyte QC concept: a novel approach to prove correct quantification of free therapeutic protein drug/biomarker concentrations, *Bioanalysis*, 6: 485-96.
- STAACK, R. F., G. JORDAN, and J. HEINRICH. 2012. Mathematical simulations for bioanalytical assay development: the (un-)necessity and (im-)possibility of free drug quantification, *Bioanalysis*, 4: 381-95.
- STEVENSON, L. F., and S. PURUSHOTHAMA. 2014. Parallelism: considerations for the development, validation and implementation of PK and biomarker ligand-binding assays, *Bioanalysis*, 6: 185-98.
- TALBOT, J. J., D. CALAMBA, M. PAI, M. MA, and T. M. THWAY. 2015. Measurement of Free Versus Total Therapeutic Monoclonal Antibody in Pharmacokinetic Assessment is Modulated by Affinity, Incubation Time, and Bioanalytical Platform, *AAPS J*, 17: 1446-54.

- TANG, L., A. M. PERSKY, G. HOCHHAUS, and B. MEIBOHM. 2004. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products, *J Pharm Sci*, 93: 2184-204.
- TAO, M H, and S L MORRISON. 1989. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region, *The Journal of Immunology*, 143: 2595-601.
- TATE, JILL, and GREG WARD. 2004. Interferences in immunoassay, *The Clinical biochemist. Reviews*, 25: 105-20.
- U.S. FOOD AND DRUG. 2018. 'Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry', Accessed February 23, 2020. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.
- VAUGHAN, T. J., J. K. OSBOURN, and P. R. TEMPEST. 1998. Human antibodies by design, *Nat Biotechnol*, 16: 535-9.
- WALDMANN, T. A., and W. STROBER. 1969. Metabolism of immunoglobulins, *Prog Allergy*, 13: 1-110.
- WALSH, G. 2018. Biopharmaceutical benchmarks 2018, *Nat Biotechnol*, 36: 1136-45.
- WANG, W., E. Q. WANG, and J. P. BALTHASAR. 2008. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Clin Pharmacol Ther*, 84: 548-58.
- WANG, X., H. LIN, L. CAO, H. ZHENG, M. CUI, S. DU, and J. SUI. 2016. Isolation, characterization, and identification of proteins interfering with enzyme-linked immunosorbent assay of antibiotics in fish matrix, *Food Sci Biotechnol*, 25: 1265-73.
- WEBER, THEODOR H., KIRSTI I. KÄPYAHO, and PIRJO TANNER. 2011. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. A review, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 50: 77-82.
- WEERARATNE, D., A. CHEN, J. J. PENNUCCI, C. Y. WU, K. ZHANG, J. WRIGHT, J. J. PEREZ-RUIXO, et al. 2011. Immunogenicity of panitumumab in combination chemotherapy clinical trials, *BMC Clin Pharmacol*, 11: 17.
- WINKELHAKE, JEFFREY L. , and KASPER L. DENNIS. 1972. Affinity chromatography of anti-meningococcal antiserum, *J Immunol*, 109.
- WOLBINK, G. J., A. E. VOSKUYL, W. F. LEMS, E. DE GROOT, M. T. NURMOHAMED, P. P. TAK, B. A. DIJKMANS, and L. AARDEN. 2005. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, 64: 704-7.
- WRIGHT, ANN, and SHERIE L. MORRISON. 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering, *TIBTECH*, 15: 26-32.

- XIAO, Y., and S. N. ISAACS. 2012. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)--not all BSAs are alike, *J Immunol Methods*, 384: 148-51.
- YANG, JIHONG, and VALERIE QUARMBY. 2011. Free versus total ligand-binding assays: points to consider in biotherapeutic drug development, *Bioanalysis*, 3: 1163-65.
- YANG, T. Y., D. J. UHLINGER, S. A. AYERS, D. M. O'HARA, and A. P. JOYCE. 2014. Challenges in selectivity, specificity and quantitation range of ligand-binding assays: case studies using a microfluidics platform, *Bioanalysis*, 6: 1049-57.
- YANG, Z., M. HAYES, X. FANG, M. P. DALEY, S. ETTENBERG, and F. L. TSE. 2007. LC-MS/MS approach for quantification of therapeutic proteins in plasma using a protein internal standard and 2D-solid-phase extraction cleanup, *Anal Chem*, 79: 9294-301.
- ZHENG, J., J. MEHL, Y. ZHU, B. XIN, and T. OLAH. 2014. Application and challenges in using LC-MS assays for absolute quantitative analysis of therapeutic proteins in drug discovery, *Bioanalysis*, 6: 859-79.
- ZHOU, H., and M. A. MASCELLI. 2011. Mechanisms of monoclonal antibody-drug interactions, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51: 359-72.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.	4
Abbildung 2: Beispiel für ein typisches ELISA-Format.	7
Abbildung 3: Sulfo-Tag™ NHS Ester.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines MSD-Methodenformates.	8
Abbildung 5: Ausschnitt einer Gyrolab-CD mit 3 Segmenten, mit jeweils 8 Mikrostrukturen (entnommen aus Mora et al., 2010).	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Methoden-Formates auf der Gyrolab-Plattform. .	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Methoden-Formates auf der Octet-Plattform. ...	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung des dynamischen Bindungsgleichgewichtes in der Probe.	16
Abbildung 9: Darstellung der Überschätzung der freien Antikörperfraktion in ein Matrix die Antigen (in der Grafik als Target bezeichnet) enthält.	17
Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten magnetischen Kügelchen zur Aufreinigung von Antigen-bindenden Proteinen aus der Probe.	41
Abbildung 11: Schematische Darstellung der verwendeten magnetischen Kügelchen um Analyt-bindende Proteine aus der Probe aufzureinigen.	41
Abbildung 12: Unterschiede im Bandenmuster des Eluats zwischen Sammelplasma und behandelten Proben.	43
Abbildung 13: Detektion des Analyten im Eluat jeder Probe.	45
Abbildung 14: Einfluss von CFHR5 und Ficolin-2 auf den Antigen-Brücken ELISA.	48
Abbildung 15: Überprüfung des Antigens auf eine Interferenz im ELISA.	49
Abbildung 16: Überprüfung des Vorläuferproteins auf eine Interferenz im ELISA.	49
Abbildung 17: Einfluss von Protein-Gemischen auf den Antigen-Brücken ELISA.	50
Abbildung 18: Detektion von CFHR5 in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.	51
Abbildung 19: Detektion von Ficolin-2 in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.	51
Abbildung 20: Detektion von Vorläuferprotein in Sammelplasma sowie in ausgewählten Proben.	52
Abbildung 21: Einfluss von Prekallikrein/Kallikrein auf den Antigen-Brücken ELISA.	54
Abbildung 22: Einfluss von Antigen-Protein interagierenden Proteinen auf den Antigen-Brücken ELISA.	54
Abbildung 23: Assoziation der getesteten Proteine/Proteingemische an Antigen-beschichtete Glasnadeln im OctetRed96.	55
Abbildung 24: Potentiell nützliche Reagenzien für die Biomarker-Assay Entwicklung.	56
Abbildung 25: Assayformat mit Inhibitor als Fängerprotein und sulfo-gelabeltem BAY-18 (IgG und Fab-Fragment) als Detektionsmolekül.	57
Abbildung 26: Messung von Antigen in einem Format mit Inhibitor als Fängermolekül.	57
Abbildung 27: Assayformat mit BAY-12 (IgG und Fab-Fragment) als Fängerprotein und Inhibitor in Kombination mit Streptavidin-HRP als Detektionsmoleküle.	58
Abbildung 28: Messung von Antigen in einem Format mit BAY-12-Fab und BAY-12-IgG als Fängermolekül.	59
Abbildung 29: Assayformat mit BAY-18-IgG als Fängerprotein und Substratumsetzung.	60
Abbildung 30: Messung von Antigen-Konzentration indirekt über Umsetzung eines fluorogenen Substrates.	60
Abbildung 31: Assayformat mit BAY-18 (IgG und Fab-Fragment) als Fängerprotein und Inhibitor in Kombination mit Streptavidin-HRP als Detektionsmoleküle.	61

Abbildung 32: Messung von Antigen in einem Format mit BAY-18 als Fänger-molekül.	62
Abbildung 33: Einfluss des semi-homogenen ELISA-Formates auf die Messung.	64
Abbildung 34: Einfluss des Fänger-moleküls auf die Messung in unterschiedlichen Matrizes. ...	65
Abbildung 35: Einfluss von Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis getestet auf einer Platte mit hoher Bindekapazität.	66
Abbildung 36: Einfluss von Fängerprotein- sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis getestet auf einer Platte mit mittlerer Bindekapazität.	66
Abbildung 37: Einfluss von Probenverdünnung sowie Inhibitor-Konzentration auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis.	67
Abbildung 38: Messung von Kalibrierproben um Sensitivität sowie Arbeitsbereich abzuleiten.	68
Abbildung 39: Einfluss unterschiedlicher BAY-Konzentrationen auf die Messmethode.	69
Abbildung 40: Einfluss von Vorläuferprotein auf die Messmethode.	69
Abbildung 41: Schematische Darstellung des Bindungsgleichgewichtes in einer zu messenden Probe.	70
Abbildung 42: Aufbau des ELISA-Formates.	71
Abbildung 43: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Signale auf der ELISA-Plattform.	73
Abbildung 44: Interferenz-Testung des BAY-10-IgG ELISAs durch das Antigen.	74
Abbildung 45: Aufbau des Gyrolab-Formates.	75
Abbildung 46: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Messung von ungebundenem Antikörper auf der Gyrolab-Plattform.	76
Abbildung 47: Interferenz-Testung der BAY-10-IgG Messung durch das Antigen auf der Gyrolab-Plattform.	77
Abbildung 48: Aufbau des Octet Antigen-Fänger Formates.	77
Abbildung 49: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf den Octet Antigen-Fänger Format.	78
Abbildung 50: Aufbau des Octet Antigen-Fänger Formates mit anti-human IgG Detektion.	79
Abbildung 51: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Messung von ungebundenem Antikörper auf den Octet Antigen-Fänger Methode mit anti-human IgG Detektion.	80
Abbildung 52: Interferenz-Testung der BAY-10-IgG Messung durch das Antigen mittels Octet.	81
Abbildung 53: Vergleich der Plattformen für die Messung von freiem Antikörper in Plasma.	83

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analytkonzentration in den Proben, ermittelt durch Antigen-Brücken ELISA.	40
Tabelle 2: Analyt Konzentrationen vor und nach erfolgter Co-Immunpräzipitation.	42
Tabelle 3: Co-Präzipitierende Proteine, identifiziert mittels LC-MS/MS.	46
Tabelle 4: Konzentration des Vorläuferproteins in den Proben.	53
Tabelle 5: Einfluss des pH-Wertes auf die gemessenen Signale in der Aktivitätsmessung.	61
Tabelle 6: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der ELISA-Plattform.	73
Tabelle 7: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Gyrolab-Plattform.	76
Tabelle 8: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Octet-Plattform.	79
Tabelle 9: Einfluss von physiologischer Antigen-Konzentration auf die Analytkonzentration auf der Gyrolab-Plattform.	80
Tabelle 10: Daten der Messung mittels ELISA. Das Signal der Leerwerte wurde herausgerechnet.	82

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
µM	Micromolar (10 ⁻⁶ Molar)
ABTS	Azodiethylbenzthiazol
ADA	engl. anti-drugantibody
BSA	engl. bovine serumalbumin
CD	engl. compactdisc
CDR	engl. complementaritydeterminingregion
CH	konstante schwere Kette
CL	konstante leichte Kette
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme-linked-immunosorbent assay
Fc	engl. fragmentcrystallisable
g	Gramm
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	engl. kilodalton
LC-MS	engl. Liquid chromatography-mass spectrometry
M	Molar (Mol pro Liter)
mg	Milligramm (10 ⁻³ Gramm)
min	Minute
mM	Millimolar (10 ⁻³ Molar)
Nabs	Neutralisierende Antikörper
nm	Nanomolar (10 ⁻⁹ Molar)
PBS	engl. phosphatebufferedsaline
pm	Pikomolar (10 ⁻¹² Molar)
rhCFHR5	rekombinates humanes CFHR5
rhFicolin-2	rekombinates humanes Ficolin-2
sec	Sekunde
TMB	Tetramethylbenzidin
VH	variable schwere Kette
VL	variable leichte Kette
well	Kavität (z.B. in einer Mikrotiterplatte)
z.B.	zum Beispiel

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lämmerhofer für die hervorragende universitäre Betreuung und die Übernahme des 1. Gutachtens bedanken. Darüber hinaus für die hilfreichen Anregungen und das konstruktive Feedback bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Groß möchte ich dafür danken, dass er sich für die Übernahme des 2. Gutachtens bereiterklärt hat.

Besonders möchte ich Joanna Grudzinska-Goebel für die Betreuung vor Ort danken. Die Diskussionen und Denkanstöße während der letzten Jahre waren äußerst wertvoll für mich. Durch deine offene Art zu kommunizieren hast du sowohl zu meiner fachlichen als auch persönlichen Entwicklung beigetragen.

Bei Mark Gnoth möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Weiterhin für die Möglichkeit meine Arbeit in der DMPK Bioanalytik der Bayer AG in Berlin durchzuführen.

Der gesamten Bioanalytik in Berlin möchte ich für die tolle Zusammenarbeit danken. Besonders Birgit und Katja, die sich für meine praktische Einweisung viel Zeit genommen haben und sehr geduldig mit mir waren. Marlies, Andi, und Steffi für eine angenehme Atmosphäre im Büro, dafür, dass ihr mir immer wieder all meine Fragen beantwortet habt und für die sowohl fachliche als auch mentale Unterstützung. Jiang für die fachlichen Diskussionen, die Informationen zur chinesische Sprache (der Juni ist wie ein Kindergesicht), die Tipps zu den Orchideen und das sehr angenehme Miteinander. Schütti der mir mit seiner ganz besonderen Art alles beigebracht hat, was ich über das praktische Arbeiten an der Gyrolab-Plattform weiß. Christian für die Gespräche über das Universum, künstliche Intelligenz und die "dunkle Seite". Klaudija für deine sehr ansteckende gute Laune. Susanne für deine Unterstützung im Labor und einige sehr angenehme Gespräche während der Kaffeepause. Britta und Kerstin dafür, dass ihr mich trotz meiner ständigen Bestellwünsche und allerlei Fragen dennoch stets freundlich in Empfang genommen habt und mir immer weiterhelfen konntet. Ute und Kathrin für euer offenes Ohr und eure Hilfe im Labor. Michael und Birgit möchte ich dafür danken, dass ich bei euch einige Experimente durchführen durfte, für eure stetige Unterstützung fachlich, praktisch und moralisch. Yvonne, Manuela, David, Eva und Stephanie für das Feedback nach meinen Präsentationen, die Denkanstöße und dafür, dass ich eure Hilfe jederzeit in Anspruch nehmen durfte.

Herzlich möchte ich mich bei meinen Großeltern, Eltern und meiner Schwester bedanken. Dafür dass ihr mich seit 29 Jahren bedingungslos unterstützt.

Abschließend möchte ich mich bei Kim für ihre stete Unterstützung und ihr Verständnis in dieser herausfordernden Zeit bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet,

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Armin Schröder